

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*)
BOSQUET G. (France)
CAPPELLOZZA L. (Italie / *Italy*)
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*)
FREDDI G. (Italie / *Italy*)
GOLDSMITH M.R. (USA)
HE K. (Chine / *China*)
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)
MIRANDA J. E. (Brésil / *Brazil*)
REALI G. (Italie / *Italy*)
SHIMURA K. (Japon / *Japan*)
SHIRATA A. (Japon / *Japan*)
SOMASHEKAR T.H. (Inde / *India*)
SONWALKAR T.N. (Inde / *India*)
TAKEDA S. (Japon / *Japan*)
TAZIMA Y. (Japon / *Japan*)
TRENCZEK T. (Rép. tchèque / *Czech Republic*)
VAGO C. (France)
VEY A. (France)
YAMASHITA O. (Japon / *Japan*)

SOMMAIRE – CONTENTS

Actualités et opinions / News and views i

Revue / Review

Evaluation of silkworm (*Bombyx mori*) germplasm resources in China 1
 Evaluation des ressources génétiques du ver à soie (*Bombyx mori*) en Chine 13
 XU ANYING, LI MUWANG, ZHANG YUEHUA, HOÛ CHENGXIANG & LIN CHANGQI

Articles scientifiques / Scientific papers

Genetic studies of *Bombyx mori* L. by diallel cross – in varied environments 19
 Etudes génétiques de *Bombyx mori* L. par croisement diallélique dans des environnements
 variés 37
 P. R. T. RAO, B. GHOSH, A. K. SENGUPTA, S. K. DAS & C. S. CHAKRABORTY

Comparison of in-between individuals multi-trait selection methods 45
 Comparaison de méthodes de sélection de traits multiples entre individus 55
 H. GREISS, N. PETKOV, K. BOYCHEV G. DIMOV & Z. PETKOV

Biochemical studies of amylase activity in two non-mulberry silkworms, *Antheraea
 assama* and *Philosamia ricini* Boisduval (Lepidoptera: Saturniidae): a comparative
 analysis 59
 Etude comparative de l'activité de l'amylase chez deux vers à soie non-mûrier, *Antheraea
 assama* et *Philosamia ricini* Boisduval (Lepidoptera: Saturniidae) 67
 BALA GOPALAN UNNI, JYOTI REKHA SAIKIA & ARCHANA YADAV

Rapports techniques / Technical reports

Studies on *in situ* organic farming for efficient water conservation and soil fertility
 management under dry farming mulberry 71
 Etudes sur l'agriculture biologique *in situ* pour une gestion efficace de la conservation
 de l'eau et de la fertilité du sol dans le cadre de la culture du mûrier en zone sèche 79
 B. N. SUSHEELAMMA, S. B. DANDIN, C. K. KAMBLE & PRITHIVIRAJE URS

Regeneration of encapsulated apical buds of mulberry variety – S54 (*Morus indica* L.) 83
 Régénération de bourgeons apicaux encapsulés de la variété de mûrier S54
 (*Morus indica* L.) 91
 R. KAVYASHREE, M. C. GAYATRI & H. M. REVANASIDDIAH

Population dynamics of the root mealy bug, *Paraputo* sp. on mulberry in the hills of
 Darjeeling 95
 Dynamique de la population de la cochenille de la racine, *Paraputo* sp. sur le mûrier
 dans les collines de Darjeeling 101
 D. DAS, S. BISWAS, S. SARKAR, S. K. DAS & S. CHAKRABARTI

Efficiency of indigenous parasitoids against uzifly, *Blepharipa zebina* Walker (Diptera:
 tachinidae), a parasitoid of silkworm, *Antheraea mylitta* Drury 105
 Efficacité de parasitoïdes indigènes contre la mouche uzi, *Blepharipa zebina* Walker
 (Diptera : Tachinidae), un parasitoïde du ver à soie, *Antheraea mylitta* Drury 109
 RAM KISHORE, S. P. SHARMA, S. N. SINHADEO, G. C. ROY & B. R. P. SINHA

NEWS & VIEWS

EGYPT:

The Sericulture Research Department (SRD) are conducting a big project for promoting sericulture activities in Egypt – entitled “Sericulture Development in Egypt”.

Project period : 3 years 2003-2006

Total amount : 2.495.000 LE

Project Location : The SRD, 6 Governorates of Egypt

Project objectives :

Focusing on unemployment and newly graduated youth, starting by two governorates Dakahleya and Fayoum and ending by six governorates.

The project aims to develop the Sericulture activities including mulberry plantation, young silkworm rearing, (co-operative rearing), grown silkworm rearing, cocoon marketing, post-cocoon processing and silk weaving.

Project activities:

1- Establishing of mulberry fields (1/2 feddan = 1.2 hectare) for each unemployed youth + low cost rearing house for grown larvae.

2- Establishing of co-operative rearing centre with the capacity of 400 egg box per cycle.

3- Establishing of reeling units in different governorates.

4- Establishing of silk preparation unit at SRD.

5- Establishing of weaving units (semi-automatic)

6 - Training program for the unemployed youth for each activity by Indian experts.

Dr Souad Morsi Mahmoud
Plant Protection Research Institute (Cairo)
Official Delegate of Egypt at the I.S.C

ACTUALITES ET OPINIONS

EGYPTE :

Le *Sericulture Research Department* (SRD) est engagé dans la réalisation d'un grand projet de promotion des activités séricicoles en Egypte – nommé “Développement de la Sériciculture en Egypte”.

Durée du projet : 3 ans 2003-2006

Somme totale : 2 495 000 LE

Localisation : Le SRD, 6 gouvernorats égyptiens

Objectifs du projet :

Il concerne les jeunes chômeurs et les nouveaux diplômés et commence par les deux gouvernorats de Dakahleya et Fayoum et totalise en tout six gouvernorats.

Le but du projet est de développer les activités séricicoles suivantes : plantation de mûriers, élevage de jeunes vers à soie (élevage coopératif), élevage de vers matures, vente de cocons, transformation post-cocons et tissage de la soie.

Activités :

1- Mise en place de mûraies (1/2 feddan = 1,2 hectare) pour chaque jeune chômeur + magnanerie bon marché pour les larves matures.

2- Organisation d'un centre d'élevage coopératif avec une capacité de 400 boîtes d'œufs par cycle.

3- Mise en place d'unités de dévidage dans les différents gouvernorats.

4- Mise en place d'une unité de préparation de la soie au SRD.

5- Organisation d'unités de tissage (semi-automatiques).

6- Programme de formation des jeunes chômeurs pour chaque activité par des experts Indiens.

Dr Souad Morsi Mahmoud
Plant Protection Research Institute (Le Caire)
Délégué officiel de l'Egypte à la C.S.I.

EVALUATION OF SILKWORM (*BOMBYX MORI*) GERMPLASM RESOURCES IN CHINA

XU ANYING, LI MUWANG, ZHANG YUEHUA, HOU CHENGXIANG &
LIN CHANGQI

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

INTRODUCTION

China is the cradle land of sericulture, and has a history of 5000 years in mulberry planting and silkworm rearing. Before 1900s, "men till the land and women weave cloth" had been the national policy of each dynasty. Sericulture had played an important role in the national GDP. To keep up fine tradition, sericulture is still maintained in 25 provinces at present. It has been reported that there are 67,000 hectares of mulberry land and 20 million of sericultural families nationwide. During the long period of silkworm rearing and breeding, China accumulated rich germplasm resources of *Bombyx mori*.

GENERAL STATUS OF CHINESE SILKWORM GERMPLASM

It has been estimated that about one thousand and two hundred silkworm (*Bombyx mori*) germplasm resources are preserved in China. Among them, more than 700 silkworm races, including local varieties, improved races, introduced breeds, multivoltine races, new germplasm created by introducing new genes, basic races of breeding, mutant gene lines, near isogenic lines etc (Table I) are preserved at Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences (SRICAAS) which is the only national institute. The rest of the *Bombyx mori* germplasm resources are preserved in the different provincial sericultural research institutes or universities. For example, about 600 mutant gene lines (Table II) are preserved at Southwest Agricultural University (SWAU) (Dai *et al.*, 2001) and 35 multivoltine silkworm races at Sericultural Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences. Meanwhile, 21 varieties of the eri-silkworms *Philosamia cynthia ricini* are preserved at Guangxi Sericultural Research Institute, 138 Chinese tussah silkworm *Antheraea pernyi* races are preserved in Henan, Shangdong and Liaoning, and the Japanese tussah silkworm *Antheraea yamamai* resources are preserved in Heilongjiang, Liaoning, Henan, Anhui and Sichuan. Along with the development and application of gene or chromosome engineering, many new mutants and races are created constantly, thus the number of silkworm germplasm resources has risen in China.

PROGRESS OF RESEARCH ON SILKWORM GERMPLASM

Since the 1960s, the morphological characters, economic characters, disease resistance, capability of reproduction, physiology and biochemical characters had been investigated and valued. After 1980s, basic research on silkworm germplasm had been strengthened.

Table I. Current status of the silkworm germplasm resources at SRI-CAAS.**Tableau I. Etat actuel des ressources en germoplasmes de vers à soie au SRI-CAAS.**

Types	Local races	Improved races	Introduced races	Breeding materials and new germplasm	Mutant gene lines and near isogenic lines	Multivoltine races	Eri silkworm	Total
	<i>Races locales</i>	<i>Races améliorées</i>	<i>Races introduites</i>	<i>Matériels de lignage et nouveaux germoplasmes</i>	<i>Lignées génétiques mutantes et presque isogéniques</i>	<i>Races polyvoltines</i>	<i>Ver à soie Eri</i>	
Number / Nombre	96	177	152	70	220	15	20	750

Table II. Mutant gene lines preserved at SWAU.**Tableau II. Lignées génétiques mutantes conservées au SWAU.**

Type number	Type	Line number	Type number	Type	Line number
<i>Numéro de type</i>		<i>Nombre de lignées</i>	<i>Numéro de type</i>		<i>Nombre de lignées</i>
01	Lethal in embryo or larvae <i>Mortalité de l'embryon ou des larves</i>	31	12	Worm shape <i>Forme du ver</i>	23
02	Cocoon shape or quality <i>Forme ou qualité du cocon</i>	16	13	Translucent worm <i>Ver translucent</i>	25
03	Cocoon color <i>Couleur du cocon</i>	19	14	Mutant of chromosome <i>Mutant du chromosome</i>	52
04	Egg shape or shell color <i>Forme de l'œuf ou couleur de la coque</i>	33	15	Development-molting <i>Développement de la mue</i>	12
05	Egg color / <i>Couleur de l'œuf</i>	30	16	Pupae-moth <i>Papillon de la nymphe</i>	25
06	Worm legs or marks <i>Pattes ou marques du ver</i>	34	17	Linkage analysis lines <i>Lignées d'analyse de liaison</i>	26
07	Worm marks / <i>Marques du ver</i>	24	18	Un-analysis mutant lines <i>Analyse-Un des lignées mutantes</i>	44
08	Worm head or tail-eye spot <i>Tête du ver ou masque de la queue</i>	12	19	Local races <i>Races locales</i>	54
09	Worm body color I <i>Couleur du corps du ver I</i>	22	20	Near isogenic lines <i>Lignées presque isogéniques</i>	28
10	Worm body color II <i>Couleur du corps du ver II</i>	30	21	Others / <i>Autres</i>	45
11	Mosaic and abnormality <i>Mosaïques et anormalité</i>	17		Total	602

Table III. Main characters of Chinese silkworm germplasm.

Tableau III. Principaux caractères des germoplasmes de vers à soie chinois.

	Chinese temperate races	Chinese subtropical races	Japanese strains	European strains	Tropical strains
	<i>Races tempérées chinoises</i>	<i>Races sub-tropicales chinoises</i>	<i>Souches japonaises</i>	<i>Souches européennes</i>	<i>Souches tropicales</i>
Voltinism <i>Mue</i>	Monovoltine, bivoltine or diapause multivoltine. <i>Monovoltins, bivoltins ou multivoltins à diapause.</i>	Bivoltine and diapause multivoltine. <i>Bivoltins et multivoltins à diapause.</i>	Monovoltine and bivoltine. <i>Monovoltins et bivoltins.</i>	Monovoltine Monovoltins.	Non-diapause multivoltine. <i>Polyvoltins sans diapause.</i>
Moltinism <i>Mue</i>	Trimolting or tetramolting. <i>Trimuants ou tetramuants.</i>	Tetramolting. <i>Tetramuants.</i>	Tetramolting. <i>Tetramuants.</i>	Tetramolting <i>Tetramuants.</i>	Tetramolting. <i>Tetramuants.</i>
Egg / Oeuf	Egg color : celadon. Egg shell colour: straw yellow: Gumming force: strong. <i>Couleur de l'œuf : celadon. Couleur de la coque soyeuse : jaune paille. Force de collage : forte.</i>	Egg color: straw yellow (non diapause) or hazel (diapause). Egg shell color: straw yellow Gumming force: strong. <i>Couleur de l'œuf : jaune paille (sans diapause) ou noisette (diapause) Couleur de la coque soyeuse : jaune paille Force de collage : forte.</i>	Egg color : gray purple. Egg shell colour: white. Gumming force: strong <i>Couleur de l'œuf : gris violet. Couleur de la coque soyeuse : blanche. Force de collage : forte.</i>	Egg color : taupe with little green. Egg shell colour: white Gumming force: feebleness or no glue. <i>Couleur de l'œuf : taupe ou un peu vert. Force de collage: faible ou sans colle.</i>	Egg color: straw yellow or white. Egg shell colour: straw yellow or white. Gumming force: feebleness. <i>Couleur de l'œuf : jaune paille ou blanc. Couleur de la coque soyeuse : jaune paille ou blanche. Force de collage : faible.</i>

Table III. (Continued) / Tableau III. Suite

	Chinese temperate races	Chinese subtropical races	Japanese strains	European strains	Tropical strains
	<i>Races tempérées chinoises</i>	<i>Races sub-tropicales chinoises</i>	<i>Souches japonaises</i>	<i>Souches européennes</i>	<i>Souches tropicales</i>
Larva	Newly hatched larva are black and tend to concentrate. Larvae are robust and develop uniformly and fast.	Newly hatched larva are black (a few with chocolate) tinge and tend to concentrate. Larvae are robust and develop uniformly and fast.	Newly hatched larvae tend to escape; Larvae are delicate and develop non-uniformly and slowly.	Newly hatched larvae tend to escape; Larvae are delicate and susceptible to Nb. and develop slowly.	Newly hatched larvae are black; Larvae are highly resistant to high temperature and high moisture and slim in shape.
Larves	<i>Les larves venant d'éclore sont noires et tendent à se concentrer. Les larves sont robustes et se développent de manière uniforme et rapidement.</i>	<i>Les larves venant d'éclore sont de teinte noire (quelques unes chocolat) de manière non uniforme et tendent à se concentrer. Les larves sont robustes et se développent uniformément et rapidement</i>	<i>Les larves qui viennent d'éclore tendent à s'échapper. Les larves sont délicates et se développent de manière non uniforme et lentement</i>	<i>Les larves qui viennent d'éclore tendent à s'échapper. Les larves sont délicates et sensibles à Nb. et se développent lentement.</i>	<i>Les larves qui viennent d'éclore sont noires, Les larves sont très résistantes à la température élevée et à l'humidité élevée et sont fines.</i>
Pupa and moth	High amount of eggs.	Pupae are robust.	High amount of eggs.	High amount of eggs. laying egg slowly.	Most are white winged.
Nymphé et papillon	<i>Quantité d'œufs élevée.</i>	<i>Les nymphes sont robustes.</i>	<i>Quantité d'œufs élevée.</i>	<i>Quantité d'œufs élevée Ponte des œufs lente.</i>	<i>La plupart ont des ailes blanches.</i>
Cocoon	Cocoons are white or yellow and oval.	Cocoons are white or olive and dumbbell.	Cocoons are white and dumbbell.	Cocoons are white, yellow or incarnadine and superficial dumbbell.	Cocoons are white, golden or light green and spindle.
Cocon	<i>Les cocons sont blancs ou jaunes et ovales.</i>	<i>Les cocons sont blancs ou olive et cintrés.</i>	<i>Les cocons sont blancs et cintrés.</i>	<i>Les cocons sont blancs ou jaunes ou rose pâle et cintrés superficiellement</i>	<i>Les cocons sont blancs, dorés ou vert clair et fuselés</i>

1. Characteristics of silkworm germplasm:

Silkworm germplasm resources are very rich and diverse under conditions of elastic weather environment for silkworm breeding and selection. Normally, Chinese silkworm germplasm resources include local varieties, improved races, introduced breeds and allied strains. These races can be further subdivided as Chinese temperate strain, Chinese subtropical strain, Japanese strain, European strain and tropical strain. Their main characters are shown in Table III.

Table IV. Matrix characters of the silkworm germplasm resources preserved at SRICAAS

Tableau IV. Caractères matriciels des ressources génétiques conservées au SRICAAS.

Character	Ratio of each characteristic
Caractère	Rapport pour chaque caractéristique
Strain <i>Souche</i>	Chinese temperate races / <i>Races chinoises tempérées</i> : 69.21 %. Japanese strain / <i>Souche japonaise</i> : 20.76 %. European strain / <i>Souche européenne</i> : 7.64 %. Tropical strain / <i>Souche tropicale</i> : 2.39 %.
Voltinism <i>Mue</i>	Bivoltine / <i>Bivoltins</i> : 60.86 %. Monovoltine / <i>Univoltins</i> : 36.04 %. Diapause-free / <i>Sans diapause</i> : 0.48 %. Multivoltine and diapause / <i>Multivoltin et à diapause</i> : 2.63 %
Moltinism / <i>Mue</i>	Trimolting / <i>Trimuant</i> : 21.00 %. Tetramolting / <i>Tetramuants</i> : 79.00 %.
Egg shell color <i>Couleur de la coque soyeuse</i>	Light yellow / <i>Jaune clair</i> : 27.45 %. White / <i>Blanc</i> : 53.70 % Yellow / <i>Jaune</i> : 8.83 %. Ivory-white / <i>Blanc ivoire</i> : 10.02 %
Egg gumming <i>Collage de l'oeuf</i>	Gumming / <i>Collés</i> : 99.52 %. No glue / <i>Sans colle</i> : 0.48 %
Color of newly hatched larvae <i>Couleur des larves nouvellement écloses</i>	Black and brown / <i>Noir et marron</i> : 97.37 %. Chocolate / <i>Chocolat</i> : 1.19 %. Yellow or buff / <i>Jaune ou chamois</i> : 0.72 %. Black / <i>Noir</i> : 0.72 %.
Mark of larvae <i>Marques des larves</i>	Normal marking and plain / <i>Marquage normal et unies</i> : 13.37 %. Normal marking / <i>Marquage normal</i> : 27.21 %. Plain / <i>Unies</i> : 52.03 %. Others / <i>Autres</i> : 7.40 %
Shape of Old larva <i>Forme des larves mûres</i>	Stout / <i>Robustes</i> : 16.47. Slim / <i>Minces</i> : 16.71. Slim and little / <i>Minces et petites</i> : 0.72 %. Medium / <i>Moyennes</i> : 66.11 %.
Shape of cocoon <i>Forme des cocons</i>	Oval: 66.01%. Superficial dumbbell / <i>Cintré superficiellement</i> : 11.76%. Spindle / <i>Fuseau</i> : 1.96 %. Short oval / <i>Court et oval</i> : 5.89%. Deep dumbbell / <i>Très cintré</i> : 14.38 %
Cocoon color <i>Couleur du cocon</i>	White / <i>Blanc</i> : 83.53 %. Yellow, orange, buff or golden / <i>Jaune, orange, chamois ou doré</i> . 7.40 %. Nacarat : 0.48%. Others / <i>Autres</i> : 8.59 %
Wrinkles of cocoon <i>Grains du cocon</i>	Thin / <i>Fins</i> : 5.97 %. Medium coarse / <i>Grossiers et moyens</i> : 4.06. Medium thin / <i>Fins moyens</i> : 4.30 %. Medium / <i>Moyens</i> : 84.73 %. Coarse / <i>Grossiers</i> : 0.95 %.

2. Economic characters:

From 1978 to 1985, the main economic characters of 354 silkworm germplasm resources were investigated at SRICAAS (SRICAAS 1987, Table-V). It was found that the cocoon filament lengths of 10 germplasm resources were higher than 1200 m and the highest was 1610 m. There were 17 varieties with a reelability percentage over 95%. Twelve varieties had a neatness over 97.0 points, and the highest was 98.3. The sericin ratio in cocoon shell ranged from 17.2%~29.9%, and there were 18 races with less than 20%. The thickest cocoon filament size was of 3.81D and the finest was of 1.35D (Trimolting race). The highest raw silk ratio was 22.0%. Daily cocoon shell weight in the fifth instar was 3.65cg in the average, 5.63cg at the maximum, and 1.67cg at the minimum (Lin *et al.*, 1994, 1995, 1996a, 1998a, 1998b)

Table V. The main economic characters of the 354 germplasm resources at SRICAAS.

Tableau V. Principaux caractères économiques des 354 ressources génétiques du SRICAAS.

Characters / Caractères	Min	Max	Average Moyenne	SE
Number eggs / Nombre d'oeufs	250	669	464	3.58
Hatching ratio (%) / Taux d'éclosion (%)	74	99	92.96	0.211
Larval duration (days) / Durée larvaire (jours)	17.3	30.12	23.57	0.102
5th instar duration days / Durée du 5 ^{ème} âge (jours)	4	11	7.074	0.054
Duration of mounting days / Durée de la montée en jours	10	20	14.85	0.073
Larva-pupa ratio (%) / Ratio larve-nymphé (%)	52	100	95.26	0.343
Cocoon weight (g) / Poids du cocon (g)	0.56	2.33	1.45	0.014
Cocoon shell weight (g) / Poids de la coque soyeuse (g)	0.170	0.488	0.262	0.005
Cocoon shell ratio (%) Richesse soyeuse du cocon (%)	9.09	27.35	17.81	0.195
Cocoon filament length (m) Longueur du filament du cocon (m)	194	1601	699	10.866
Non-broken filament length (m) Longueur du filament sans rupture (m)	148	933	532	8.636
Reelability ratio / Ratio de dévidabilité (%)	45.45	96.20	80.22	0.537
Cocoon filament size Titre du filament du cocon (D)	1.42	3.4	2.47	0.019
Neatness / Netteté (%)	78	98	95	0.167

3. Physiology and biochemical characters :

In 1980s, newly hatched larvae of 343 germplasm resources were searched for their palatability to the artificial diets at SRICAAS (SRICAAS 1987). The results showed that the number of Japanese strains had more affinity; Chinese strains took the second place and European strains ranked the least. When viewed from the voltinism point, the polyvoltine races were better than monovoltine and bivoltine races. It was also observed that the trimolting races were better than the tetramolting races. The average feeding response standing 48hrs after hatching was 29.15%, the highest was 99.5%, with 12 races above 90%.

In 2001, the ingestibility was investigated in three hundred and eighty-six strains which were fed with artificial diet without mulberry (Zhang Y.H.*et al.*, 2002). The average feeding response after hatching was 1.74% within 48 hours, and the highest was 83.98%. The average setae dispersion ratio was 0.57% within 48 hours, and the highest was 66.48%. There was a significant positive correlation ($r = 0.859$) between the feeding response and the setae dispersion ratio. But there was no significant correlation ($r = 0.0869$) between the feeding response and the silkworm races.

The eggs of 357 silkworm germplasm resources were refrigerated for 440 days under two-step system of cold storage. The hatching ratio of 98 germplasm resources (27.5% of the total trials) was above 50%. The results also showed that hatchability ranked the highest for trimolting races, the trends being Japanese line > Chinese line for the bivoltine races, and Chinese line ~ European line > Japanese strain for the monovoltine.

He *et al.* (1983) studied the blood esterase map in 338 silkworm varieties by using the method of vertical polyacrylamide electrophoresis, and found that silkworm blood esterase could be divided into A, B and C stained region. Region A livingness was stained darkest. The esterase band of A region could be used to compare the differences among different races. The main stained region of A can be subdivided as A₁, A₂, A₁A₂ and A₀ phenotypes. It was presumed that two or more genes controlled the blood esterase, and there were several alleles on each locus. Luo *et al.* (1985) and Jiang *et al.* (1986) had also reported the blood esterase differences among different geographic germplasm resources by using the method of polyacrylamide electrophoresis.

4. Creation of new germplasm resources:

Since 1970s, China has strengthened the research on the silkworm germplasm resources and made remarkable achievements. More than 30 kinds of special characters have been investigated, and many good breeding materials were identified. As a result, several kinds of new germplasm resources had been created. For example "652", a long filament germplasm breeding material, was bred at SRICAAS in 1979, its filament reached 2125 m in average with the longest being 2960 m. By using "652" as breeding line, another new long filament race "CH8L" was bred in 1985 with the average non-broken filament length of 1860 m, the highest average of a batch was 2050 m and the highest individual value was 2599 m. Another strain EH1 with average cocoon shell weight of 0.72 g was bred. In 1980s, the sex-limited race with colored newly hatched larvae was bred (Huang, 1984a, 1984b). Further, in 1990s, a lot of new breeding materials were created. For example, HEK, a breeding material for high egg fecundity (820 eggs per female moth), the sex limited races for larval mark and natural loose eggs, the races resistant to BmNPV (1000 times more resistant than the susceptible races), the races tolerant to BmDNV-Z and fluoride were bred (Chen *et al.*, 1995, 1996).

Three breeding materials could be sex separated by using the fluorescent color cocoons obtained on the basis of observation of 348 germplasm resources under 365 nm ultraviolet radiation at SRICAAS (Chen *et al.*, 1988). It was reported that their male cocoons showed yellow fluorescence, while female cocoons showed purple fluorescence. The sex sorting veracity was almost 100%. Liu (1996) bred a fluorescent hybrid silkworm variety "Yingguang × Chunyu". The results indicated that all the yellow fluorescent cocoons were male and the white fluorescent cocoons were female when their cocoons were screened under 365nm ultraviolet rays. The veracity was more than 98%.

The high cocoon shell ratio breeding materials, "123", "124" and "129", were bred at Shanxi Sericultural Research Institute; their cocoon shell ratio was above 30%. The high silk ratio race "125" was bred in 1997; its silk ratio was 22.12%.

In 1990s, the sex linked chocolate *sch* races with female sensitive to high temperature were bred at SWAU and South China Agriculture University respectively (Zhu 2001). When the eggs of this race are treated at high temperature, the all female are killed and only male worms hatched with 95% of hatchability.

5. Breeding of new silkworm races:

In China, the thrust on improvement of silkworm races was the basis for the progress of silkworm germplasm research. Since 1949, Chinese silkworm varieties have been upgraded 4 times. Almost every 10 years, a big change had took place. In the past half century, the cocoon weight of silkworm hybrids for spring rearing has been raised from 2.1 to 2.3 g, the cocoon shell ratio from 20 to 25%, the raw silk ratio from 15 to 20%, cocoon filament length from 1100 to 1400 m and silk neatness from 89 to 94 point. At the same time, the cocoon weight of silkworm hybrids for silkworm races for summer and autumn rearing has been raised from 1.5 to 1.7 g, the cocoon shell ratio from 17 to 21%, the raw silk ratio from 12 to 15%, cocoon filament length from 750 to 1100 and neatness from 91 to 93 point.

After 1990s, the dominant varieties in China are Qingsong × Haoyue, Chunlei × Zhenzhu for spring use and Qiufeng × Baiyu, Feng 1 × 54A, 75Xin × 7532 for Summer and Autumn use. The progress in silkworm varieties are shown in Tables VI and VII.

Table VI. The representative silkworm races during different periods.

Tableau VI. Races de vers à soie représentatives pendant différentes périodes.

Period <i>Période</i>	Races for spring rearing <i>Races pour l'élevage du printemps</i>	Races for spring and autumn rearing <i>Races pour l'élevage du printemps et de l'automne</i>
1950s / <i>Années 1950</i>	Hua 8 × Yinghan Hua 9 × Yinghan	Hua10 × Yingwen
1960s / <i>Années 1960</i>	Su17 × Su16	Hua10 × 306
1970s / <i>Années 1970</i>	Huahe × Dongfei	Dong 34 × Su112 Dong 34 × 603
Late of 1970s — <i>Fin des années 1970</i>	Su 5 × Su6	781 × 782-734
Middle of 1980s <i>Milieu des années 80</i>	Hang 7 × Hang 8 Lin 3-4 × Jing5-6	Su3-Qiu3 × Su4 Zhenong1Hao × Su12
Middle of 1980s — present <i>Du milieu des années 80 à maintenant</i>	Jingsong × Haoyue Zhelei × Chunxiao Chun-Lei × Zhen-Zhu SuZhen × ChunGuang 871 × 872	781 × 7532 75Xin × 7532 Fengyi × 54A Qiufeng × Baiyu 9-Fu × 7-Xiang

Table VII. Economic characters of the representative silkworm races.

Tableau VII. Caractères économiques des races de vers à soie représentatives.

Name of variety	Cocoon output (kg/ 10 000 worms)	Cocoon weight (g)	Shell weight (g)	Cocoon shell ratio (%)	Length of filament (m)	Filament size (d)	Reelability (%)	Neatness (%)	Raw silk (%)
Nom de la variété	Production de cocons (kg/ 10 000 vers)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (g)	Richesse soyeuse (%)	Longueur du filament (m)	Titre du filament (d)	Dévidabilité (%)	Netteté (%)	Soie grège (%)
Hua 9× Yinghan	20.30	2.10	0.412	19.61	1085	2.86	76.12	92	15.10
Su 17×Su 16	22.30	2.24	0.518	23.17	1321	2.95	76.14	95	18.14
Huahe× Dongfei	25.40	2.38	0.569	23.90	1189	3.04	80.63	94	19.14
Su 5×Su6	20.78	2.06	0.522	25.30	1381	2.82	69.48	94	19.35
Jingsong× Haoyue	22.00	2.19	0.556	25.32	1429	2.94	78.80	94	20.45
Hua 10 × Yingwen	15.22	1.89	0.345	18.25	1070	2.62	83.74	94	14.05
Hua10 x 306	15.15	1.59	0.312	19.67	863	2.59	73.73	93	14.93
Dong 34 × Su 12	17.26	1.78	0.361	20.28	1065	2.38	66.02	85	14.52
Su3-Qiu 3 × Su4	17.19	1.73	0.370	21.44	965	2.80	84.10	96	14.50
Qiufeng × Baiyu	17.09	1.77	0.380	21.51	1046	2.56	71.72	95	14.48

6. Resistance or tolerance to environment and diseases:

6.1 The following major works were carried out at SRICAAS.

In 1960s and 1970s, works were carried out on silkworm endurance to high temperature.

During 1981~1986, 340 germplasm resources were studied for their susceptibility to BmDNV-Z. The results showed that 56 germplasm resources including 30 Chinese strains, 16 Japanese strains and 10 European strains were not infected with DNV-Z completely and this resistance was controlled by the recessive gene located on chromosome 15 (SRICAAS, 1987; Qin *et al.*, 1996a).

In 1990s, 344 silkworm germplasm resources were tested for their resistance to BmNPV (Chen *et al.*, 1991, 1996). The tolerance of the high resistance races was 1000 times that of the susceptible ones. The easiest susceptible races accounted for 4.05%, the susceptible races 15.29%, low resistant races, 47.69%, resistant races, 29.48%, and the high resistance races, 3.76%.

In 1993, 312 preserved silkworm germplasm resources were investigated for their fluoride-resistance. The dominant major gene for fluoride-resistance was discovered; it can resist to 200mg/kg fluoride (Lin *et al.*, 1996b).

In 2002, 281 silkworm germplasm resources were used to test their resistance to BmCPV by Xu *et al.* The results showed that the resistant races, the relative resistant races, the relative susceptible races and the susceptible account for 12.45% ($\log IC_{50} > 6$), 32.74% ($\log IC_{50} 5-5.99$), 33.81% ($\log IC_{50} 4-4.99$) and 21.00 % ($\log IC_{50} < 4$), respectively.

6.2 Some more researches were undertaken by the provincial sericultural institutes as follows:

At Zhejiang Sericultural Research Institute, Fifty-two silkworm races had been tested for their resistance to BmFV and 76 races for their fluoride-resistance. Meng (1982) studied the heredity of resistance to BmNPV, and identified the dominant main gene.

At Guangdong Sericultural Research Institute, the resistance of 79 silkworm races to *Nosema* spore, DNV-Z, BmCPV, BmNPV, fluoride had been tested (Zhang Y.N. *et al.*, 1982). The difference among different races ranged from tens to thousands of times, and some races were even resistant to 2~3 kinds of diseases. Some silkworm races including variety "683", "Bailianzhou" *etc.* were found to be highly resistant to DNV-Z and fluoride. The fundamental breeding materials "Yan137", "Kang2", "Nanqiu32" *etc.* and commercial races, "Yan137×7·Xiang" and "21Lun×65Su" had also been bred.

7. Silkworm mutants:

Before 1980s, research on the silkworm mutants had been imitated at SWAU. Now, more than 600 silkworm mutant lines including good marker gene lines are preserved there. Twenty-eight linkage group of near isogenic lines had been bred. It has been found that *ci* (orange egg) and *re* (red egg) showed rust egg; white eggs were epistatic to dark egg mutants (*re*, *ci* *etc.*). At the same time, some of the important practical mutants were applied for special aims. It was proved that *K* (knobbed) gene was correlated with the feeding efficiency. A sex-limited system that could distinguish larval sex before three molting had been bred by using different performance of *L* gene on plain (*p*) and marked (*p*⁺). The *sch* races which were sex linkage sensitive to high temperature had been bred in SWAU to rear only male silkworm. They had selected molecular markers and constructed the RAPD molecular linkage map.

Since 1984, silkworm genes had been investigated and gene pool had been set up in the germplasm resources preserved at SRICAAS. Till date, more than 200 mutants are preserved at SRICAAS. Some of them were found for the first time, such as *bl*², *blb* *ch*-2, *nbz*, *nlw*, *Ndx*, *nsd*-Z, *oy*⁻², *S*-x, *syc*, *st*-x2tc, *w*-x2, *w*-x3, *w*-x4, *w*-x5, *wbw* *etc.* Eight-three mutants had been attached to their linkage group and 66 of them had been located. Linkage group 18 had been modified (Qin *et al.*, 1996a, 1996b). Good marker genes of 28 groups and many test cross lines had been obtained or introduced. The molecular markers linked to the dominant gene control fluoride endurance, resistance to DNV-Z or resistance to BmNPV had been identified (Li *et al.*, 2001).

8. The databank of silkworm germplasm:

Since 1999, the databank of silkworm germplasm has been created. Information on more than 70 characters of 419 silkworm races with photographs has been added into the databank. Now, it is easy as well as quick to inquire the demanded characters from the databank. The configuration of the databank contained the characters as follows:

Preservation Number, Race name, Old name, Translation name, Year of collection, Collection place, Origin place, Begets of breeding, Breeding completion time, Source of data, Year of discard, Sort, System, Voltinism, Moltinism, Egg color, Egg shell color, Glued or not, Newly hatched larva color, Resistance to DNV-Z, CPV, NPV, fluoride, *Nosema bombycis*, and adverse environment, Tropism of larva, Tread mulberry leaves or not, Speed of eating, Activity of larva, Marking, Blood color, Body color of older larva, Shape of older larva, Cocooning position, Cocoon shape, Cocoon color, Cocoon fluorescence color, Wrinkle of cocoon, Floss of cocoon, Black wing pupae, Moth eye color, Moth color, Mark of moth wing, Habit of moth, Eclosion early or late, Mating ability, Habit of laying, Ratio of unfertilized egg, Ratio of good egg, Ratio of non-colored egg, Hatching ratio, Duration of incubation, Duration of 5th instar, Duration of feeding period, Duration of mounting, Survival rate of larvae, Larva-pupa survival rate, Cocoon weight, Cocoon shell weight, Cocoon shell ratio, Ratio of double cocoon, Cleanness, Silk size deviation, Raw silk percentage by fresh cocoons, Separating baves, Sericin ratio, Raw silk weight per cocoon, Cocoon filament length, Reclability,

Length of non-broken cocoon filament, Cocoon filament size, Neatness, Blood esterase, Special genes and Photographs of each stage

9. Molecular biology research in silkworm germplasm:

RAPD and AFLP techniques have been used to study the fingerprint of different geographic germplasm resources in SWAU (Xia *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 2001). Sericulturists at SRICAAS had made progress in selection of molecular markers linked to some important characters, transfer of foreign gene and its expression in silkworm larvae. The transgenic silkworm had been obtained in Guangdong sericultural research institute by means of laser, micro-inject and gene gun powder methods.

THE FUTURE PLAN OF RESEARCH ON SILKWORM GERMPLASM

The following strategies have been formulated for the future.

1. Collect more silkworm germplasm from backcountry district, investigate new mutants and make use of value genes. At the same time, collect more special silkworm materials for resistance/tolerance to disease and gene analysis *etc.*
2. Strengthen the research on the heredity, physiology, ecology and system evolution in silkworm germplasm, especially in the wild germplasm.
3. Study on the fingerprint of silkworm germplasm; discover the difference among different races at the molecular level.
4. Investigate and appraise the special characters of silkworm germplasm, create new silkworm germplasm materials which have special characteristics related to quality of silk, resistance to two or more diseases and easiness of rearing.
5. Map the complete sequence of the *Bombyx mori* genome and EST collections. Construct molecular linkage map and BAC-based physical maps which can correspond with the traditional silkworm linkage map. Breed new silkworm races by using molecular markers and so on.

REFERENCES

- CHEN K.P. & LIN C.Q. (1988). Studies on the fluorescent colors of silkworm cocoons. I. Fluorescent colors of different varieties of cocoons. *Acta Sericologica Sinica*, 14(2), 72-77.
- CHEN K.P., LIN C.Q., WU D.X., YAO Q., & FANG Q.Q. (1991). Resistance of the silkworm races to Nuclear Polyhedrosis Virus. *Acta Sericologica Sinica*, 17 (1)45-46.
- CHEN K.P., YAO Q. & LIN C.-Q. (1995). Breeding of a basic silkworm variety *HEK* with hyperlaying eggs. *Acta Sericologica Sinica*, 21(4):234-237.
- CHEN K.P., LIN C.Q. & YAO Q. (1996). Studies on the resistance to BmNPV and its hereditary regularity in the silkworm (*Bombyx mori* L.). *Acta Sericologica Sinica*, 22 (3)160-164.
- Chinese silk association, (2001) *Silk Yearbook of China*, 2001 edition, Beijing: Silk journal Press.
- DAI F.Y. & LU C., (2001). The importance of preserving silkworm mutant gene bank and the role of China. *Zhongguo Canye*, 22(3):8-12.
- HE J.L. & YI W.Z. (1983). The blood esterase map in the silkworm varieties. *Acta Sericologica Sinica*, 9(2) :103-106.
- HUANG J.T. (1984a). Studies on the chromosome engineering and application in the *Bombyx mori* silkworm: I Produce translocation between Z chromosome and W chromosome. *Acta Sericologica Sinica*, 10(1):34-37.
- HUANG J.T. (1984b). Studies on the chromosome engineering and application in the *Bombyx mori* silkworm: Analysis on the gene composition of the translocation segment of chromosome and physiological barrier in the silkworm. *Acta Sericologica Sinica*, 10(4):214-216.

- JIANG T.Q., XIANG Z.H., WANG F. & XIA Q.Y. (1986). Studies on the blood esterase by biochemical genetic method. Bulletin of Sericulture, (4): 19-23
- LI MUWANG, YAO QIN, HOU CHENGXIANG, LU CHENG & CHEN KEPING. (2001). Studies on the RAPD Markers Linked to the Densonucleosis Refractoriness Gene, *nsd-Z*, in the Silkworm, *Bombyx mori*. Sericologia, 41(3): 409-415.
- LIN C.Q., CHEN K.P., WU D.X., WANG P. & YAO Q. (1994). A report from the investigation of cocoon filament properties of silkworm variety resources. Acta Sericologica Sinica, 20(4):206-213.
- LIN C.Q., CHEN K.P., WU D.X., WANG P. & YAO Q. (1995). The investigation and correlative analysis on cocoon filament size of silkworm variety resources. Acta Sericologica Sinica, 21(3):158-162.
- LIN C.Q., CHEN K.P., WU D.X., WANG P. & YAO Q. (1996a). An investigation and correlation analysis on the sericin content of cocoon shells of silkworm Germplasm. Acta Sericologica Sinica, 22 (2):118-120.
- LIN C.Q., YAO Q., CHEN K.P., WU D.X. & FANG Q.Q. (1996b). Investigation on fluoride-resistance of silkworm (*Bombyx mori* L.) Germplasm resources. Acta Sericologica Sinica, 22 (4):253-255.
- LIN C.Q., CHEN K.P., WU D.X., WANG P. & YAO Q. (1998a). Investigation on the daily cocoon shell weight at the 5th instar of silkworm variety resources and its relative analysis. Bulletin of Sericulture, 29(1):4-6.
- LIN C.Q., YAO Q., CHEN K.P., WU D.X., WANG P. & WEI Z.J. (1998b). Sericin dissolubility of different silkworm varieties and its correlative analysis. Acta Sericologica Sinica, 24(2):81-85.
- LIU J.Q., YU Z.C., CUI Y.M., YU D.L. & DUAN Z.X. (1996). Breeding of fluorescence cocoon color sex-limited varieties Yingguang & Chunyu and the preparation of their F1 hybrid. Acta Sericologica Sinica, 22 (3):155-159.
- LU C., ZHAO A.C., ZHOU Z.Y. & XIANG Z.H. (2001). AFLP analysis of Chinese mulberry wild silkworm (*Bombyx mandarina*) and domestic silkworm (*Bombyx mori*), Acta Sericologica Sinica, 27(4):243-251.
- LUO Z.H. (1985). Studies on isodynamic enzyme of blood esterase in *Bombyx mori*. Conference of genetics and breeding in *Bombyx mori*. Changzhou, China.
- MENG Z.Q. (1982). Inheritance of resistance to nuclear polyhedrosis of the silkworm (*Bombyx mori* L.). Acta Sericologica Sinica, 8(3):133-138.
- QIN J. & YI W.Z. (1996a). Applied studies on the analysis of mutation genes and the establishment of mutation gene bank in the silkworm, *Bombyx mori*. Acta Sericologica Sinica, 22(1):13-19.
- QIN J. & YI W.Z. (1996b). Genetic linkage analysis of *nsd-Z*, the nonsusceptibility gene of *Bombyx mori* to the Zhenjiang (China) strain densonucleosis virus. Sericologia, 36(2):241-248.
- SERICULTURAL RESEARCH INSTITUTE, CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES (1987). Catalogue of silkworm varieties in China. Agricultural publishers, Beijing, China.
- XIA QINGYOU, ZHOUZEYANG, LUCHENG & XIANG ZHONGHUALI. (1998). Molecular phylogenetic study on the racial differentiation of *Bombyx mori* by random amplified polymorphic dna (RAPD) markers. Acta Entomologica Sinica, 41(1):21-40.
- XU A.Y., LIM W., LIN C.Q., ZHANG Y.H. & HOU C.X. (2002). The comparison of the resistibility to *Bombyx mori* Cytoplasmic polyhedrosis virus among silkworm resources. Acta Sericologica Sinica, 28(2):157-159.
- ZHANG Y.H., XU A.Y., WEI Y.D., LIM W., HOU C.-X. & ZHANG G.-Z. (2002) Studies on feeding habit using artificial diet without mulberry for silkworm (*Bombyx mori* L.) germplasm. Acta Sericologica Sinica, 28(4):333-336.
- ZHANG Y.N., LIU S.X. & HUO Y.M. (1982). Identification of the resistance of certain silkworm races to six types of silkworm disease. Acta Sericologica Sinica, 8 (2): 94-97.
- ZHU Y., CHEN P., ZHAO T.F., LU C. & XIANG Z. H. (2001). Research on the application of *sch* gene in the sex control of silkworm and the important of sex-limited male silkworm variety. Acta Sericologica Sinica, 27(4):253-256.

EVALUATION DES RESSOURCES GENETIQUES DU VER A SOIE (*BOMBYX MORI*) EN CHINE

XU ANYING, LI MUWANG, ZHANG YUEHUA, HOU CHENGXIANG & LIN CHANGQI

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

INTRODUCTION

La Chine est le berceau de la sériciculture et l'histoire de la culture du mûrier et de l'élevage du ver à soie remonte à 5000 ans. Avant 1900, la politique de chaque dynastie était que " les hommes labouraient la terre et les femmes tissaient les étoffes ". La sériciculture a joué un rôle important dans le PNB national. Pour conserver cette tradition, la sériciculture est maintenue dans 25 provinces. On signale qu'il y a 67 000 hectares de terres plantées de mûriers et 20 millions de familles impliquées dans la sériciculture à l'échelle nationale. Pendant la longue période de l'élevage et du lignage du ver à soie, la Chine a accumulé de riches ressources en germoplasmes de *Bombyx mori*.

ETAT GENERAL DES GERMOPLASMES DE VERS A SOIE CHINOIS

On estime qu'il y a environ mille deux cent germoplasmes de vers à soie (*Bombyx mori*) conservés en Chine. Parmi ces ressources, 700 races de vers à soie, y compris des variétés locales, des races améliorées, des lignées introduites, des races polyvoltines, des nouveaux germoplasmes créés en introduisant de nouveaux gènes, des races de base pour le lignage, des lignées génétiques mutantes, des lignées presque isogéniques etc (Tableau I) sont conservées au *Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences (SRICAAS)*, qui est le seul institut national. Le reste des ressources de *Bombyx mori* est conservé dans les différents instituts ou universités de recherche séricicole provinciaux. Par exemple, environ 600 lignées génétiques mutantes (Tableau II) sont conservées à la *Southwest Agricultural University (SWAU)* (Dai et coll., 2001) et 35 races de vers à soie polyvoltines au *Sericultural Research Institute* à l'*Academy of Agricultural Sciences* de Guangdong. Parallèlement, 21 variétés de vers à soie *Eri Philosamia cynthia ricini* sont conservées au *Sericultural Research Institute* de Guangxi, 138 races du ver à soie tussah chinois *Antheraea pernyi* sont conservées dans le Henan, Shangdong et Liaoning et les ressources en ver à soie tussah japonais *Antheraea yamamai* sont conservées dans le Heilongjiang, Liaoning, Henan, Anhui et Sichuan. Avec le développement et les applications du génie génétique et chromosomique, on a constamment créé des mutants et des races nombreux et nouveaux et le nombre de ressources génétiques de vers à soie a donc augmenté en Chine.

PROGRES DE LA RECHERCHE SUR LES GERMOPLASMES DE VER A SOIE

Depuis les années 1960, on a fait des recherches et on a évalué les caractères morphologiques, les caractères économiques, la résistance aux maladies, la capacité de reproduction, les caractères physiologiques et biochimiques. Après les années 1980, on a renforcé les recherches fondamentales sur les germoplasmes de ver à soie.

1. Caractéristiques des germoplasmes du ver à soie :

Les ressources génétiques du ver à soie sont très riches et variées dans des conditions environnementales météorologiques élastiques pour le lignage et la sélection. Normalement, les ressources génétiques du ver à soie chinois incluent des variétés locales, des races améliorées, des lignées introduites et des souches alliées. Ces races peuvent être à nouveau subdivisées en souches tempérées chinoises, en souches subtropicales chinoises, en souches japonaises, en souches européennes et en souches tropicales. Leurs principaux caractères sont présentés dans le Tableau III.

2. Caractères économiques :

De 1978 à 1985, on a étudié les principaux caractères de 354 ressources génétiques au SRICAAS (SRICAAS 1987, Tableau V). Les longueurs du filament du cocon de 10 germoplasmes sont supérieures à 1200 m et la plus importante est de 1610 m. Il existe 17 variétés avec un pourcentage de dévidage de plus de 95 %. Douze variétés ont une netteté de plus de 97 points et la plus élevée est de 98,3. Le ratio de sérécine dans la coque soyeuse est compris entre 17,2 et 29,9 % et il y a 18 races chez lesquelles il est inférieur à 20 %. Le titre du filament de cocon le plus épais est de 3,81 D et le plus fin est de 1,35D (race trimuante). Le ratio de soie grège le plus élevé est de 22 %. Le poids de coque produit quotidiennement au 5^{ème} âge est de 3,65 cg en moyenne, 5,63 cg au maximum et 1,67 cg au minimum (Lin et coll., 1994, 1995, 1996a, 1998a, 1998b).

3. Physiologie et caractères biochimiques :

En 1980, l'appétance pour des aliments artificiels de larves venant d'éclore provenant de 343 ressources génétiques a été étudié au SRICAAS (SRICAAS, 1987). Les résultats montrent que les souches japonaises ont plus d'affinités ; les souches chinoises se classent à la deuxième place et les souches européennes se classent en dernier. Du point de vue de la mue, les races polyvoltines sont meilleures que les races monovoltines et bivoltines. On observe aussi que les races trimuantes sont meilleures que les races tetramuantes. La réponse moyenne de nourrissage 48 heures après l'éclosion est de 29,15 %, la plus élevée étant de 99,5 %, avec 12 races au-dessus de 90 %.

En 2001, on a étudié la capacité d'ingestion chez trois cent quatre vingt six souches nourries avec de l'aliment artificiel sans mûrier (Zhang Y. H. et coll., 2002). La réponse moyenne après l'éclosion est de 1,74 % en 48 heures et la plus élevée est de 83,98 %. Le ratio moyen de dispersion des soies est de 0,57 % en 48 heures et le plus élevé est de 66,48 %. Il y a une corrélation positive significative ($r = 0,859$) entre la réponse de nourrissage et le ratio de dispersion des soies. Mais il n'y a pas de corrélation significative ($r = 0,0869$) entre la réponse de nourrissage et les races de vers à soie.

Les œufs de 357 ressources génétiques de vers à soie ont été réfrigérés pendant 440 jours avec un système de stockage au froid en deux étapes. Le taux d'éclosion de 98 germoplasmes (27,5 % des essais totaux) est au-dessus de 50 %. Les résultats montrent aussi que le taux d'éclosion est le plus élevé avec les races trimuantes, la tendance étant dans l'ordre lignée japonaise > lignée chinoise pour les races bivoltines et lignée chinoise ~ lignée européenne > souche japonaise pour les polyvoltins.

He et coll., (1983) ont étudié la carte estérase du sang de 338 variétés de vers à soie en utilisant la méthode d'électrophorèse verticale sur polyacrylamide et ils ont trouvé que les estérases du sang de ver à soie pouvaient être divisées en zones A, B et C. La zone A est de la couleur la plus foncée. La bande estérase de la zone A pourrait être utilisée pour comparer les différences entre les races. La principale zone colorée de A peut être sous-divisée en phénotypes A1, A2, A1A2 et A0. On suppose que deux gènes ou plus contrôlent l'estérase du sang et il y a plusieurs allèles sur chaque locus. Luo et coll., (1985) et Jiang et coll., (1986) ont aussi rapporté des différences entre des estérases du sang parmi les différentes ressources géographiques en germoplasmes en utilisant la méthode d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

4. Création de nouvelles ressources génétiques :

Depuis les années 1970, la Chine a renforcé la recherche sur les ressources génétiques du ver à soie et fait de remarquables progrès. Plus de 30 types de caractères spéciaux ont été étudiés et on a identifié de nombreux matériels de lignage de qualité. Par la suite, plusieurs types de nouvelles ressources génétiques ont été créées. Par exemple, "652", un matériel de lignage avec un long filament a été obtenu au SRICAAS en 1979, son filament atteint 2125 m en moyenne, le plus long étant de 2960 m. En utilisant "652" comme souche de lignage, on a obtenu une nouvelle race avec un long filament "CH8L" en 1985 qui donne une longueur moyenne de filament sans rupture de 1860 m, la moyenne la plus élevée d'un lot étant de 2050 m et la valeur individuelle la plus élevée étant de 2599 m. Une autre souche EH1 avec un poids moyen de coque soyeuse de 0,72 g a été lignée. En 1980, on a obtenu une race limitée au sexe dont les larves qui viennent d'éclore sont colorées (Huang, 1984a, 1984b). De plus, en 1990 on a créé beaucoup de nouveaux matériels de lignage. Par exemple, HEK, à la fécondité élevée (820 œufs par papillon femelle), des races limitées au sexe avec un marquage larvaire et des œufs non adhérents, des races résistantes au BmNPV (1000 fois plus résistantes que les races sensibles), les races tolérant BmDNV-Z et le fluor (Chen et coll., 1995, 1996).

On peut séparer les sexes de trois lignées en utilisant la fluorescence des cocons sur la base de l'observation de 348 ressources génétiques aux rayons ultraviolet à 365 nm (Chen et coll., 1988). Leurs cocons mâles présentent une fluorescence jaune, tandis que les cocons femelles présentent une fluorescence violette. La fiabilité du tri des sexes est proche de 100 %. Liu (1996) a obtenu une variété de ver à soie hybride fluorescente "Yingguang × Chunyu". Les résultats indiquent que tous les cocons fluorescents jaunes sont mâles et que les cocons fluorescents blancs sont femelles quand on les examine aux rayons ultraviolet à 365 nm. La fiabilité est de plus de 98 %. Les matériels avec un ratio de richesse soyeuse élevé "123", "124" et "129" ont été lignés au *Sericultural Research Institute* de Shanxi ; la richesse soyeuse du cocon est de plus de 30 %. On a ligné la race "125" à la richesse soyeuse élevée en 1997 ; sa richesse soyeuse est supérieure à 22,12 %.

En 1990, les races *sch* chocolat liées au sexe dont les femelles sont sensibles à une température élevée ont été lignées respectivement au SWAU et à la *South China Agriculture University* (Zhu, 2001). Quand les œufs de cette race sont traités à température élevée, toutes les femelles meurent et seuls les vers mâles éclosent avec une éclosion de 95 %.

5. Lignage des nouvelles races de vers à soie :

En Chine, l'attention qui a été portée à l'amélioration des races de vers à soie a été à la base des progrès de la recherche sur les germoplasmes de vers à soie. Depuis 1949, la qualité des variétés de ver à soie chinoises a été multiplié par quatre. Presque tous les dix ans, il s'est produit un changement important. Dans la moitié du siècle dernier, le poids du cocon des hybrides de vers à soie pour l'élevage de printemps a augmenté de 2,1 à 2,3 g, la richesse soyeuse de 20 à 25 %, le ratio de soie grège de 15 à 20 %, la longueur de filament de cocon de 1100 à 1400 m et la netteté de la soie de 89 à 94 points. Parallèlement, le poids du cocon des hybrides de ver à soie de races de vers à soie destinées à l'élevage d'été et d'automne est passé de 1,5 à 1,7 g, la richesse soyeuse de 17 à 21 %, le ratio de soie grège de 12 à 15 %, la longueur de filament du cocon de 750 à 1110 m et la netteté de 91 à 93 points.

Après les années 1990, les variétés dominantes en Chine étaient Qingsong × Haoyue, Chunlei × Zhenzhu pour l'utilisation au printemps et Qiufeng × Baiyu, Feng1 × 54A, 75Xin × 7532 pour l'utilisation en été et en automne. Les progrès en matière de variétés de vers à soie sont présentés dans les Tableaux VI et VII.

6. Résistance ou tolérance à l'environnement et aux maladies :

6. 1. Les principaux travaux qui ont été réalisés au SRICAAS sont les suivants :

Dans les années 1960 et 1970, des études ont été entreprises sur l'endurance du ver à soie à une température élevée.

De 1981 à 1986, on a étudié la sensibilité à BmDNV-Z de 340 ressources génétiques. Les résultats montrent que 56 ressources génétiques, y compris 30 souches chinoises, 16 souches japonaises et 10

souches européennes n'ont pas été complètement infestées par DNV-Z et que cette résistance est contrôlée par un gène récessif situé sur le chromosome 15 (SRICAAS, 1987 ; Qin et coll., 1996a).

En 1990, 334 ressources génétiques de vers à soie ont été testées par rapport à leur résistance à BmNPV (Chen et coll., 1991, 1996). La tolérance des races très résistantes est 1000 fois supérieure à celle des races sensibles. Les races les plus sensibles représentent 4,05 %, les races sensibles 15,29 %, les races faiblement résistantes 47,69 %, les races résistantes 29,48 %, et les races très résistantes 3,76 %.

En 1993, on a étudié la résistance au fluor de 312 ressources génétiques de vers à soie. On a découvert le gène principal de la résistance au fluor ; la résistance peut être de 200 mg / kg de fluor (Lin et coll., 1996b).

En 2002, 281 ressources génétiques de vers à soie ont été utilisés pour tester leur résistance à BmCPV par Xu et coll.. Les résultats montrent que les races résistantes, les races relativement résistantes, les races relativement sensibles et sensibles représentent respectivement 12,45 % ($\log IC_{50} > 6$), 32,74 % ($\log IC_{50} 5-5,99$), 33,81 % ($\log IC_{50} 4-4,99$) et 21,00 % ($\log IC_{50} < 4$),.

6.2. Des recherches supplémentaires ont été entreprises par les instituts séricoles provinciaux comme suit :

Au *Sericultural Research Institute* du Zhejiang, on a testé la résistance à BmVF de 52 races de vers à soie et la résistance au fluor de 76 races. Meng (1982) a étudié l'hérédité de la résistance à BmNPV et identifié le principal gène dominant.

Au *Sericultural Research Institute* de Guangdong, on a testé la résistance de 79 races de vers à soie aux spores de *Nosema*, à DNV-Z, à BmCPV, à BmNPV, et au fluor (Zhang Y. N. et coll., 1982). Les différences entre les différentes races sont de l'ordre de dizaines de milliers et certaines races sont même résistantes à 2 ou 3 types de maladies. On trouve que certaines races de vers à soie comme " 683 " et " Bailianzhou " sont très résistantes à DNV-Z et au fluor. Les matériels fondamentaux " Yan137 ", " Kang2 ", " Nanqiu32 " et les races commerciales " Yan137×7.Xiang " et " 21Lun×65Su " ont aussi été lignés.

7. Mutants de vers à soie :

Avant le début des années 1980, on a démarré la recherche sur les mutants de vers à soie au SWAU. Maintenant, plus de 600 lignées mutantes de vers à soie y compris des lignées avec de bons gènes marqueurs sont conservées ici. Vingt-huit groupes de liaison de lignées presque isogéniques ont été obtenus. On trouve que *ci* (œuf orange) et *re* (œuf rouge) présentent un œuf rouillé ; les œufs blancs sont épistatiques par rapport aux œufs mutants sombres (*re*, *ci* etc.). Parallèlement, on a attribué des objectifs spéciaux à certains mutants importants en pratique. On a prouvé que le gène *K* (à bosse) est corrélé à l'efficacité de nourrissage. On a ligné un système limité au sexe qui pourrait distinguer le sexe larvaire avant les trois mues en utilisant une performance différente du gène *L* sur uni (p) et marqué (p+). Les races liées au sexe *sch* qui sont sensibles à la température élevée ont été lignées au SWAU pour élever seulement des vers à soie mâles. Elles ont des marqueurs moléculaires sélectionnés et ont permis la construction d'une carte de liaison moléculaire RAPD.

Depuis 1984, on a étudié les gènes de ver à soie et un pool de gènes a été constitué dans les ressources génétiques conservées au SRICAAS. Jusqu'à présent, plus de 200 mutants sont conservés au SRICAAS. On a trouvé certains d'entre eux pour la première fois, tels que bf^2 , *blb ch-2*, *nbz*, *nlw*, *Ndx*, *nsd-Z*, oy^{-2} , *S-x*, *syc*, *st-x2tc*, *w-x2*, *w-x3*, *w-x4*, *w-x5*, *wbw*, etc.. Quatre vingt trois mutants ont été attachés à leur groupe de liaison et 66 d'entre eux ont été localisés. On a modifié le groupe de liaison 18 (Qin et coll., 1996a, 1996b). On a obtenu et introduit de bons gènes marqueurs de 28 groupes et de nombreuses lignées test. Les marqueurs moléculaires liés au gène dominant contrôlant l'endurance au fluor, la résistance à DNV-Z ou la résistance à BmNPV (Li et coll., 2001) ont été identifiés.

8. La base de données sur les germoplasmes de vers à soie :

Depuis 1999, on a créé une base de données sur les germoplasmes de vers à soie. On a ajouté à la base de données l'information sur plus de 70 caractères de 419 races de vers à soie avec des photographies. Maintenant, il est facile et rapide d'interroger la base de données à partir des caractères demandés. La configuration de la base de données contient les caractères suivants :

Numéro de conservation, Nom de Race, Ancien Nom, Nom Traduit, Année de recueil, Endroit de Recueil, Endroit d'Origine, Début du lignage, Durée d'achèvement du lignage, Source des données, Année d'élimination, Système de Tri, Voltinisme, Moltinisme, Couleur de l'œuf, Couleur de la coque soyeuse, œuf adhérent ou pas, Couleur des larves venant d'éclore, Résistance à DNV-Z, CPV, NPV, fluor, *Nosema bombycis* et environnements défavorables, tropisme des larves, vitesse de nourriture, activité des larves, marquage, couleur du sang, couleur du corps des larves les plus mûres, forme des larves les plus mûres, position de coconage, forme du cocon, couleur du cocon, couleur de la fluorescence du cocon, grain du cocon, bourre du cocon, nymphes aux ailes noires, couleur des yeux du papillon, couleur du papillon, marques des ailes du papillon, comportement du papillon, éclosion précoce ou tardive, capacité d'accouplement, habitude de ponte, ratio d'œufs non fécondés, ratio d'œufs de qualité, ratio d'œufs non colorés, ratio d'éclosion, durée d'incubation, durée du 5^{ème} âge, durée de la période d'alimentation, durée de la montée, taux de survie des larves, taux de survie larve-nymph, poids du cocon, poids de la coque soyeuse, richesse soyeuse, taux de douppions, propreté, déviation du titre de la soie, pourcentage de soie grège pour les cocons frais, baves de séparation, ratio de sérécine, poids de la soie grège par cocon, longueur de filament de cocon, dévidabilité, longueur de filament du cocon sans rupture, titre du filament, netteté, estérase du sang, gènes spéciaux et photographies de chaque étape.

9. Recherche sur la biologie moléculaire dans les germoplasmes de vers à soie :

On a utilisé les techniques RAPD et AFLP pour étudier l'empreinte ADN de ressources de germoplasmes géographiquement différentes au SWAU (Xia et coll., 1998 ; Lu et coll., 2001). Les sériciculteurs du SRICAAS ont fait des progrès dans la sélection de marqueurs moléculaires liés à certains caractères importants, dans le transfert des gènes étrangers et dans leur expression chez les larves de vers à soie. On a obtenu un ver à soie transgénique à l'institut de recherche séricicole de Guangdong au moyen de méthodes utilisant le laser, la micro-injection et la biolistique.

FUTUR PLAN DE RECHERCHE SUR LES GERMOPLASMES DE VERS A SOIE

On a mis au point les stratégies suivantes pour le futur :

1. Recueillir plus de germoplasmes de vers à soie d'endroits éloignés, étudier les nouveaux mutants et utiliser les gènes de valeur. Au même moment, isoler plus de vers à soie spéciaux pour la résistance / la tolérance à la maladie et pour l'analyse des gènes, etc...

2. Renforcer la recherche sur l'hérédité, la physiologie, l'écologie et l'évolution du système chez les germoplasmes de ver à soie, surtout chez les vers à soie sauvages.

3. Etudier les empreintes ADN de germoplasmes de vers à soie, découvrir les différences parmi les différentes races au niveau moléculaire.

4. Etudier et apprécier les caractères spéciaux des germoplasmes de ver à soie, créer de nouveaux germoplasmes de vers à soie qui ont des caractéristiques spéciales liées à la qualité de la soie, la résistance à deux maladies ou plus et la facilité d'élevage.

5. Cartographier la séquence complète du génome de *Bombyx mori* et des collections EST. Construire la carte de liaison moléculaire et les cartes physiques à base de BAC qui peuvent correspondre à la carte de liaison du ver à soie traditionnelle. Ligner de nouvelles races de vers à soie en utilisant des marqueurs moléculaires et ainsi de suite.

GENETIC STUDIES OF *BOMBYX MORI* L., BY DIALLEL CROSS - IN VARIED ENVIRONMENTS

P. R. T. RAO, B. GHOSH, A. K. SENGUPTA, S. K. DAS & C. S. CHAKRABORTY*

Silkworm Breeding & Genetics Laboratory, Central Sericultural Research & Training Institute,
Berhampore - 742 101, West Bengal, India.

Gene action studies in Bombyx mori L., were made from diallel crosses between 5 genetically diverged bivoltine silkworm breeds i. e. , P5, NB18, JD6, SF19 & KS(O). The parents and their hybrid combinations have been subjected to diallel, graphic, components of variants and combining ability analysis. The graphical analyses revealed over dominant type of gene action for pupation rate and single shell weight during October -November and yield in January.- February. The analysis also revealed high proportion of dominant genes in the parents like P5 and NB18.

However, component analysis and combining ability studies depicted preponderance of over dominance and non-additive type of gene action for most of the traits in both seasons. Therefore, P5 & NB18 should be considered for initiating crosses for pedigree breeding. Further, P5, NB18 & KS (O) can also be subjected for F1 hybrid preparation.

Keywords: Gene action, *B. mori* L. degree of dominance, recessive, positive and negative effect.

INTRODUCTION

Knowledge on the nature of gene action and the number of genes controlling the expression of quantitative traits is of paramount importance to the breeder to have a sound - breeding programme. Since the quantitative traits, in silkworm, *Bombyx mori* (L.), are governed by polygenes their inheritance is complex in nature.

Environmental effects on gene action were earlier, reported by Allard 1956, by diallel crosses in lima beans. Such gene actions, on varied environment, were also studied in wheat (White House *et al.*, 1958, Lumpton 1961), pearl millet (Ahluwalia *et al.*, 1962) and jute (Singh 1974). In mulberry silkworm, Krishnaswami *et al.*, 1964 reported over dominance for egg viability, effective rate of rearing (ERR), and single shell weight (SSW). Observations on such studies were also reported by Sengupta *et al.*, (1974), Gamo *et al.*, (1983), Sarkar *et al.*, (1991), Sen (1992) and Mukherjee *et al.*, (1994). Extensive studies have been conducted in tasar silkworm, by Siddiqui *et al.*, (1988 a), Sengupta (1991). In eri silkworm similar studies, were reported by Nagaraja (1994).

In the present investigation, a study on some genetically diverged silkworm breeds (Sen, 1992), collected and maintained at Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore (West Bengal), India, was undertaken to envisage the genetic basis of seasonal variations in some economically important quantitative traits. The mode of gene action, by applying diallel crossing method (graphical) and components of genetic variation, is also reported here

* Department of Zoology, University of North Bengal, Siliguri - 734 430, West Bengal, India.

MATERIALS AND METHODS

Five genetically diverged bivoltine silkworm breeds i. e., P5, NB18, JD6, SF19, and KS(O) (Table I) were crossed in complete diallel fashion (5×5) to give 25 combinations (including parents and reciprocals). Rearing of hybrids was done following a CRD (completely randomized design). Eggs laid by the mother moths on the egg sheets were acid treated in 1.075 sp. gr. HCl at 46°C for 4-5 minutes for terminating the diapause to facilitate hatching. Each combination with 3 disease free layings was reared in three different trays implicating each tray - a replication. After II moult 300 worms were fed 4 times a day with fresh mulberry leaves of S1 variety. Rearings were conducted as per the standard technique (Krishnaswami 1978, 1979) during October - November and January - February for two consecutive years.

Table I. Qualitative traits of silkworm breeds.

Tableau I. Traits qualitatifs des lignées de ver à soie.

Strain	Larval marking	Cocoon colour	Cocoon shape
<i>Souche</i>	<i>Marquage larvaire</i>	<i>Couleur du cocon</i>	<i>Forme du cocon</i>
P5	Mark / <i>Marque</i>	White / <i>Blanche</i>	Slightly Constricted / <i>Légèrement cintrée</i>
NB18	Plain / <i>Uni</i>	White / <i>Blanche</i>	Deeply Constricted / <i>Fortement cintrée</i>
JD6	Mark / <i>Uni</i>	White / <i>Blanche</i>	Elliptical / <i>Elliptique</i>
SF19	Mark / <i>Uni</i>	White / <i>Blanche</i>	Elliptical / <i>Elliptique</i>
KS(O)	Mark / <i>Uni</i>	White / <i>Blanche</i>	Oval / <i>Ovale</i>

Observations were recorded for four important quantitative traits i. e., Pupation rate in percent (Pup), Yield / 10000 larvae in Kg (Yield), Single cocoon weight in grams (SCW) and Single shell weight in grams (SSW).

Data were analyzed using the graphical method of diallel crosses developed by Jinks and Hayman (1953), as extended to heterogeneous material by Dickinson and Jinks (1956). Here, V_r was the variance of the offspring of the r th parental array and W_r was the covariance of the offspring in that array with the non-recurrent parent. The slope of regression line - 'b' and position of the $V_r - W_r$ graph and the distribution of the array points provided a basis for arriving at some conclusion regarding the genetic architecture of the characters under question. The limiting parabola within which all the points must, on mathematical grounds, lie was observed using the relationship $W_r^2 = V_p - V_r$ where V_p being the variance of parental means. Testing of significance of regression in the axes zero was done by the 't' test. Values of t^2 for each character from W_r and V_r values were calculated and tested for their significance against tabulated "F" value at a desired level of probability. Significant values of " t^2 " shall indicate failure of one or more assumptions. The Standardized deviation graph for each trait was constructed and interpreted according to Hayman (1954, b; 1958). In $W_r + V_r$ and Y_r co-ordinate, the parents in the first quadrant (++) (upper portion of the right hand side) showed higher parental performance associated with recessive genes (non-effective). The parents in the second quadrant (+, -) (upper portion of the left-hand side) showed lower parental performance associated with recessive genes. Parents in the third quadrant (-, -) (lower portion of the left-hand side) showed association of low parental performance with the dominant genes and lastly, those in the fourth

quadrant (–, +) (lower portion of the right hand side) showed the association of dominant genes (most effective) with higher parental performance.

The Genetic components of variance and graphic analysis were analyzed by the method of Jinks and Hayman (1953) and Hayman (1954 a, 1954 b). Combining ability [general combining ability (gca) and specific combining ability (sca)] was calculated using the formula derived by Griffing (1956).

RESULTS

1) Graphic analysis of diallel population:

The graphic analysis of diallel population of bivoltine breeds for important quantitative traits (Pup, Yield, SCW, SSW) were carried out (Jinks 1954).

The linear regression of W_r (covariance between the parents and their off-springs) on V_r (variance of the parents) limiting parabola and distribution of parental points around the regression line were graphically presented in Fig. 1A to 4B. In order to determine whether dominance was due to positive or negative genes, a standardized deviation graph for parental effect (Y_r) and parental order of dominance $Y_r/W_r + V_r$ were drawn by the method described by Hayman (1954 b,) and Johnson and Aksel (1959). The validity of the assumption of diallelism was tested by t^2 (Hayman 1954, a) which was non-significant for all the quantitative traits during both seasons i. e., October – November and January – February. This showed that most of the assumptions were fulfilled, which permitted the Hayman's method for interpretation of array covariance (W_r) on the array variance (V_r).

October - November:

The t^2 was not significant for all the characters. The correlation coefficient (r) was significant and positive for all the traits. Y was negative for PUP and SSW. The b slope was positive for all the traits.

PUP:

Here, the regression line was cutting below the origin of W_r axis showing over dominance (fig. 1A). In $Y_r/W_r + V_r$ graph, parents 1 (P_5) and 3 (JD_6) were shown to contain high proportion of dominant genes whereas parents 2 (NB_{18}) and 4 (SF_{19}) were seen to carry low proportion of recessive genes. Parent 5 ($KS-O$) was having equal number of dominant and recessive genes but in low proportion (Fig. 1B).

Yield:

In $V_r W_r$ graph, the regression line was running above the origin and thus indicating partial dominance (Fig. 2A). In $Y_r/W_r + V_r$ graph, parents 1 was placed at the upper portion of the right hand side, thus revealing high proportion of recessive genes whereas parent 3 and 5 were seen at the upper portion of left hand side depicting low proportion of recessive genes. Parent 4 and 2 were seen at the lower portion of left hand side indicating low proportion of dominant genes (Fig. 2B).

SCW:

The regression line, in $W_r V_r$ graph was passing above the origin showing partial dominance (Fig. 3A). In the standardized deviation graph, parents 1 and 2 were having high proportion of dominant genes and parent 5 was containing high proportion of recessive genes. But parents 3 and 4 were carrying low proportion of recessive genes ($r = -0.979$) (Fig. 3B).

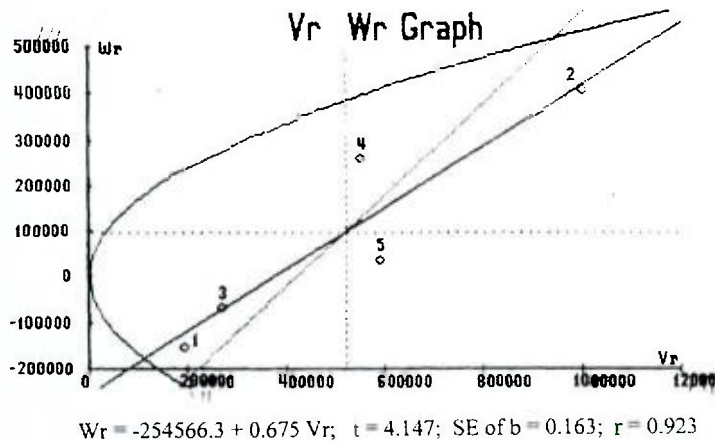


Fig. 1a. Pupation rate (Oct - Nov.)

Fig. 1a. Taux de nymphose (oct - nov.).

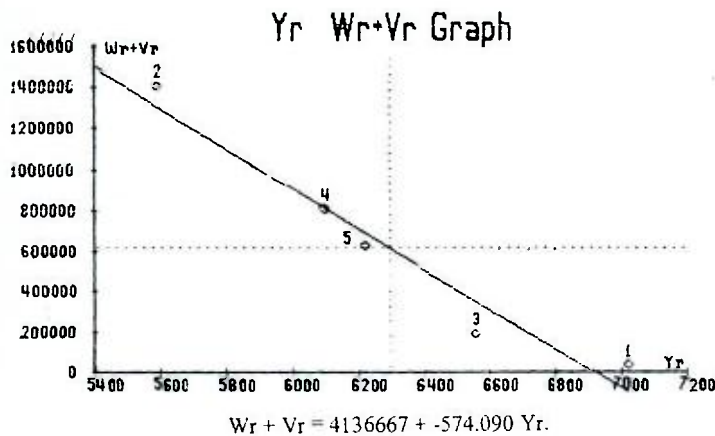


Fig. 1b. Pupation rate (Oct - Nov.)

Fig. 1b. Taux de nymphose (oct-nov.)

SSW:

The regression line on Vr Vr graph was passing below the origin and thus was showing over dominance ($P \geq 0.05$) (fig. 4a). In Yr/Vr+Vr graph, parents 1 and 2 were containing high proportion of positive dominant genes and parents 3, 4 and 5 containing low proportion of recessive genes (Fig. 4b).

January - February:

Here too, the t^2 was not significant for all the traits under study and thus the validity of the assumption was fulfilled. The correlation coefficient was positively significant ($P > 0.01$) for all the traits.

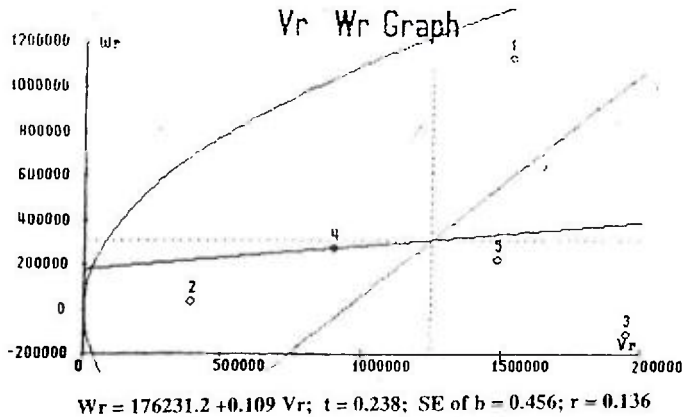


Fig. 2a. Yield per 10 000 larvae (Oct - Nov.)

Fig 2a. Rendement pour 10 000 larves (oct - nov.).

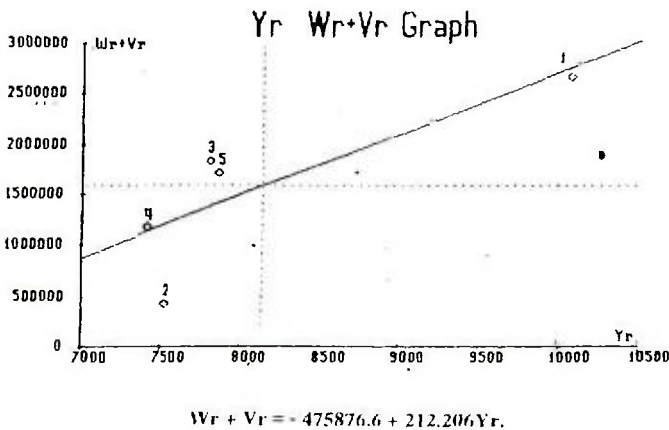


Fig. 2b. Yield per 10 000 larvae (Oct - Nov.)

Fig 2b. Rendement pour 10 000 larves (oct - nov.).

PUP:

Here, a partial dominance was recorded as the regression line was passing above the origin (Fig. 5A). In $Yr/Wr+Vr$ graph, the parents 1 and 3 were seen to occupy the lower portion of right hand side revealing high proportion of dominant genes. Parents 2 and 5 were placed at the lower portion of the left-hand side indicating low proportion of dominant genes. On the other hand, parent 4 was seen at the upper portion of left-hand side depicting low proportion of recessive genes (Fig. 5B).

Yield:

An over dominant gene action, in this case, was recorded since the regression line intercepted just below the Wr axis (Fig. 6A). In $Yr/Wr+Vr$ graph, the regression line was negatively correlated ($r = -0.945$). Here, parents 1 and 2 were possessing high proportion of positive dominant genes. Parents 4 and 5 were containing lower proportion of recessive genes whereas parent 3 was carrying equal amount of low proportion of dominant and recessive genes (Fig. 6B).

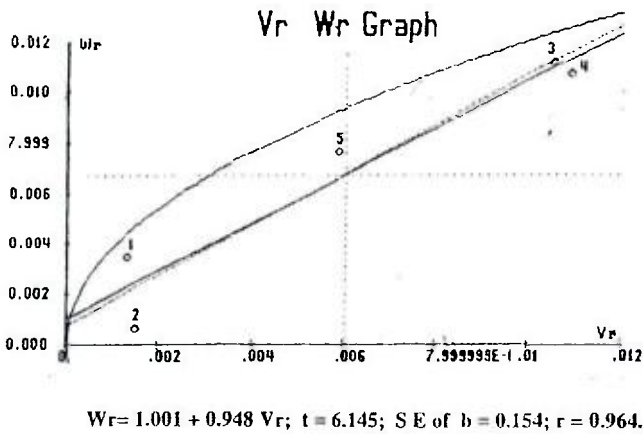


Fig. 3a. Cocoon weight (Oct - Nov.).

Fig. 3a. Poids du cocon (oct - nov.).

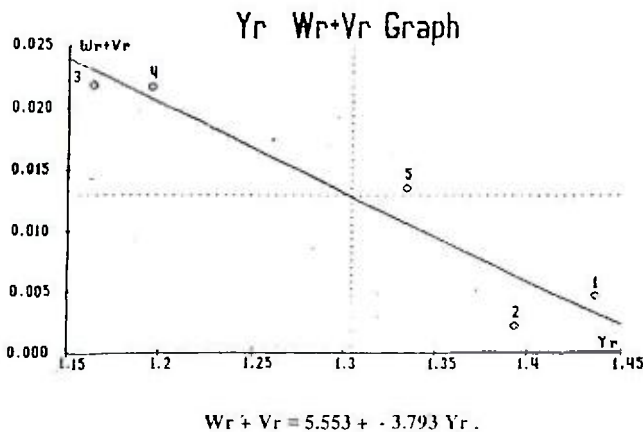


Fig. 3b. Cocoon weight (Oct - Nov.).

Fig. 3b. Poids du cocon (oct - nov.).

SCW:

In $Wr Vr$ graph, the regression line was intercepting above the origin of Wr axis showing partial dominance (Fig. 7A). The standardized deviation graph was showing that the parents 1 and 2 were carrying high proportion of positive dominant genes. In the figure 7 (B), the parents 3 and 4 were seen at the upper portion of the left hand side indicating lower proportion of recessive genes whereas parent 5 was seen in between right and left portion on lower half side indicating equal amount of high proportion of recessive and dominant genes ($r = -0.951$).

SSW:

Partial dominance was recorded when the regression line was intercepting Wr axis above the origin (Fig. 8A). In the standardized deviation graph, parents 1 and 2 were placed at lower half of right hand side showing high proportion of dominant genes. Parents 3 and 5 were seen at the upper portion of the left hand side indicating low proportion of recessive genes whereas parent 4 was seen on the upper portion of the right hand side indicating high proportion of recessive genes (Fig. 8B).

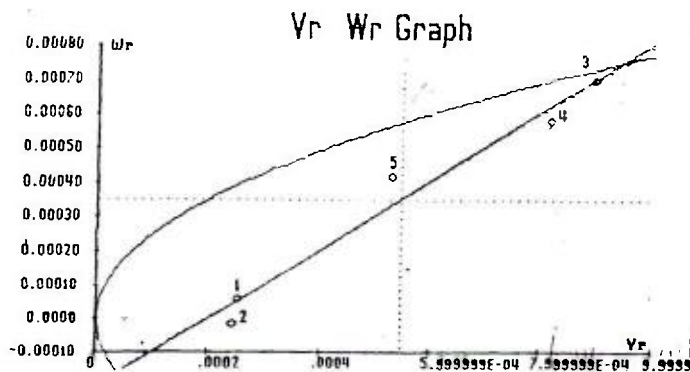


Fig. 4a. Cocoon shell weight (Oct - Nov.)

Fig. 4a. Poids de la coque (oct - nov.).

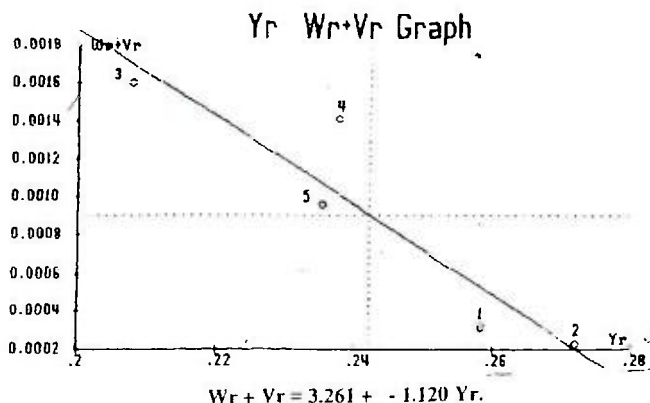


Fig. 4b. Cocoon shell weight (Oct - Nov.)

Fig. 4b. Poids de la coque (oct - nov.).

2) Estimates of genetic components:

The estimates of components of genetic variance along with their relative proportions for October - November and January - February were presented in Table II.

October - November:

The estimates of additive components (D) was significant ($P > 0.01$) for SCW and SSW. The estimates of dominants (H_1 and H_2) were significant for PUP and SSW.

The estimates of dominant components (H_1 and H_2) for PUP ($H_1=1230433.125$, $H_2=1312712.25$) and SSW ($H_1=0.000$ and $H_2=0.001$) were more than the additive components (D) which revealed

the presence of over dominance for the expression of the traits. The additive component (D) for SCW (0.011) was more than H_1 (0.003) and H_2 (0.004) revealing the predominance of additive gene effect.

In the ratio of h^2/H_2 for YIELD (0.516) more than one group of genes, for PUP (3.442) more than three groups, for SCW (6.026) more than six groups of genes and for SSW (5.553) more than five groups of genes were governing the traits for exhibiting dominance. Mather and Jinks (1971) suggested that complementary gene action might depress the h^2/H_2 ratio. Therefore, the number of groups of genes reported here might not be the actual number.

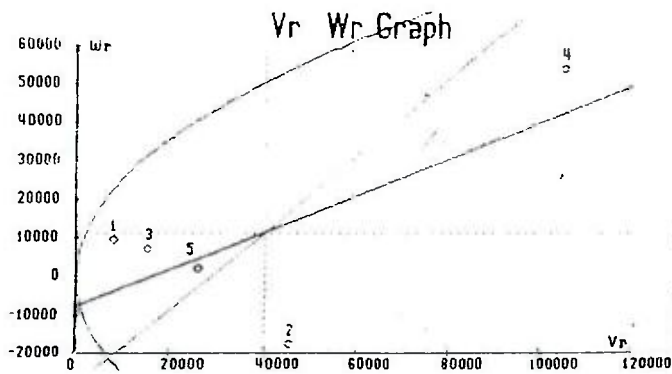


Fig. 5a. Pupation rate (Jan - Feb.)

Fig. 5a. Taux de nymphose (janv. - fev.)

$$Wr = -7930.75 + 0.475 Vr; t = 1.739; S.E. of b = 0.273; r = 0.708.$$

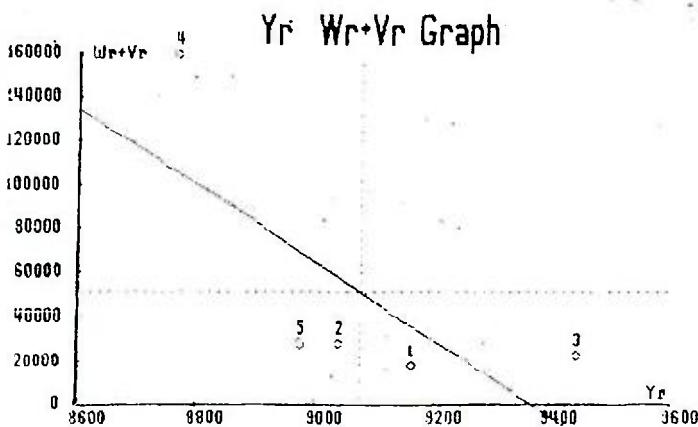


Fig. 5b. Pupation rate (Jan- Feb.)

Fig. 5b. Taux de nymphose (janv. - fev.).

$$Wr + Vr = 1156498 + - 123.008 Vr.$$

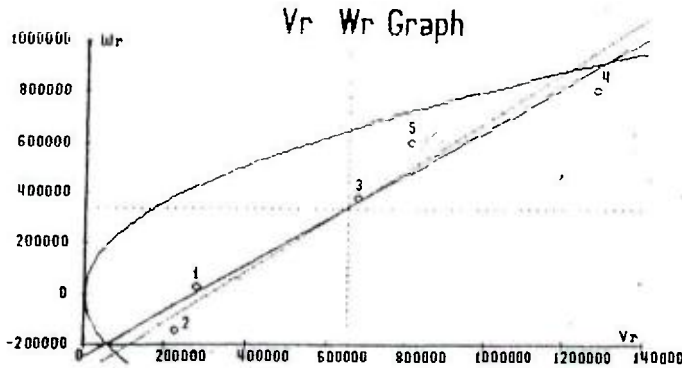


Fig 6a. Yield / 10 000 larvae (Jan. Feb.).

Fig. 6a. Rendement/10000 larves (janv - fev.)

$$Wr = -252936.2 + 0.904 Vr; t = 7.103; S E \text{ of } b = 0.127; r = 0.972.$$

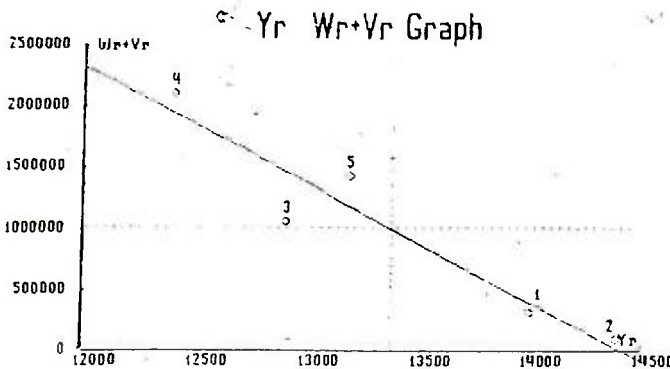


Fig. 6b. Yield / 10 000 larvae (Jan. - Feb.)

Fig. 6b. Rendement / 10 000 larves (janv. - fev).

$$Wr + Vr = 7321872 + -498.46 Yr$$

The average degree of dominance $(H_1/D)^{1/2}$ was more than unity for PUP, (17.009), Yield (1.304) and SSW (1.346) suggesting a higher proportion of over dominance. On the other hand, the degree of dominance was recorded less than unity for SCW (0.507) revealing partial dominance. The distribution of dominant and recessive alleles estimated by the ratio: $H_2/4H_1$ was close to 0.25 for Pup (0.267) and Yield (0.237) suggesting that there was symmetry in the allelic distribution. But there was a deviation from the expected value of 0.25 for other two traits such as, SCW (0.354), and SSW (0.372) indicating an asymmetrical distribution of positive and negative homozygotes among the parents.

The ratio KD/KR was showing less than unity for PUP (-0.068), YIELD (0.321), SCW (0.705) and SSW (-0.072) indicating excessive of recessive genes.

The "F" value was not significant for all the traits under study. Estimates of "E" were significant ($P \geq 0.01$) for all the traits.

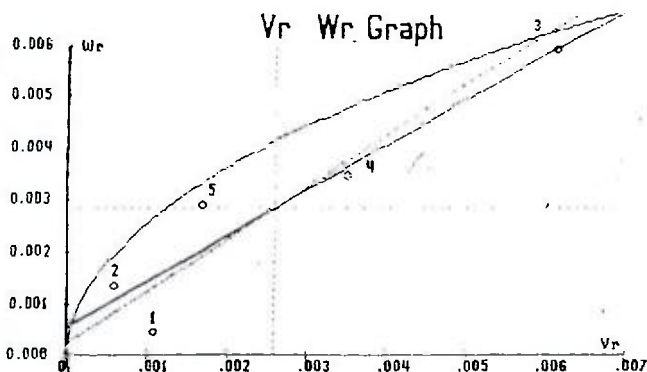


Fig 7a. Cocoon weight
(Jan - Feb.)

Fig 7a. Poids du cocon
(janv. - fev.).

$$W_r = 5.312 + 0.881 V_r; t = 4.970; S E \text{ of } b = 0.177; r = 0.944.$$

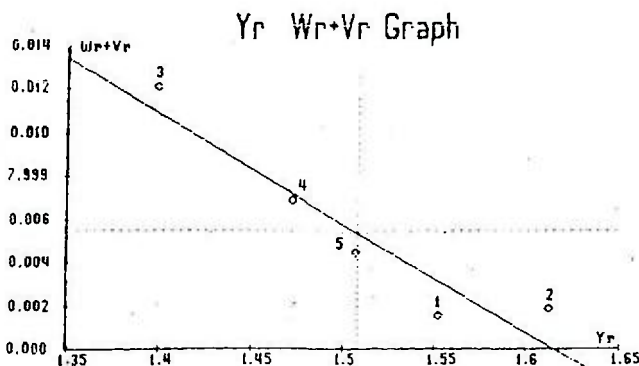


Fig 7b. Cocoon weight
(Jan -Feb)

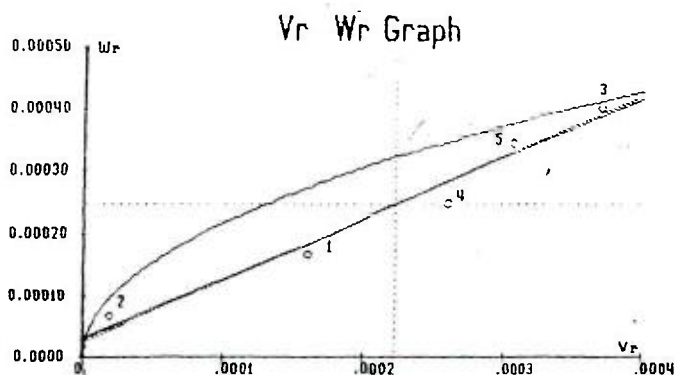
Fig 7b. Poids du cocon
(janv. - fev.).

$$W_r + V_r = 0.043 + - 2.676 Y_r.$$

Highest heritability in broad sense (bs) (83.9%) and in narrow sense (ns) (50.8%) was observed for SCW. This was followed by SSW- recorded to be 81.2% in broad sense and 34.7% in narrow sense.

January - February:

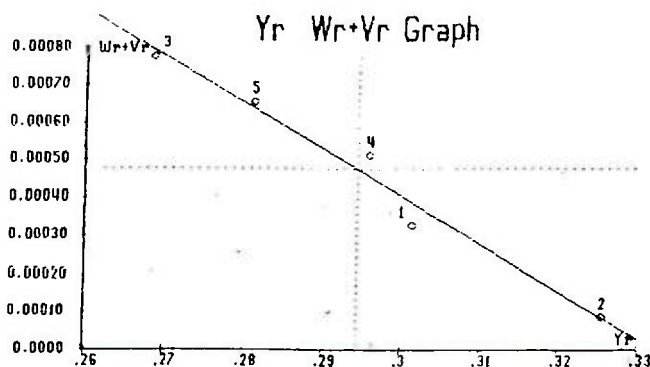
The estimates of additive components (D) (Table II) was significant ($P \geq 0.01$) for Yield, SCW and SSW whereas the estimates of dominant components: H_1 and H_2 was significant ($P \geq 0.01$) for yield.



$$W_r = 3.062 + 0.968 V_r; t = 9.389; S.E. of b = 0.103; r = 0.983.$$

Fig. 8a. Cocoon shell weight (Jan - Feb.)

Fig. 8a. Poids de la coque soyeuse (janv. - fev.).



$$W_r + V_r = 2.071 - 6.272 Y_r$$

Fig. 8b. Cocoon shell weight (Jan - Feb.)

Fig. 8b. Poids de la coque soyeuse (janv. - fev.).

The dominant components for yield ($H_1=1265070.0$ and $H_2=1336977.0$) was more than the additive components (406918.06) indicating presence of over dominance. In SCW the additive component ($D = 0.033$) was higher than dominant components ($H_1 = -0.003$ and $H_2 = -0.002$) revealing the predominance of additive effect.

The net dominance effect h^2 was significant ($P \geq 0.01$) for Pup, Yield, SCW and SSW suggesting positive direction of dominance for these characters. The average degree of dominance (H_1 / D)^{1/2} was more than unity for Pup (1.236), Yield (1.763), SCW (1.040) suggesting higher proportion of over dominance whereas for SSW it was less than unity (0.439) showing partial dominance.

The distribution of dominant and recessive alleles estimated by the ratio - $H_2 / 4H_1$ not close to 0.25 for PUP (0.163), SCW (0.170) and SSW (-0.103) suggesting as asymmetrical distribution of positive and negative alleles except Yield (0.264) which was nearer to 0.25 showing the symmetrical distribution of positive and negative alleles among the parents.

The ratio h^2/H_2 provided an estimate of number of groups of genes governing a particular trait and simultaneously exhibiting dominance. This ratio, for Yield, showed more than 4 groups of genes and for SSW more than 25 groups of genes were governing for the exhibition of dominance.

Table II. Estimates of Genetic Components during October & January.

Tableau II. Estimations des composants génétiques en octobre et janvier.

Component	Season	Pupation (%)	Yield/10000 lar.	Av. Coc. Wt.	Av. Shell Wt.
Composant	Saison	Nymphose (%)	Rendement / 10 000 larves	Pds moyen du cocon	Poids moyen de la coque
D	Oct-Nov	-4253.156	-2027766.75	0.110 **	0.00 **
	Jan-Feb	-14299.52	406918.06 **	0.033 **	0.00 **
F	Oct-Nov	-165631.297	-2716644.00	-0.002	-0.001
	Jan-Feb	-11336.56	-340299.47	-0.002	-0.00
H ₁	Oct-Nov	1230433.125 **	-3445731.00	0.003	0.000 **
	Jan-Feb	-21846.49	1265070.00 **	-0.003	-0.00
H ₂	Oct-Nov	1312712.25 **	-3266627.75	0.004	0.001 **
	Jan-Feb	-14233.193	1336977.00 **	-0.002	0.00
h ²	Oct-Nov	4518179.00 **	-1687201.50	0.024 **	0.003 **
	Jan-Feb	137208.42 **	4568810.50 **	0.006 **	0.001 **
E	Oct-Nov	288870.719 **	3233420.50 **	0.003 **	0.000 **
	Jan-Feb	76996.086 **	252746.73 **	0.003 **	0.00 **
h ² / H ₂	Oct-Nov	3.442	0.516	6.026	5.553
	Jan-Feb	-9.640	3.417	-2.658	24.828
(H ₁ / D) ^{1/2}	Oct-Nov	17.009	1.304	0.507	1.346
	Jan-Feb	1.236	1.763	1.040	0.439
H ₂ / 4H ₁	Oct-Nov	0.267	0.237	0.354	0.372
	Jan-Feb	0.163	0.264	0.170	-0.103
KD / KR	Oct-Nov	-0.068	0.321	0.705	-0.072
	Jan-Feb	0.514	0.617	0.449	0.010
Heritability / Héritabilité					
Narrow sense (ns)	Oct-Nov	0.042	0.315	0.508	0.347
Sens étroit (ns)	Jan-Feb.	0.009	0.249	0.447	0.354
Broad Sense (bs)	Oct-Nov	0.752	0.502	0.839	0.812
Sens large (bs)	Jan-Feb	0.305	0.753	0.607	0.668

** = Significant at 1% level. / Significatif au seuil de 1 %.

D = Additive components / Composants additifs.

H₁ & H₂ = Estimates of dominant components / Estimations des composants dominants.

h² = Net dominance effect / Effet de dominance nette.

F = Frequency of dominant and recessive alleles / Fréquence des allèles récessifs et dominants.

E = Expected environmental component of variation / Composant environnemental de variation attendu.

h²/H₂ = No. of groups of genes contributing to exhibit dominance / Nbre de groupes de gènes contribuant à présenter une dominance.

(H₁ / D)^{1/2} = Degree of dominance / Degré de dominance.

H₂ / 4H₁ = Proportions of genes with positive and negative effects / Proportions de gènes avec des effets positifs et négatifs.

KD / KR = Proportions of dominant and recessive genes / Proportions de gènes dominants et récessifs.

Table III. Estimates of Variance Components of Different Characters during October and January.

Tableau III. Estimations des composants de variance des différents caractères en octobre et janvier.

Source	Season	Pupation (%)	Yield/10 000 lar.	Average Cocoon weight	Average Shell weight
	Saison	Nymphose (%)	Rendement 10 000 larves	Poids moyen du cocon	Poids moyen de la coque
Var. gca.	Oct-Nov	19261.21 **	329901.46 **	0.003	0.000
	Jan-Feb	350.528 **	470855.32 **	0.001	0.000
Var. Sca.	Oct-Nov	651220.16 **	391266.25 **	0.004	0.000
	Jan-Feb	22829.226	685764.75 **	0.000	0.000
gca / Sca.	Oct-Nov	0.029	0.843	0.770	0.373
	Jan-Feb	0.015	0.248	1.402	1.346

** = Significant at 1% level. / Significatif au seuil de 1 %.

Table IV. Estimates of degree of dominance through graphic, component & combining ability analysis.

Tableau IV. Estimations du degré de dominance par l'analyse graphique, des composants et de la capacité combinatoire.

Traits	Season	Degree of dominance		Combining ability
		Graphic	Component	
Caractères	Saison	Degré de dominance		Capacité de combinaison
		Graphique -	Composants	(ρ^2_g / ρ^2_s)
Pupation rate	Oct - Nov.	OD	OD	0.029
Taux de nymphose	Jan-Feb	PD	OD	0.015
Yield / 10,000 larvae	Oct - Nov	PD	OD	0.840
Rendement / 10 000 larves	Jan - Feb.	OD	OD	0.250
Average cocoon weight	Oct - Nov.	PD	PD	0.770
Poids moyen du cocon	Jan - Feb.	PD	OD	1.400
Average shell wt.	Oct - Nov	OD	OD	0.370
Poids moyen de la coque	Jan - Feb.	PD	PD	1.400

OD : Over dominance / Sur-dominance. **PD:** Partial dominance / Dominance partielle.

Table V. Seasonal Variation in the Standardized deviation graph (Yr/ Wr+Vr) of diallel populations during Oct.-Nov.*Tableau V. Variation saisonnière dans le graphique de l'écart standardisé (Yr / Wr + Yr) des populations de diallèles en oct-nov.*

Name of the breed	PUP	Yield	SCW	SSW
<i>Nom de la lignée</i>	<i>Nymphose</i>	<i>Rendement</i>	<i>Poids d'un cocon</i>	<i>Poids d'une coque</i>
P5	HD	HR	HD	HD
NB18	LR	LD	HD	HD
JD6	HD	LD	LR	LR
SF19	LR	LD	LR	LR
KS(O)	LRD	LR	HR	LR

PUP = Pupation rate (%) / *Taux de nymphose (%)*, **Yield** = Yield / 10 000 larvae / *Rendement / 10 000 larves*.
SCW = Single cocoon weight / *Poids d'un cocon unique*. **SSW** = Single shell weight / *Poids d'une coque*.

Table VI. Seasonal variation in the standardized deviation graph (Yr/ Wr+Vr) of diallel populations during January – February.*Tableau VI. Variation saisonnière du graphique de l'écart standardisé (Yr / Wr + Yr) des populations de diallèles en janvier – février.*

Name of the breed	PUP	Yield	SCW	SSW
<i>Nom de la lignée</i>	<i>Nymphose</i>	<i>Rendement</i>	<i>Poids d'un cocon</i>	<i>Poids d'une coque</i>
P5	HD	HD	HD	HD
NB18	LD	HD	HD	HD
JD6	HD	LRD	LR	LR
SF19	LR	LR	LR	HD
KS(O)	LD	LR	HLD	LR

PUP = Pupation rate (%) / *Taux de nymphose (%)*, **YIELD** = Yield / 10 000 larvae / *Rendement / 10 000 larves*.
SCW = Single cocoon weight / *Poids d'un cocon*.

SSW = Single shell weight / *Poids de la coque*.

HD = High proportion of dominant genes / *Proportion élevée de gènes dominants*.

HR = High proportion of recessive genes / *Proportion élevée de gènes récessifs*.

LD = Low proportion of dominant genes / *Faible proportion de gènes dominants*.

HRD = High proportion of dominant and recessive genes / *Proportion élevée de gènes dominants et récessifs*.

LRD = Low proportion of recessive and dominant genes / *Faible proportion de gènes récessifs et dominants*.

HLD = High and low proportion of dominant genes / *Proportion élevée et faible de gènes dominants*.

HLR = High and low proportion of recessive genes / *Proportion élevée et faible de gènes récessifs*.

The ratio KD/KR for Pup (0.514), Yield (0.617), SCW (0.449) and SSW (0.01) was observed to be less than unity showing the presence of excessive recessive genes.

The "F" value was not significant for all the traits depicting the presence of ambi-directional dominance with increasing and decreasing effects appeared to be dominant and recessive to the same extent. The expected environmental component of variation (E) was significant ($P \geq 0.01$) for Pup, Yield, SCW and SSW.

Maximum heritability (narrow sense) was noticed for SSW (48.7%) followed by SCW (44.7%) and Yield (24.9%). The broad sense heritability was observed maximum in Yield (75.3%) followed by SSW (66.8%) and SCW (60.7%).

3) Combining ability:

Estimates of the variance components for different traits were presented in Table III. Comparison of the magnitude of the variance due to "gca to sca" revealed predominantly higher sca for all traits indicating the involvement of non-additive gene action for controlling the traits during October - November.

On the other hand, during January - February the estimates of variance due to "gca to sca" had indicated higher gca values for SCW (1.402) and SSW (1.346) showing the involvement of additive gene action for manifesting those traits. But for Pup (0.015) and Yield (0.248) the gca values were less than the unity and were thus showing the manifestation of non-additive gene action.

DISCUSSION

The present investigation was designed to study the genetic architecture of bivoltine silkworm breeds, *B. mori* L., through graphic approach, component analysis and combining ability studies.

The present study was conducted utilizing bivoltine strains during October - November and January - February seasons. Considerable variations in the gene interaction were experienced because of the variation in the genotypes and the environmental conditions.

Comparative performance of graphical analysis during October - November and January - February revealed that " t^2 " was not significant for all the traits in both the seasons. A review of the graphic analysis (V_r , W_r) indicated that the points of intersection of the W_r axis by the regression line was below the origin for Pup and SSW during October - November and Yield during January - February revealing over dominance type of gene action for those traits. The "b" value in the graphic analysis of genetic situation deviated considerably from unity for PUP ($P \geq 0.01$) during October - November. PUP, SCW and SSW ($P \geq 0.01$) during January - February has shown an epistatic interaction in the genetic control of the characters. On the other hand, the "b" value did not deviate significantly from the unit slope for SCW ($P \geq 0.01$) and SSW ($P \geq 0.05$) during October - November and Yield, SCW & SSW ($P \geq 0.01$) during January - February were revealing absence of non-allelic interaction. The standardized deviation graph for Yield in P5 during January - February showed high proportion of dominant genes whereas same breed for the same traits during October - November showed high proportion of recessive genes. Similar variations were observed in NB18 for Pup and Yield, JD6 for Yield, SF19 for Yield & SSW and KS(O) for SCW & SSW. Krishnaswami *et al.*, (1964) in *Bombyx mori* (L.), reported over dominance for egg viability, ERR, and SSW, complete dominance for SCW, partial dominance for SR%. Satenahalli *et al.*, (1989) registered partial dominance for larval duration, pupal duration and moth emergence and over-dominance for fecundity. Mukherjee *et al.*, (1994) noticed partial dominance for cocoon yield per 100 DFLS, shell wt. and SR% and over dominance for SCW.

The comprehensive study of the standardized deviation graphs (Table V & VI) further revealed that during October - November high proportion of dominant genes were carried by P5 for Pup, SCW & SSW; by NB18 for SCW & SSW and by JD6 for Pup. During January - February all the traits were

having high proportion of dominant genes in P5 and high proportion of dominant genes in NB18 for all the three parameters except Pup. In JD6 high proportion of dominant genes were observed for Pup. High proportions of dominant genes were noticed for SSW & SR% during January - February in SF19. High proportions of dominant genes were also observed for FL in KS (O) during both the seasons. Therefore, it can be said that P5, NB18 and JD6 should be given emphasis for hybridization programme.

Comparison of the estimates of genetic components revealed that non-significant F in both the seasons indicated the presence of ambi-directional dominant and recessive alleles with increasing and decreasing effects appeared to be dominant and recessive to the same extent.

The additive effect for a particular trait become more in particular season whereas the same breed when utilized in other seasons for the same trait dominance became more pronounced or turned to partial dominance (Table IV). Similarly, the ratios like, degree of dominance, distribution of dominant and recessive alleles, no. of gene groups, were also found to exhibit different results in different seasons. The traits like Pup and SSW (October - November) and Yield (January - February) were controlled by over dominance which might be, to a certain extent, be just an apparent case of inflated upwards. It could thus, be stated that the occurrence of any such genotype $\times$ environmental ($g \times e$) interaction might lead deviation of the values and this affected the estimate levels of dominance. Another reason stated by Mather and Jinks (1971) was unless $u = v = .05$ at each locus i.e., symmetry between dominant and recessive alleles, the ratio $-(H_1/D)^{1/2}$ would not be a true measure of degree of dominance. Further, Hayman (1954, b) proposed the method of estimating whether $u = v = 0.5$ or not. In case, $u = v = 0.05$, then the ratio $H_2/4H_1$ would be equal to 0.25. In the present study this ratio for some of the traits such as Pup, SCW and SSW during January - February were not equal to 0.25 indicating asymmetrical distribution of dominant and recessive genes in the population. One of the reasons for this asymmetrical distribution might be overestimation of degree of dominance in the component analysis.

Heritability in broad sense was found to be more than the narrow sense estimates, as usual. In both seasons, heritability (in narrow sense) was observed in SCW and SSW and comparatively low heritability was observed in Pup since it was influenced by environmental variation to a greater extent. These findings were quite in agreement with the findings of Petkov (1984 a), Nassrillae and Abbasov (1980) and Narasimharaju *et al.*, (1990) in *B. mori* L. Mather and Jinks (1971) proposed that complementary gene action might suppress the ratio h^2/H_2 which was a measure of number of gene groups that exhibited dominance. Hence the number of gene groups that were recorded here might not be the actual number. Such similar conclusions were also reached by Sengupta (1991) in tasar silkworm, Nagaraja and Govindan (1994) in eri silkworm, Sarkar *et al.*, (1991) and Mukherjee *et al.*, (1994) in *B. mori* L.

The magnitude of sca variance (Table IV) compared to gca for all the traits during October - November and SCW and SSW in January - February suggested predominant role of non-additive variance. Similar observations for various traits in *B. mori* L., were also reported by Pershad *et al.*, (1986), Datta and Pershad (1988) and Tayade (1989).

Further, the reasons for differences in revealing gene effects (Table IV) in two different seasons might be ascribed to the influence of environmental factors like temperature, relative humidity, air current, photoperiod and also mulberry leaves. These factors not only showed different gene actions but also laid a great impact on physiology of the silkworm causing variations in the quantitative as well as qualitative traits.

It could, therefore, be said that both additive and non-additive gene actions are equally important. The traditional system of developing hybrids was to exploit the non-additive components only. Hence, the breeds like P5, NB18, SF19 and KS (O) showing non-additive gene action in various traits should be considered for developing F₁ hybrids. At the same time, it would be desirable to use a breeding procedure to exploit the additive components also by initiating crosses for pedigree breeding.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are highly thankful to the Director of the Institute, Joint Director of Research & Co-ordination and Sectional in charge of Silkworm Breeding and Genetics Laboratory of CSR&TI, Berhampore (West Bengal), India, for extending all facilities. Due thanks are acknowledged to Mr. T. K. Maitra for meticulous processing of the manuscript.

REFERENCES

- AHLUWALIA M., SHANKAR K., JAIN S. K., JOSHI A. B. (1962) A diallel cross study of combining ability for quantitative characters in Pearl Millet-II. Tillering Height and Yielding ability. Indian J Genet 22(1): 45-63.
- ALLARD R. W. (1956) The analysis of genetic environmental interaction of diallel crosses. Genetics 3:305-318
- DALY K., ROBINSON D. S. (1969) Estimates of genetic parameters from hybrid derivative in *Nicotiana*. Genetics 62:201-203.
- DATTA R. K., PERSHAD G. D. (1988) Combining ability among multivoltine and bivoltine silkworm, *Bombyx mori* L., hybrids. Sericologia 28(1):21-29.
- DICKINSON A. G., JINKS J. L. (1956) A generalized analysis of diallel crosses. Genetics 41: 65-78.
- GAMO T., HIRABAYASHI T. (1983) Genetic analysis of growth rate, population rate and some quantitative characters by diallel crosses in the silkworm, *Bombyx mori* L. Jap J Breed 33:178-190.
- GRIFFING B. (1956) Concept of general and specific combining ability interaction to diallel crossing system. Aus. J. Biological Sci 9:463-493.
- HAYMAN B. I. (1954 a) The analysis of variance and diallel tables. Biometrics 10 : 235-244.
- HAYMAN B. I. (1954 b) The theory and analysis of diallel crosses. I Genetics 39:789-809.
- JINKS J. L. (1954) The analysis of continuous variation in a diallel cross of *Nicotiana rustica*. Genetics 39:767-788.
- JINKS J. L., HAYMAN B. I. (1953) The analysis of diallel crosses. Maize Genet coop News Lett 27: 48-54.
- JOHNSON L. P. V., AKSEL R. (1959) Inheritance of yielding capacity in a fifteen parent diallel cross of barley. Canad J. Genet cytol 1:208-265.
- KEARSEY M. J., JINKS J. K. (1968) A general method of detecting additive, dominance and epistatic variation for metric traits. I. theory. Heredity 23:403-410.
- KEMPTHORNE O. (1956) The theory of diallel crosses. Genet. 41:103-113.
- KRISHNASWAMI S. (1978) New technology of silkworm rearing. Bulletin 2, CSR&TI, Mysore. 1-10.
- KRISHNASWAMI S. (1979) Improved method of rearing young aged (chawki) Silkworm. Bulletin. 3., CSR & TI, Mysore 23.
- KRISHNASWAMI S., JOLLY M. S., SUBBA RAO G. (1964) Diallel analysis of quantitative characters in multivoltine races of silkworm. Indian J. Genet 24:213-222.
- LUPTON F. G. H. (1961) Studies in breeding of self - pollinated cereals 3. Further studies in Cross Predictions. Euphytica 10:209-224.
- MATHER K., JINKS J. L. (1971) Biometrical genetics. 3rd Edition, Chapman and Hall Ltd., London.
- MUKHERJEE P., RAINA S. K., PUROHIT C. K., SUMBLI S. N. (1994) Gene action studies in the multivoltine silkworm, *Bombyx mori* L. Sericologia 34(4):653-661.
- NAGARAJA M., GOVINDAN R. (1994) Genetic analysis of seed technological traits by diallel cross in the cri silkworm, *Samia cynthia ricini*, Biosduval. Sericologia 34(2):333-337.
- NARASIMHARAJU R., GOVINDAN R., ASOKAN J., RAYER S. G. (1990) Genetic variability for quantitative traits in silkworm, *Bombyx mori* L. Entomon. 15:197-201.
- NASASIRILLAIEV U. N., ABBASOV B. G. (1980) Ocenks additivnoi i neadditivnoi nasleduyemosti khozyaystvenno - cennykh prizna kovto tovogo shelko - pryada ma osnove polyallelnykh sparivaniy shelk. 91(4):10-11.

- PERSHAD G.D., DATTA R.K., BHARGAVA S.K., VIJAY KUMAR H.V., JOLLY M.S. (1986) Combining ability analysis in multivoltine races of *Bombyx mori* L. *Sericologia* 26:307-315.
- PETKOV N. (1981) Variability and correlation between some characteristic features of silkworm, *Bombyx mori* L. *Thivotnov Dnauki* 18(30):83-86.
- SARKAR A., DAS N.K., DAS B.C. (1991) A diallel cross analysis of the cocoon weight in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Sericologia* 31(2):301-306.
- SATENAHALLI S.B., GOVINDAN R., GOUD J.V., (1989) Genetic analysis of some quantitative traits by diallel cross in silkworm, *Bombyx mori* L. *Sericologia* 29(3):333-342.
- SENGUPTA A. K. (1991) Population variability and genetic architecture of *A. mylitta* D. Ph.D. thesis, Ranchi University. Ranchi, Bihar, India.
- SENGUPTA K., DATTA R. K., BISWAS S.N., (1974) Effect of multiple crossing on the population pattern of the progeny in silkworm. *Indian J Genet* 34 A (Sabrao Proc.):241-248.
- SIDDIQUI A.A., SENGUPTA A. K., KUMAR A., DAS MAHAPATRA D. P., SENGUPTA K. (1988) Studies on the genetic architecture and gene actions involving yield and yield components in diallel population of tropical tasar Silkworm, *A. mylitta* D. *Sericologia* 28(1):107-113.
- SINGH D. P., (1974) Diallel analysis of some quantitative characters in jute (*C. capsularis* L). *Indian J. Heredity* 6:(1&2):63-75.
- SUBBA RAO G., DAS N.K., DAS S. K. (1991) Genetic divergence among fifteen multivoltine genetic stocks of silkworms, *Bombyx mori* L. *Indian J. Seric* 30:72-74.
- TAYADE D.S. (1989) Genetic architecture of economic traits in some strains of mulberry silkworms, *Bombyx mori* L. 1. Combining ability analysis. *Sericologia* 29(1):43-60.
- VERHALEN L. M., MURRAY J. C. (1969) A diallel analysis of several fibre property traits in upland cotton, *Gossypium hirsutum*. *Crop sci* 9:311-315.
- WHITE HOUSE R.N.H., THOMPSON I.B., D O VALE ROBBERY M.A.M. (1958) Studies on the Breeding of Self-pollinating Cereals 2. The use of diallel cross Analysis in Yield prediction. *Euphytica* 147-169.

ETUDES GENETIQUES DE *BOMBYX MORI* L. PAR CROISEMENT DIALLELIQUE DANS DES ENVIRONNEMENTS VARIES

P. R. T. RAO, B. GHOSH, A. K. SENGUPTA, S. K. DAS & C. S. CHAKRABORTY*

Silkworm Breeding & Genetics Laboratory, Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore – 742 101, West Bengal, Inde.

*Nous avons procédé à des études de l'action des gènes chez **Bombyx mori** à partir de croisements dialléliques entre 5 lignées de vers à soie bivoltins génétiquement divergentes c'est à dire P5, NB18, JD6, SF19 et KS(O). Les parents et leurs combinaisons hybrides ont été soumis à une analyse des composants dialléliques et graphiques des variants et de la capacité de combinaison. L'analyse graphique révèle une action des gènes de type sur-dominant pour le taux de nymphose et le poids de la coque en octobre – novembre et pour le rendement en janvier – février. L'analyse révèle aussi une proportion élevée de gènes dominants chez les parents comme P5 et NB18.*

Cependant, les études de l'analyse des composants et de la capacité de combinaison montrent la prépondérance de la surdominance et d'une action génétique de type non-additive pour la plupart des caractères pendant les deux saisons. On devrait donc considérer P5 et NB18 pour commencer des croisements de lignage par pédigré. De plus, P5, NB18 et KS (O) peuvent aussi être soumis à une préparation d'hybrides F1.

INTRODUCTION

La connaissance de la nature de l'action des gènes et du nombre des gènes contrôlant l'expression des traits quantitatifs est d'une importance considérable pour le sélectionneur pour avoir un programme de lignage solide. Puisque chez le ver à soie *Bombyx mori* L., les traits quantitatifs sont gouvernés par des gènes multiples, leur hérédité est de nature complexe. Par le passé, Allard (1956) a rapporté les effets de l'environnement sur l'action des gènes avec les croisements dialléliques chez les haricots lima. On a aussi étudié de telles actions des gènes, dans des environnements variés chez le blé (White House et coll., 1958, Lumpton, 1961), le millet perle (Ahluwalia et coll., 1962) et le jute (Singh, 1974). Chez le ver à soie du mûrier, Krishnaswami et coll., 1964 ont rapporté une surdominance pour la viabilité des œufs, le taux effectif d'élevage (ERR) et le poids d'une coque (SSW). Sengupta et coll., (1974), Gamo et coll., (1983), Sarkar et coll., (1991), Sen (1992) et Mukherjee et coll., (1994) ont aussi rapporté des données dans ces domaines. Des études complètes ont été réalisées chez le ver à soie tasar par Siddiqui et coll., (1988 a) et par Sengupta (1991). Des études similaires ont été effectuées chez le ver à soie Eri par Nagaraja (1994).

Dans ce travail, nous avons entrepris une étude sur des lignées de ver à soie divergentes sur le plan génétique (Sen, 1992), recueillies et maintenues au *Central Sericultural Research and Training Institute*, à Berhampore (Bengale de l'ouest), en Inde pour envisager la base génétique des variations saisonnières pour certains traits quantitatifs importants sur le plan économique. Nous avons aussi

* Department of Zoology, University of North Bengal, Siliguri – 734 430, West Bengal, Inde.

étudié le mode d'action des gènes, en appliquant la méthode de croisement diallélique (graphique) et des composants de la variation génétique.

MATERIELS ET METHODES

Nous avons croisé cinq lignées de ver à soie bivoltin divergentes sur le plan génétique, c'est à dire P5, NB18, JD6, SF19 et KS(O) (Tableau I) d'une manière complètement diallélique (5×5) pour donner 25 combinaisons (y compris les parents et les réciproques). On élève les hybrides en suivant une CRD (conception complètement aléatoire). Les œufs pondus par les papillons femelles sur les cartons de ponte sont traités à l'acide dans une solution d'HCl de densité 1,075 à 46° C pendant 4 à 5 minutes pour terminer la diapause de manière à faciliter l'éclosion. On élève chaque combinaison à partir de 3 pontes saines dans trois plateaux différents chaque plateau contenant une répétition. Après la 2^{ème} mue, on nourrit 300 vers 4 fois par jour avec des feuilles de mûrier fraîches de la variété S1. On réalise les élevages d'après la technique habituelle (Krishnaswami 1978, 1979) pendant octobre – novembre et janvier – février deux années consécutives.

On enregistre les observations pour quatre traits quantitatifs importants, c'est à dire le taux de nymphose en pourcentage (PUP), le rendement / 10 000 larves en kg (rendement), le poids d'un cocon en grammes (SCW) et le poids d'une coque en grammes (SSW).

On analyse les données en utilisant la méthode graphique de croisements dialléliques mise au point par Jinks et Hayman (1953) et étendue au matériel hétérogène par Dickinson et Jinks (1956). Ici, Vr est la variance de la descendance du r^{ieme} arrangement parental et Wr est la covariance de la descendance dans cet arrangement avec le parent non-récurent. La pente de la droite de régression – “ b ”, la position du graphique $Vr - Wr$ et la distribution des points d'arrangement fournissent une base pour arriver à une conclusion concernant l'architecture génétique des caractères étudiés. La parabole limite à l'intérieur de laquelle tous les points doivent être situés a été obtenue en utilisant la relation $Wr^2 = Vp - Vr$ où Vp est la variance des moyennes parentales. On procède au test de signification de la régression dans les axes zéro avec le test “ t ”. On calcule les valeurs de t^2 pour chaque caractère à partir des valeurs Wr et Vr et on teste leur signification contre la valeur “ F ” au niveau désiré de probabilité. Des valeurs significatives pour “ t^2 ” indiquent l'échec d'une ou plusieurs affirmations. On construit et on interprète le graphique de l'écart type pour chaque caractère selon Hayman (1954, b ; 1958). Dans les coordonnées $Wr + Vr$ et Yr , les parents du premier quadrant (++) (partie supérieure du côté droit) montrent une performance supérieure associée à des gènes récessifs (non-efficaces). Les parents dans le deuxième quart (+, -) (partie supérieure du côté gauche) présentent une performance parentale inférieure associée à des gènes récessifs. Les parents situés dans le troisième quart (-, -) (partie inférieure du côté gauche) présentent l'association d'une performance parentale inférieure avec les gènes dominants et en dernier lieu, ceux du quatrième quart (-, +) (partie inférieure du côté droit) présentent l'association de gènes dominants (la plupart efficaces) avec une performance parentale plus élevée.

On analyse les composants génétiques de la variance et l'analyse graphique avec la méthode de Jinks et Hayman (1953) et de Hayman (1954 a, 1954 b). On calcule la capacité de combinaison [capacité de combinaison générale (*gca*) et la capacité de combinaison spécifique (*sca*)] en utilisant la formule obtenue par Griffing (1956).

RESULTATS

1) Analyse graphique de la population diallélique :

On réalise l'analyse graphique de la population diallélique des lignées bivoltines pour des caractères quantitatifs importants (PUP, rendement, SCW, SSW) (Jinks 1954).

La régression linéaire de Wr (covariance entre les parents et leur descendance) sur la parabole de limitation de Vr (variance des parents) et la distribution des points parentaux autour de la ligne de

régression sont présentées de manière graphique dans les Fig. 1A à 4B. Pour déterminer si la dominance est due à des gènes positifs ou négatifs, on dessine un graphique de l'écart type pour l'effet parental (Y_r) et l'ordre parental de dominance $Y_r / W_r + V_r$ d'après la méthode décrite par Hayman (1954b) et Johnson et Aksel (1959). On teste la validité de l'affirmation de diallélisme par t^2 (Hayman, 1954, a) qui n'est pas significatif pour tous les caractères quantitatifs pendant les deux saisons, c'est à dire octobre – novembre et janvier – février. Cela montre que la plupart des affirmations sont vérifiées, ce qui permet l'utilisation de la méthode de Hayman pour l'interprétation de la covariance de l'arrangement (W_r) sur la variance de l'arrangement (V_r).

Octobre – novembre :

T^2 n'est pas significatif pour tous les caractères. Le coefficient de corrélation (r) est significatif et positif pour tous les caractères. Y est négatif pour PUP et SSW. La pente b est positive pour tous les traits.

PUP :

Ici, la droite de régression passe en-dessous de l'origine de l'axe W_r , ce qui montre la sur-dominance (fig. 1A). Dans le graphique $Y_r / W_r + V_r$, les parents 1 (P5) et 3 (JD6) présentent une proportion élevée de gènes dominants tandis qu'on voit que les parents 2 (NB18) et 4 (SF19) présentent une faible proportion de gènes récessifs. Le parent 5 (KS-O) a un nombre égal de gènes dominants et récessifs mais en faible proportion (Fig. 1B).

Rendement :

Dans le graphique $V_r W_r$, la droite de régression passe au-dessus de l'origine et indique donc une dominance partielle (Fig. 2A). Dans le graphique $Y_r / W_r + V_r$, les parents 1 sont placés dans la partie supérieure du côté droit, ce qui révèle une proportion élevée de gènes récessifs tandis qu'on voit les parents 3 et 5 dans la partie supérieure du côté gauche, ce qui montre une faible proportion de gènes récessifs. Les parents 4 et 2 sont dans la partie la plus basse du côté gauche, ce qui indique une faible proportion de gènes dominants (Fig. 2B).

SCW :

La droite de régression dans le graphique $W_r V_r$ passe au-dessus de l'origine, ce qui montre une dominance partielle (Fig. 3A). Dans le graphique de l'écart type, les parents 1 et 2 ont une proportion élevée de gènes dominants et le parent 5 contient une proportion élevée de gènes récessifs. Les parents 3 et 4 présentent une faible proportion de gènes récessifs ($r = -0,979$) (Fig. 3B).

SSW :

La ligne de régression sur le graphique $W_r V_r$ passe en dessous de l'origine et montre ainsi une surdominance ($P \geq 0.05$) (fig. 4a). Le graphique $Y_r / W_r + V_r$ montre que les parents 1 et 2 contiennent une proportion élevée de gènes positifs dominants et les parents 3, 4 et 5 contiennent une faible proportion de gènes récessifs (Fig. 4b).

Janvier – février :

Ici aussi, t^2 n'est pas significatif pour tous les caractères étudiés et ainsi la validité de l'hypothèse est vérifiée. Le coefficient de corrélation est positivement significatif ($P > 0,01$) pour tous les traits.

PUP :

On enregistre une dominance partielle alors que la ligne de régression passe au-dessus de l'origine (Fig. 5A). Dans le graphique $Y_r / W_r + V_r$, on voit les parents 1 et 3 occuper la partie la plus basse du coin droit, ce qui révèle une proportion élevée de gènes dominants. Les parents 2 et 5 sont placés dans la partie la plus basse du côté gauche, ce qui indique une faible proportion de gènes dominants.

D'autre part, le parent 4 est dans la partie supérieure du côté gauche ce qui correspond à une faible proportion de gènes récessifs (Fig. 5B).

Rendement :

Dans ce cas, on enregistre une action des gènes surdominants puisque la ligne de régression passe juste en-dessous de l'axe W_r (Fig. 6A). Dans le graphique $Y_r / W_r + V_r$, la droite de régression est négativement corrélée ($r = -0,945$). Ici, les parents 1 et 2 possèdent une proportion élevée de gènes positifs dominants. Les parents 4 et 5 contiennent une plus faible proportion de gènes récessifs tandis que le parent 3 a une quantité égale d'une faible proportion de gènes dominants et récessifs (Fig. 6B).

SCW :

Dans le graphique $W_r V_r$, la droite de régression passe au-dessus de l'origine de l'axe W_r , ce qui montre une dominance partielle (Fig. 7A). Le graphique de l'écart type montre que les parents 1 et 2 présentent une proportion élevée de gènes dominants positifs. Dans la figure 7(B), les parents 3 et 4 sont dans la partie supérieure du côté gauche, ce qui indique une faible proportion de gènes récessifs tandis que le parent 5 est entre la partie droite et gauche sur la moitié inférieure, ce qui indique une quantité égale d'une proportion élevée de gènes récessifs et dominants ($r = -0,951$).

SSW :

On enregistre une dominance partielle puisque la droite de régression rejoint l'axe W_r au-dessus de l'origine (Fig. 8A). Dans le graphique de l'écart type, les parents 1 et 2 sont placés dans la moitié inférieure droite, ce qui montre une proportion élevée de gènes dominants. Les parents 3 et 5 sont dans la partie supérieure du côté gauche, ce qui indique une faible proportion de gènes récessifs tandis que le parent 4 est dans la partie supérieure du côté droit, ce qui indique une proportion élevée de gènes récessifs (Fig. 8B).

2) Estimations des composants génétiques :

Les estimations des composants de la variance génétique et de leurs proportions relatives pour octobre – novembre et janvier – février sont présentées dans le Tableau II.

Octobre – novembre :

Les estimations des composants additifs (D) sont significatives ($P > 0,01$) pour SCW et SSW. Les estimations des composants dominants (H_1 et H_2) sont significatives pour PUP et SSW. Les estimations des composants dominants (H_1 et H_2) pour PUP ($H_1 = 1230433,125$; $H_2 = 1312712,25$) et SSW ($H_1 = 0,000$ et $H_2 = 0,001$) sont plus importantes que les composants additifs (D), ce qui révèle la présence d'une surdominance pour l'expression des caractères. Le composant additif (D) pour SCW (0,011) est supérieur à H_1 (0,003) et H_2 (0,004), ce qui révèle la prédominance de l'effet du gène additif.

Dans le ratio de h^2 / H_2 pour le rendement (0,516) plus d'un groupe de gènes, pour PUP (3,442) plus de trois groupes, pour SCW (6,026) plus de six groupes de gènes et pour SSW (5,553), plus de cinq groupes de gènes gouvernent les traits pour exprimer la dominance. Mather et Jinks (1971) ont suggéré que l'action des gènes complémentaires pourrait faire baisser le ratio h^2 / H_2 . Le nombre de groupes de gènes rapporté ici pourrait donc ne pas être le nombre réel.

Le degré moyen de dominance (H_1/D)^{1/2} est supérieur à l'unité pour PUP (17,009), le rendement (1,304) et SSW (1,346), ce qui suggère une proportion supérieure de surdominance. D'autre part, on enregistre un degré de dominance inférieur à l'unité pour SCW (0,507), ce qui révèle une dominance partielle. La distribution des allèles dominants et récessifs estimée par le ratio : $H_2 / 4H_1$ est proche de 0,25 pour PUP (0,267) et le rendement (0,237), ce qui suggère qu'il y a une symétrie dans la distribution des allèles. Mais, il y a une déviation à partir de la valeur attendue de 0,25 pour les deux

autres traits tels que SCW (0,354) et SSW (0,372), ce qui indique une distribution asymétrique des homozygotes positifs et négatifs parmi les parents.

Le ratio KD/KR est inférieur à l'unité pour PUP (-0,068), le rendement (0,321), SCW (0,705) et SSW (-0,072), ce qui indique un excès de gènes récessifs.

La valeur "F" n'est pas significative pour tous les caractères étudiés. Les estimations de "E" sont significatives ($P \geq 0,01$) pour tous les traits.

On observe l'héritabilité la plus élevée au sens large (bs) (83,9 %) et au sens restreint (ns) (50,8 %) pour SCW. Cela est suivi par SSW, enregistré à 81,2 % au sens large et 34,7 % au sens restreint.

Janvier – février :

Les estimations des composants additifs (D) (Tableau II) sont significatives ($P \geq 0,01$) pour le rendement, SCW et SSW tandis que les estimations des composants dominants : H1 et H2 sont significatives ($P \geq 0,01$) pour le rendement.

Les composants dominants pour le rendement ($H1 = 1265070,0$ et $H2 = 1336977,0$) sont plus élevés que les composants additifs (406918,06), ce qui indique la présence d'une surdominance. Pour SCW, le composant additif ($D = 0,033$) est plus élevé que les composants dominants ($H1 = -0,003$ et $H2 = -0,002$), ce qui révèle la prédominance de l'effet additif.

L'effet de dominance net h^2 est significatif ($P \geq 0,01$) pour PUP, le rendement, SCW et SSW, ce qui suggère une direction positive de la dominance pour ces caractères. Le degré moyen de dominance ($H1 / D$)^{1/2} est supérieur à l'unité pour PUP (1,236), le rendement (1,763), SCW (1,040), ce qui suggère une proportion supérieure de surdominance tandis que pour SSW, il est inférieur à l'unité (0,439), ce qui montre une dominance partielle.

La distribution des allèles dominants et récessifs estimée d'après le ratio - $H2 / 4H1$ non proche de 0,25 pour PUP (0,163), SCW (0,170) et SSW (-0,103), suggère une distribution asymétrique des allèles positifs et négatifs sauf pour le rendement (0,264) qui est plus proche de 0,25, ce qui montre une distribution symétrique des allèles positifs et négatifs parmi les parents.

Le ratio $h^2/H2$ donne une estimation du nombre de groupes de gènes gouvernant un caractère particulier et présentant simultanément une dominance. Ce ratio, pour le rendement, donne plus de 4 groupes de gènes et pour SSW plus de 25 groupes qui gouvernent la dominance.

On observe que le ratio KD / KR pour PUP (0,514), le rendement (0,617), SCW (0,449) et SSW (0,01) est inférieur à l'unité, ce qui montre la présence en excès de gènes récessifs.

La valeur "F" n'est pas significative pour tous les caractères, ce qui révèle la présence d'une dominance ambi-directionnelle avec des effets d'augmentation et de baisse qui apparaissent être dominants et récessifs au même degré. Le composant de variation environnementale attendu (E) est significatif ($P \geq 0,01$) pour PUP, le rendement, SCW et SSW).

On remarque l'héritabilité maximum (au sens étroit) pour SSW (48,7 %) suivie par SCW (44,7 %) et le rendement (24,9 %). On observe l'héritabilité maximum au sens large pour le rendement (75,3 %) suivie par SSW (66,8 %) et SCW (60,7 %).

3) Capacité de combinaison :

Les estimations des composants de variance pour les différents traits sont présentées dans le Tableau III. La comparaison de l'amplitude de la variance due à "gca vers sca" révèle principalement une sca supérieure pour tous les traits, ce qui indique l'implication d'une action des gènes non additifs pour contrôler les traits pendant octobre – novembre.

D'autre part, pendant janvier – février, les estimations de variance dues à "gca vers sca" indiquent des valeurs gca plus élevées pour SCW (1,402) et SSW (1,346), ce qui montre l'implication d'une action des gènes additifs pour manifester ces traits. Mais pour PUP (0,015) et le rendement (0,248), les valeurs gca sont inférieures à l'unité et montrent ainsi la manifestation d'une action génétique non-additive.

DISCUSSION

Ce travail a été conçu pour étudier l'architecture génétique de lignées de vers à soie bivoltins, *B. mori* L. par une approche graphique, une analyse des composants et des études de la capacité de combinaison.

Cette étude a été réalisée en utilisant des souches bivoltines pendant les saisons d'octobre à novembre et de janvier à février. On observe des variations considérables dans l'interaction des gènes en raison de la variation des génotypes et des conditions environnementales.

La performance comparative de l'analyse graphique pendant octobre – novembre et janvier – février révèle que " t^2 " n'est pas significatif pour tous les caractères pendant les deux saisons. Une étude de l'analyse graphique (Vr , Wr) indique que les points d'intersection de l'axe Wr par la ligne de régression sont en-dessous de l'origine pour PUP et SSW pendant octobre-novembre et pour le rendement pendant janvier – février, ce qui révèle une action génétique de type surdominante pour ces traits. La valeur " b " dans l'analyse graphique de la situation génétique s'écarte considérablement de l'unité pour PUP ($P \geq 0,01$) pendant octobre – novembre. PUP, SCW et SSW ($P \geq 0,01$) pendant janvier – février ont montré une interaction épistatique dans le contrôle génétique des caractères. D'autre part, la valeur " b " ne s'écarte pas de manière significative de la pente unitaire pour SCW ($P \geq 0,01$) et pour SSW ($P \geq 0,05$) pendant octobre – novembre et pour le rendement, SCW et SSW ($P \geq 0,01$) pendant janvier – février, ce qui révèle l'absence d'une interaction non-allélique. Le graphique de l'écart type pour le rendement en P5 pendant janvier – février montre une proportion élevée de gènes dominants tandis que chez la même lignée pour les mêmes traits pendant octobre – novembre il montre une proportion élevée de gènes récessifs. On observe des variations similaires chez NB18 pour PUP et pour le rendement, chez JD6 pour le rendement, chez SF19 pour le rendement et SSW et chez KS(O) pour SCW et SSW. Krishnaswami et coll., (1964) chez *Bombyx mori* (L.) ont rapporté une surdominance pour la viabilité des œufs, l'ERR et SSW, une dominance complète pour SCW, une dominance partielle pour la richesse soyeuse. Satenahalli et coll., (1989) ont enregistré une dominance partielle pour la durée larvaire, la durée nymphale et l'émergence des papillons et une sur-dominance pour la fécondité. Mukherjee et coll., (1994) ont remarqué une dominance partielle pour le rendement en cocons, le poids de la coque et la richesse soyeuse et une surdominance pour SCW.

L'étude globale des graphiques de l'écart type (Tableaux V et VI) révèle également que pendant octobre – novembre, P5 présente une proportion élevée de gènes dominants pour PUP, SCW et SSW ; NB18 pour SCW et SSW et JD6 pour PUP. Pendant janvier – février, tous les caractères présentent une proportion élevée de gènes dominants chez P5 et une proportion élevée de gènes dominants chez NB18 pour les trois paramètres sauf PUP. Chez JD6, on obtient une proportion élevée de gènes dominants pour PUP. En janvier – février, tous les caractères ont une proportion élevée de gènes dominants chez P5 et une proportion élevée de gènes dominants chez NB18 pour les trois paramètres sauf PUP. Chez JD6, il y a une proportion élevée de gènes dominants pour PUP. On remarque des proportions élevées de gènes dominants pour SSW et la richesse soyeuse pendant janvier – février chez SF19. On observe des proportions élevées de gènes dominants pour FL chez KS (O) pendant les deux saisons. On peut donc dire qu'il faut mettre l'accent sur P5, NB18 et JD6 dans les programmes d'hybridation.

La comparaison des estimations des composants génétiques révèle que lorsque F n'est pas significatif pendant les deux saisons, cela indique la présence d'allèles dominants et récessifs ambi-directionnels avec des effets d'augmentation et de baisse qui semblent être dominants et récessifs au même degré.

L'effet additif pour un trait particulier devient plus important pendant une saison particulière tandis que quand on utilise la même lignée pendant d'autres saisons pour le même trait, la dominance devient plus prononcée ou devient partielle (Tableau IV). De même, on trouve que les ratios comme le degré de dominance, la distribution des allèles dominants et récessifs, le nombre de groupes de

gènes donnent des résultats différents pendant des saisons différentes. Les traits comme PUP et SSW (octobre – novembre) et le rendement (janvier – février) sont contrôlés par la surdominance qui pourrait être, à un certain degré, un cas apparent d'inflation vers le haut. On peut donc affirmer que la présence de n'importe quelle interaction génotype $\times$ environnement ($g \times e$) pourrait entraîner l'écart de ces valeurs et cela a un effet sur les niveaux estimés de dominance. Une autre raison proposée par Mather et Jinks (1971) est qu'à moins que $u = v = 0,05$ sur chaque site c'est à dire une symétrie entre les allèles dominants et récessifs, le ratio $(H1/D)^{1/2}$ ne serait pas une vraie mesure du degré de dominance. De plus, Hayman (1954b) a proposé d'estimer si $u = v = 0,5$ ou non. Dans le cas où $u = v = 0,05$ alors le ratio $H2 / 4H1$ serait égal à 0,25. Dans cette étude, le ratio pour certains de ces traits tels que PUP, SCW et SSW pendant janvier – février n'est pas égal à 0,25, ce qui indique une distribution asymétrique des gènes dominants et récessifs dans la population. Une des raisons de cette distribution asymétrique pourrait être la surestimation du degré de dominance dans l'analyse des composants.

L'héritabilité au sens large s'avère être plus importante que les estimations au sens étroit, comme d'habitude. Pendant les deux saisons, on observe une héritabilité (au sens étroit) pour le SCW et SSW et une héritabilité comparativement faible pour PUP puisqu'elle est influencée par la variation environnementale à un haut degré. Ces observations sont en accord avec celles de Petkov (1984a), Nassrillae et Abbasov (1980) et Narasimharaju et coll., (1990) chez *B. mori* L. Mather et Jinks (1971) ont suggéré que l'action complémentaire des gènes pourrait supprimer le ratio $h^2 / H2$, qui est une mesure du nombre des groupes de gènes qui présentent une dominance. Ainsi, le nombre de groupes de gènes que l'on enregistre ici pourrait ne pas être le nombre réel. Sengupta a aussi abouti à des conclusions similaires (1991) chez le ver à soie tasar, Nagaraja et Govindan (1994) chez le ver à soie Eri, et Sarkar et coll., (1991) et Mukherjee et coll., (1994) chez *B. mori* L.

L'amplitude de la variance *sca* (Tableau IV) comparée à celle de la *gca* pour tous les traits pendant octobre – novembre et SCW et SSW en janvier – février suggère un rôle prédominant de la variance non-additive. Pershad et coll., (1986), ont rapporté des observations similaires pour des caractères variés chez *B. mori* L. ainsi que Datta et Pershad (1988) et Tayade (1989).

De plus, les raisons des différences de révélation des effets des gènes (Tableau IV) pendant deux saisons différentes pourraient être dues à l'influence de facteurs environnementaux comme la température, l'humidité relative, les courants d'air, la photopériode et aussi les feuilles de mûrier. Ces facteurs conduiraient non seulement à des actions différentes des gènes mais ils ont aussi un grand impact sur la physiologie du ver à soie, ce qui entraîne des variations des caractères quantitatifs et qualitatifs.

On pourrait donc dire que les actions additives et non additives des gènes sont aussi importantes. Le système traditionnel de mise au point d'hybrides était destiné à n'exploiter que les composants non additifs. Ainsi, les lignées comme P5, NB18, SF19 et KS (O) qui présentent une action non additive des gènes pour des caractères variés devraient être considérées pour mettre au point des hybrides F1. Parallèlement, il serait souhaitable d'utiliser une procédure de lignage pour exploiter aussi les composants additifs en commençant des croisements pour un lignage par pédigré.

COMPARISON OF IN-BETWEEN INDIVIDUALS MULTI-TRAIT SELECTION METHODS

H. GREISS¹, N. PETKOV², K. BOYCHEV², G. DIMOV² & Z. PETKOV²

1. Agromier Co. 9 Malek el Afdal str. Zamalek, Cairo 11211 Egypt.

2. Institute of Animal Sciences, Kostinbrod, Bulgaria.

Multiple trait selection for cocoon weight, shell weight and shell ratio by selection index and independent culling (using computer), versus three experienced silkworm breeders were tested for the choice of selected parents in three populations of mono and bi-voltine silkworm pure breeds representing Chinese, European and Japanese races. No significance was found in the average selection index between breeders and computer. Interaction effects of selection method by race, by breed and by sex on selection efficiency were non-significant. The computer was considered as an easy and fast tool that can save the breeders' time and allows mass selection to be conducted at a large scale by less experienced personnel for taking the appropriate decisions.

Keywords: Selection, Independent culling, Computer, Skew, Kurt.

INTRODUCTION

Most researchers are concentrating on exploiting heterotic effect in hybrid silkworms from inbred lines thus dominance was the main attributing factor, and dominance is not heritable (Falconer, 1981).

However, very little was performed on the mass selection methods for improving the parent breeds by the additive effect that is heritable (Falconer, 1981; Van Vleck *et al.*, 1983). Most breeders use their long experience for selecting and choosing the individuals that should mate for obtaining the next generation.

Japan was the first country to have the concept of producing high quality bi-voltine silk from commercial hybrids. In fact, breeding in Japan first began in 1911 by demonstrating the superiority of the F₁ hybrids over the pure parents (Yokoyama, 1957). Also, (Mano *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1994) stated that Chinese and Japanese breeders have already achieved a remarkable progress in the improvement of the quantitative and qualitative traits of economic value in the silkworm *Bombyx mori* L. In recent years, new silkworm *B. mori* races and hybrids with higher productivity have been selected in different countries (Petkov, 1995; Petkov & Nacheva, 1996; Petkov *et al.*, 1999). However, these highly productive races need excellent feeding and rearing conditions in order to manifest, in full extent, their potential (Datta *et al.*, 1999). On the other hand, the non sufficient feeding of the parental pure races larvae causes a decrease of the length and weight of the ovaria, also of the weight and quality of the laid eggs and which influences the next generation larvae by a significant decrease of their weight (Mathavan *et al.*, 1987; Paul & Deb, 1993).

Lerner (1958) stated that high heritability as well as high genetic advance indicates a possible operation of additive gene action. Traits with such characteristics respond better to simple phenotypic selection than those having low heritability and low genetic advance. Therefore individual selection has to be resorted for obtaining results in the desirable direction.

Heritability estimates for various quantitative traits in *B. mori* reveal higher values for filament length (Chatterjee *et al.*, 1990), cocoon weight - 73.60% (Yan, 1983), cocoon shell weight - 80.20%

(Tsuchiya & Kurushima, 1956) and cocoon shell ratio - 72.40% (Singh & Singh 1983). Low and extremely low heritability values for pupation (28.00%) and reelability (19.00%) were determined (Gamo & Hirabiashi 1983) indicating that for these characters efficiency of selection is of little importance, because here most of variation is not transmittable over the generations.

Lea (1993), Singh *et al.*, (1998); Van Vleck *et al.*, (1983) stated that there are two principal methods for selection:

1) Pedigree selection: useful when genotype is well known, and is an extension of performance testing to evaluate related genotypes.

2) Mass selection, which has three subgroups.

Tandem selection (directional): selection is directed for improvement of one trait. When the goal is achieved, then selection is directed for another trait. In this case, traits are selected one after another. It is highly inefficient.

Independent culling selection: few traits are considered at a time, for each trait a minimum standard is set. If any genotype is exceptionally good in one trait but bad in another parameter, it is rejected.

Simultaneous (Index) evaluation: several methods are being adopted like modified base index (Baker, 1986), restricted selection index (Tallis, 1962), weight free index for ranking genotypes (Elston, 1962) are some of them and were proposed in practice. Index selection is more efficient than tandem selection for improving genotypes for negatively correlated characters (Baker, 1986).

This study has the objective of establishing an easy and fast method for multitrait mass selection. Less advanced sericultural countries that do not have the experienced staff and breeders can utilize this method too.

MATERIAL AND METHODS

Experiments were held in the Agromier Co. SAE mulberry plantation and rearing houses located in Asyuta province of Egypt 320 km south of Cairo, in a desert area during the period during 1999-2000. The plantation is irrigated by water from the river Nile regularly at the plants needs, as there are no rains in this area. Total salinity of irrigating water is 300 ppm.

Mulberry plantation is mainly of *Morus alba* var. Kokuso 27, *Morus alba* var. Canva 2, shaped in bush type and pruned in fist form after 3 step up branch harvests every year. Soil is sandy loam, consisting of 51.4% silt, 8.8% clay and 39.8% sand. Soil pH is 8.1. The underground water table is below 3 meters. Moisture content at field capacity is 24%.

Breeds were representing different geographical racial origins: 3 Chinese, 3 Japanese and 3 European breeds. All were bred and selected in AGROMIER germ bank (Table I).

Optimum rearing conditions were maintained to the parent population (Ajuzawa, 1972) and the new technologic improvements as mentioned in Greiss *et al.*, (2001) as following:

1. Application of 2^{ry} macronutrients (Ca₂₃₀, S₅₀ & Mg₅₅) and micro-nutrients (Mn₃, Fe_{4.5}, Zn_{3.5}, Cu_{0.4}, B_{0.5}, Mo_{0.54} & Cl₂₀₀) to mulberry garden beside the 1^{ry} macronutrients (N₃₀₀P₁₅₀K₁₂₀) and adding Farm Yard Manure (15ton) only for young instar rearing garden.

2. Double disinfecting by bleaching powder 5% weight / volume and acetic acid 0.2% for house and appliances.

3. Eggs disinfecting by acetic acid 0.04% for 15 min. at room temperature.

4. Bed & larval disinfecting by calcium oxide 88%, bleaching powder 10%, benzoic acid 1% and diathane M 45 at 1% dusting after every moult.

5. Rearing temperature at 23°C, light intensity 25 Lux all over the larval period. Air speed and relative humidity at 0.1m/sec & 85% for young instars and 0.3m/sec & 70% for late instars respectively. During moulting the humidity was reduced to 50% RH in all instars, and in the case of young instar larvae, nylon covers were removed from the beds.

6. Natural mounting and spinning at 27°C, light intensity 25 Lux, air speed 0.5m/sec and RH 60%.

The parent populations were selected by visual inspection and those individuals that fulfill the race characteristics were weighed and the crude data of the populations was presented as 100 individuals from each sex of all the 9 breeds under test. Each individual cocoon had the three tested characters, cocoon weight, shell weight and shell ratio on display.

Two methods of selection were performed:

1- Three breeders with long selection experience (more than 20 years each) were presented with the crude data. Each breeder made his selection according to his point of view, needlingless to state that all perform phenotypic independent culling on the absolute character (Singh et al, 1998) values, each breeder had different preferences for the minimum absolute values choice.

2- The same populations were selected by independent culling on the relative phenotypic values of the individuals (Van Vleck *et al.*, 1987) and exerting equal selection pressure on the three characters of which two are negatively correlated, namely cocoon weight and shell ratio. Selection was performed using a popular spreadsheet program and utilizing the function (Filter > Top n). Selection pressure varied between top 30 – 45 for the three characters concurrently filtered.

We ranked all the individuals by (Aycner 1985) formula for multi-trait index after estimating the actual heritability values when the offspring generations were reared. The values used as selection objective were 3.5 and 2.5 gm for cocoon weight, 0.9 and 0.7gm for shell weight and 25 and 35% for shell ratio respectively for females and males.

RESULTS AND DISCUSSION

Description of breeds in the study shows (Table I) that the three main geographic origins were represented with three breeds each. Variation of averages between and within the geographical origins for males (Table II) and females (Table III) ensure possibility for testing the efficiency of the examined selection methods at different level of production. Distribution parameters of kurtosis and skewness as well as coefficients of variation that ranged from 8.20 to 16.22 for males and from 8.13 to 16.84 for females suggested existence of normal, left and right skewed distribution for both sexes among the different breeds in different characters. Accordingly the chosen samples could be considered representative for testing the selection approaches.

Average index values for the selected 7 individuals of the available 100 individuals were shown for the breeding methods of interest and for both sexes (Table IV). In all cases the average index manifested the highest values for selection index approach (column 5). The closer the average for other methods, the better was the respective ranking of the selected individuals. Overall breed averages for males show that one of the breeders gave the second highest estimate (1.905) after the selection index (1.947), which was better than independent culling (1.897). For the group of females independent culling gave the lowest values (1.633) for the index vs. breeders (1.644-1.653). Results of the comparisons of index averages show very close values for all studied methods. Differences were very small and were non-significant. While selection index required availability of heritability values, the independent culling (denoted as computer) was able to ensure almost the same average index value of the best-selected individuals. The same holds for the experienced breeders. A conclusion could be drawn for suitability of independent culling as an easy way for in-between individuals within one breed selection, especially in conditions of experienced breeders deficiency.

As heritability and genetic covariance are precisely estimated after rearing the offspring generation, thus using the values of the grand parent generation for indexing the selected parents was considered as an accepted compromise.

Degree of coincidence of selected individuals by different methods with theoretically the best one (that of selection index) provide a measure for efficiency of selection (Table V). The number of coincided individuals for males selected by the selection index among the first 12 selected by the

breeders showed the best efficiency of breeder 2 (73.02%) followed by independent culling (66.67%). For females, the best coincidence was found for independent culling (84.13) method (e.g. the computer) vs. all breeders. The exceptions from the general tendency in breed E14 for males, where only 2 individuals coincide with the selected by selection index and of breed E5a for females, where only one individual (14.29%) coincided with the selection index required a more detailed description of these exceptional cases. However, the main tendency for efficient selection by the aid of a computer contributed to the importance of that selection tool and also to the confidence of its utilization, especially by breeders with low expertise.

The utilization of the three tested methods imposed the question for their universal or specific utilization for separate origins, for different breeds and for both sexes. Variation of all indexed individuals depended mostly on main factors, that affected separate traits. Joint analysis of geographical origin and selection method (Table VI) showed significant influence only of the main effect of geographical origin, while method and interaction effects were non-significant. Results give a possibility for equal utilization of the selection methods despite the geographical origin.

Table I. Qualitative characters of the breeds used for the experiments

Tableau I. Caractères quantitatifs des lignées utilisées pour les expériences.

Breed	Type	Egg color	Larval marking	Cocoon shape
<i>Lignée</i>		<i>Couleur de l'œuf</i>	<i>Marquage larvaire</i>	<i>Forme du cocon</i>
E2	Japanese <i>Japonais</i>	Gray blue <i>Bleu gris</i>	Marked <i>Marqué</i>	Dumbbell <i>Cintré</i>
E6	Japanese <i>Japonais</i>	Gray blue <i>Bleu gris</i>	Marked <i>Marqué</i>	Dumbbell <i>Cintré</i>
E15	Japanese <i>Japonais</i>	Gray blue <i>Bleu gris</i>	Marked <i>Marqué</i>	Dumbbell <i>Cintré</i>
E1	Chinese <i>Chinois</i>	Greenish <i>Verdâtre</i>	Plain <i>Uni</i>	Oval <i>Ovale</i>
E5a	Chinese <i>Chinois</i>	Greenish <i>Verdâtre</i>	Plain <i>Uni</i>	Oval <i>Ovale</i>
E14	Chinese <i>Chinois</i>	Greenish <i>Verdâtre</i>	Plain <i>Uni</i>	Oval <i>Ovale</i>
E4b	European <i>Européen</i>	Gray blue <i>Bleu gris</i>	Marked & Plain <i>Marqué et uni</i>	Elongated <i>Allongé</i>
E8	European <i>Européen</i>	Gray blue <i>Bleu gris</i>	Marked & plain <i>Marqué & uni</i>	Elongated <i>Allongé</i>
E9	European <i>Européen</i>	Gray blue <i>Bleu gris</i>	Marked & plain <i>Marqué & uni</i>	Elongated <i>Allongé</i>

Table II. Quantitative parameters of males.

Tableau II. Paramètres quantitatifs des mâles.

Title	Cocoon weight	Shell weight	Shell %	Cocoon weight	Shell weight	Shell %	Cocoon weight	Shell weight	Shell %
Dénomination	Poids du cocon	Poids de la coque	Richesse soyeuse	Poids du cocon	Poids de la coque	Richesse soyeuse	Poids du cocon	Poids de la coque	Richesse soyeuse
Japanese Race / Race japonaise	E2			E6			E15		
Max	3,129	0,697	32,64%	3,403	0,721	35,38%	2,995	0,639	29,81%
Min	1,873	0,430	17,51%	1,581	0,410	13,28%	1,544	0,304	16,56%
Range / Fourchette	1,496	0,267	15,13%	1,822	0,311	22,11%	1,451	0,335	13,25%
Mean / Moyenne	2,295	0,575	25,24%	2,183	0,586	27,22%	2,235	0,539	24,36%
Median	2,258	0,580	25,86%	2,210	0,594	27,50%	2,203	0,541	25,24%
Kurt	4,146	-0,403	2,178	0,903	-0,959	2,299	0,384	2,146	-0,170
Skew / Déviation	1,778	-0,141	-1,010	0,652	-0,169	-0,700	0,657	-0,968	-0,735
Mode	2,280	0,590	0,271	2,210	0,652	0,293	2,270	0,496	0,266
Average Dev./Ecart moyen	0,198	0,045	1,74%	0,273	0,066	2,52%	0,217	0,044	2,37%
Standard Dev./Ecart type	0,286	0,056	2,35%	0,354	0,079	3,67%	0,289	0,057	2,92%
Variance	0,082	0,003	0,06%	0,125	0,006	0,13%	0,084	0,003	0,09%
C.V.	12,46%	9,69%	9,33%	16,22%	13,53%	13,49%	12,94%	10,61%	12,00%
Chinese Race/ Race chinoise	E1			E5a			E14		
Max	3,301	0,621	27,36%	3,123	0,791	30,85%	2,800	0,583	33,48%
Min	1,706	0,404	13,69%	1,727	0,347	12,28%	1,410	0,350	18,30%
Range / Fourchette	1,595	0,217	13,67%	1,396	0,444	18,56%	1,390	0,233	15,17%
Mean / Moyenne	2,322	0,514	22,38%	2,312	0,581	25,36%	1,954	0,492	25,36%
Median	2,278	0,510	22,66%	2,304	0,575	25,62%	1,917	0,500	25,72%
Kurt	0,290	-0,517	0,386	-0,445	1,266	3,192	1,318	0,057	1,605
Skew/ Déviation	0,634	-0,123	-0,557	0,435	-0,141	-1,403	0,986	-0,416	-0,195
Mode	2,334	0,509	#N/A	2,350	0,573	0,252	1,902	0,500	#N/A
Average Dev./Ecart moyen	0,243	0,040	2,03%	0,269	0,055	2,19%	0,192	0,039	1,78%
Standard Dev./Ecart type	0,313	0,050	2,48%	0,328	0,072	3,00%	0,258	0,050	2,44%
Variance	0,098	0,003	0,06%	0,107	0,005	0,09%	0,066	0,002	0,06%
C.V.	13,46%	9,74%	11,08%	14,17%	12,34%	11,82%	13,19%	10,12%	9,63%
European Race Race européenne	E4b			E8			E9		
Max	2,791	0,647	28,35%	2,665	0,696	31,80%	2,270	0,700	35,35%
Min	1,563	0,375	18,64%	1,477	0,391	19,19%	1,514	0,401	21,19%
Range / Fourchette	1,228	0,272	9,71%	1,188	0,305	12,61%	0,756	0,299	14,17%
Mean / Moyenne	2,141	0,506	23,84%	2,095	0,560	26,76%	1,911	0,521	27,29%
Median	2,130	0,504	24,15%	2,113	0,556	27,19%	1,926	0,526	27,74%
Kurt	-0,702	-0,449	-0,931	0,651	-0,452	0,726	-0,859	-0,495	1,429
Skew / Déviation	0,025	-0,056	-0,264	-0,160	-0,339	-0,631	-0,030	0,057	-0,166
Mode	2,344	0,479	#N/A	2,184	0,553	0,263	1,679	0,501	29,83%
Average Dev./Ecart moyen	0,246	0,047	2,11%	0,165	0,058	1,83%	0,157	0,051	1,69%
Standard Dev./Ecart type	0,292	0,058	2,49%	0,212	0,072	2,35%	0,183	0,061	2,24%
Variance	0,085	0,003	0,06%	0,045	0,005	0,06%	0,033	0,004	0,05%
C.V.	13,65%	11,45%	10,43%	10,14%	12,87%	8,77%	9,56%	11,66%	8,20%

Table III. Quantitative parameters of females.

Tableau III. Paramètres quantitatifs des femelles.

Title	Cocoon weight	Shell weight	Sh. %	Cocoon weight	Shell weight	Shell %	Cocoon weight	Shell weight	Shell %
	<i>Poids du cocon</i>	<i>Poids de la coque</i>	<i>Richesse soyeuse</i>	<i>Poids du cocon</i>	<i>Poids de la coque</i>	<i>Richesse soyeuse</i>	<i>Poids du cocon</i>	<i>Poids de la coque</i>	<i>Richesse soyeuse</i>
Japanese Race	E2			E6			E15		
<i>Race japonaise</i>									
Max	3,680	0,719	29,97%	3,880	0,733	30,13%	3,903	0,798	30,63%
Min	2,057	0,359	12,38%	1,974	0,410	12,82%	2,273	0,406	13,17%
Range / Fourchette	1,623	0,360	17,59%	1,906	0,323	17,31%	1,630	0,392	17,46%
Mean / Moyenne	2,792	0,589	21,30%	2,767	0,607	22,10%	2,815	0,587	20,97%
Median	2,791	0,591	21,26%	2,770	0,613	22,25%	2,798	0,579	21,17%
Kurt	-0,086	1,323	1,730	-0,198	-0,221	5,869	0,378	0,160	2,334
Skew / Déviation	-0,096	-0,741	0,093	-0,019	-0,412	-0,773	0,500	0,283	0,166
Mode	3,084	0,547	22,42%	2,956	0,620	#N/A	2,865	0,544	23,39%
Average Dev./Ecart moyen	0,250	0,052	2,10%	0,299	0,055	1,33%	0,252	0,057	1,88%
Standard Dev./Ecart type	0,316	0,068	3,02%	0,367	0,068	2,09%	0,312	0,071	2,61%
Variance	0,100	0,005	0,09%	0,135	0,005	0,04%	0,0972	0,0050	0,07%
C.V.	11,30%	11,51%	14,17%	13,27%	11,18%	9,44%	11,07%	12,05%	12,43%
Chinese race / Race chinoise	E1			E5a			E14		
Max	3,659	0,729	26,54%	3,971	0,799	25,60%	3,175	0,654	24,57%
Min	1,703	0,400	14,86%	2,134	0,432	13,47%	1,943	0,343	11,86%
Range / Fourchette	1,956	0,329	11,68%	1,837	0,367	12,13%	1,232	0,311	12,72%
Mean / Moyenne	2,685	0,527	19,92%	2,829	0,613	21,80%	2,460	0,509	20,78%
Median	2,721	0,520	19,80%	2,818	0,609	21,85%	2,425	0,510	21,07%
Kurt	-0,736	0,084	-0,583	0,544	0,305	4,852	-0,745	-0,184	6,037
Skew / Déviation	-0,018	0,593	0,214	0,667	-0,000	-1,253	0,258	0,018	-1,871
Mode	#N/A	0,480	18,61%	2,913	0,659	#N/A	2,889	0,511	#N/A
Average Dev./Ecart moyen	0,377	0,059	2,28%	0,282	0,053	1,26%	0,241	0,048	1,29%
Standard Dev./Ecart type	0,452	0,074	2,80%	0,361	0,067	1,77%	0,288	0,060	1,90%
Variance	0,205	0,005	0,08%	0,130	0,004	0,03%	0,083	0,004	0,04%
C.V.	16,84%	14,06%	14,07%	12,75%	10,89%	8,13%	11,70%	11,88%	9,14%
European Race	E4b			E8			E9		
<i>Race européenne</i>									
Max	3,14	0,664	25,94%	3,348	0,746	26,88%	3,184	0,730	28,76%
Min	1,716	0,351	11,90%	1,853	0,375	12,58%	1,708	0,336	13,47%
Range / Fourchette	1,424	0,313	14,04%	1,495	0,371	14,31%	1,476	0,394	15,29%
Mean / Moyenne	2,578	0,537	20,97%	2,602	0,550	21,26%	2,428	0,534	22,03%
Median	2,610	0,536	21,30%	2,593	0,546	21,87%	2,447	0,536	22,20%
Kurt	-0,660	-0,335	1,604	-0,717	-0,554	0,511	-0,257	0,518	3,849
Skew / Déviation	-0,366	-0,165	-0,745	-0,063	0,157	-0,687	-0,034	0,066	-1,057
Mode	2,941	0,512	#N/A	2,738	0,486	22,32%	2,510	0,470	20,94%
Average Dev./Ecart moyen	0,259	0,053	1,85%	0,281	0,067	2,13%	0,227	0,058	1,59%
Standard Dev./Ecart type	0,309	0,066	2,45%	0,334	0,082	2,62%	0,278	0,076	2,28%
Variance	0,096	0,004	0,06%	0,112	0,007	0,07%	0,077	0,006	0,05%
C.V.	11,99%	12,26%	11,66%	12,84%	14,87%	12,34%	11,46%	14,29%	10,35%

N/A = Not available / Non disponible.

Table IV. Selected Populations Mean Index.**Tableau IV. Indice moyen des populations sélectionnées.**

Method	Breeder 1	Breeder 2	Breeder 3	Computer	Index
Méthode	Graineur 1	Graineur 2	Graineur 3	Ordinateur	Indice
Breed / Lignée	Males / Mâles				
E2	1,640	1,665	1,645	1,681	1,696
E6	1,987	2,058	2,020	2,063	2,070
E15	1,945	1,952	1,941	1,939	1,970
E2	2,164	2,211	2,178	2,167	2,260
E5a	2,360	2,384	2,438	2,338	2,452
E14	2,107	2,148	2,104	2,089	2,183
E4b	1,789	1,740	1,822	1,814	1,836
E8	1,446	1,431	1,426	1,454	1,477
E9	1,522	1,557	1,507	1,524	1,579
Average / Moyenne	1,884	1,905	1,898	1,897	1,947
Std Dev / Ecart type	0,308	0,324	0,331	0,301	0,327
Error of mean / Écart de la moyenne	0,103	0,108	0,110	0,100	0,109
Std Diff Error / Ecart de la différence type	0,034	0,036	0,037	0,033	0,036
Critical Difference / Différence critique	0,079	0,083	0,085	0,077	0,084
Females / Femelles					
E2	1,640	1,658	1,638	1,629	1,687
E6	2,073	2,100	2,097	2,099	2,119
E15	1,258	1,292	1,290	1,298	1,315
E2	1,224	1,259	1,238	1,247	1,268
E5a	1,760	1,765	1,784	1,610	1,801
E14	1,878	1,888	1,877	1,865	1,893
E4b	1,696	1,691	1,700	1,702	1,711
E8	1,757	1,740	1,743	1,745	1,769
E9	1,512	1,482	1,512	1,499	1,512
Average / Moyenne	1,644	1,653	1,653	1,633	1,675
Std Dev / Ecart type	0,276	0,272	0,274	0,266	0,272
Error of mean / Écart de la moyenne	0,092	0,091	0,091	0,089	0,091
Std Diff Error / Ecart de la différence type	0,031	0,030	0,030	0,030	0,030
Critical Difference / Différence critique	0,071	0,070	0,070	0,068	0,070

Joint analysis of breed and method gave similar results for the geographical origin. The only significant effect was that of the breed, while selection method and the interaction were not significant (Table VII). Respectively, the same conclusion was made for equal applicability of the tested methods for all breeds.

In analyzing the sex effect versus method, it was found as expected significant influence for the sex (Table VIII). Again selection method and interaction effects were non-significant. Results confirm that the method of choice could be applicable for both sexes without any loss of efficiency.

Table V. Rate of coincidence (%).

Tableau V. Taux de coincidence (%).

Method	Breeder 1	Breeder 2	Breeder 3	Computer	Breeder 1	Breeder 2	Breeder 3	Computer
Breed	Males				Females			
Méthode	Graineur 1	Graineur 2	Graineur 3	Ordinateur	Graineur 1	Graineur 2	Graineur 3	Ordinateur
Lignée	Mâles				Femelles			
E2	57.14	100.00	71.43	85.71	71.43	85.71	42.86	57.14
E6	42.86	100.00	57.14	100.00	71.43	71.43	100.00	100.00
E15	85.71	85.71	71.43	57.14	28.57	71.43	71.43	85.71
E2	57.14	71.43	42.86	42.86	71.43	85.71	71.43	100.00
E5a	57.14	57.14	100.00	57.14	71.43	71.43	85.71	14.29
E14	42.86	85.71	57.14	28.57	85.71	85.71	85.71	100.00
E4b	57.14	42.86	85.71	85.71	85.71	71.43	85.71	100.00
E8	57.14	42.86	42.86	85.71	85.71	57.14	71.43	100.00
E9	42.86	71.43	42.86	57.14	100.00	100.00	100.00	100.00
Mean / Moyenne	55.56	73.02	63.49	66.67	74.60	77.78	79.37	84.13

Table VI. ANOVA (Method × geographical origin).

Tableau VI. Analyse de la variance (méthode × origine géographique).

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit	P
Source de variation							
Race	8,2925	2	4,1463	50,1466	0,0000	3,0141	***
Method / Méthode	0,1595	3	0,0532	0,6429	0,5877	2,6230	NS
Interaction	0,0980	6	0,0163	0,1976	0,9774	2,1170	NS
Remainder / Reste	40,6800	492	0,0827				
Total	49,2300	503					

SS: Sum of squares / Somme des carrés. df: Degree of freedom: Degré de liberté. MS: Mean of squares / Moyenne des carrés.

Table VII. ANOVA (*Method × Breed*).**Tableau VII. Analyse de variance (*Méthode × lignée*).**

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit	P
<i>Source de variation</i>	<i>Valeur P</i>						
Breed / <i>Lignée</i>	20,4947	8	2,5618	42,2485	0,0000	1,9582	***
Method / <i>Méthode</i>	0,1595	3	0,0532	0,8766	0,4531	2,6240	NS
Interaction	0,1975	24	0,0082	0,1357	1,0000	1,5407	NS
Remainder / <i>Reste</i>	28,3783	468	0,0606				
Total	49,2300	503					

SS: Sum of squares / *Somme des carrés*. df: Degree of freedom: *Degré de liberté*. MS: Mean of squares / *Moyenne des carrés*.

Table VIII. ANOVA (*Method × Sex*).**Tableau VIII. ANOVA (*Méthode × Sexe*).**

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit	P
<i>Source de variation</i>	<i>Valeur- P</i>						
Sex / <i>Sexe</i>	8,2926	1	8,2926	100,9287	0,0000	3,8603	***
Method / <i>Méthode</i>	0,1595	3	0,0532	0,6469	0,5852	2,6229	NS
Interaction	0,0253	3	0,0084	0,1027	0,9585	2,6229	NS
Remainder / <i>Reste</i>	40,7526	496	0,0822				
Total	49,2300	503					

SS: Sum of squares / *Somme des carrés*. df: Degree of freedom: *Degré de liberté*. MS: Mean of squares / *Moyenne des carrés*.

The last three analyses supported the possibility of utilization of independent culling method as a selection method and the computer as a tool with equal efficiency for the three main geographical origins of *B. mori* L., for all the breeds and for both sexes. Therefore the independent culling by using equal selection pressure intensities can be used as an accepted compromise too, and it does not need heritability estimates. This is possible by using the (top n) function in most of the spread sheet software computer programs.

CONCLUSION

Computer is an easy and fast tool that can save breeders' time allows mass selection to be conducted on a large scale, and less experienced personnel to take the appropriate decisions. Less advanced sericultural countries that do not have the experienced staff and breeders can utilize this method too for mass selection and harnessing the heritable additive effects.

REFERENCES

- AJUZAWA H. (1972). Handbook of silkworm rearing. Fuji pub. Co. Ltd. Tokyo Japan p380.
- AYCNER F. (1985). Genetical problems at animal selection, Agric. Sci. Jour. Moscow, 3, 73–80
- BAKER R. J. (1986). Selection indices in plant breeding. CRC Press Inc. New York. 145-151.
- CHATERJEE S.N., NAGARAJ C.S., GIRIDIHAR K. (1990) An approach to silkworm breeding. Workshop of Biometrical Genetics. CSR&TI Mysore, India 7-8 Sept, 11-16.
- CHEN H. R., JIN Y.Y, HUANG Z. X., RUAN G. H., YAO L. S. (1994). Breeding of new silkworm variety Fanhura chunmie for spring rearing. Canye Kexue 20, 26-29.
- DATTA R.K., RAJAN R.K., NATARAJU B., BASAVARAJU H.K., SARKAR A. (1999). Popularization of bivoltine sericulture technology in Karnataka, "XVIII International Sericultural Congress", Cairo, Egypt 12-16 October 1999, 73-80.
- ELSTON R.C. (1962). A weight free index for the purpose of ranking or selection with respect to several traits at a time. Biometrics, 19-85.
- FALCONER D.S. (1981). Introduction to quantitative genetics, 2nd edition, Longman Inc., New York, pp 340.
- GAMO T., HIRABAYASHI T., (1983). Genetic analysis of growth rate, pupation rate and some quantitative characters by diallele cross in the silkworm, *Bombyx mori* L- Jap. J. Breed., 33(2) 178-190).
- GREISS H., TZENOV P. & GREKOV D. (2001). Effect of new improved technology of silkworm *Bombyx mori* L rearing on the egg production capacity. Int. J. Indust. Entomol. 3, 2, 135-139
- LEAH.Z. (1993). Principles and techniques of silkworm breeding, United Nations, New York, 117pp.
- LERNER I. M. 1958. The genetic basis of selection. John Wiley & sons., Inc. New York. 124-132.
- MANO Y., ASAOKA K., OHARA O., NAKAWAGA H., HIRABAYASHI T. (1991). Breeding and evaluation of adaptability of silkworm *Bombyx mori* to the new low cost artificial diet, lacking of mulberry leaf powder. Bull Seric. Expt. Stn, 18, 667-690.
- MATHAVAN S., SANTHI G., SETHURAMAN B. (1987). Effect of feeding regime on energy allocation to reproduction in the silkworm *Bombyx mori* proc. Indian Silk, 3, 333-340.
- PAUL D.C., DEB D.C. (1993). Impact of differential feeding duration of parent on the larval and cocoon characteristics in the next generations of *Bombyx mori* L. Sericologia 33(2): 227-230.
- PETKOV N. (1995). Selection genetic investigation and results from the Silkworm (*Bombyx mori* L.) races, lines and hybrid breeding. Thesis for obtaining degree Doctor of the Agricultural Science, Sofia, pp 305.
- PETKOV N., NATCHEVA Y., (1996). Study on the economical characters of complex (tetra) hybrids of the silkworm *Bombyx mori* L. I. Biological traits of the larvae Animal Science 28, 4, 63-67.
- PETKOV N., NATCHEVA Y., TZENOV P., BRASLAVSKI M., STOCKII M., GOLOVKO V., (1999). Study on the breeding characters of some promising Bulgarian silkworm *B. mori* Breeds, Shovkovnitztvo, 22, 87-96.
- SINGH T., CHANDRASEKHARAJAH & SAMSON M. V. (1998). Correlation and heritability analysis in the silkworm *Bombyx mori*. Sericologia 38(1)1-13.
- SINGH T., SINGH K. (1993). Heritability and correlation studies between some economic characters in *Bombyx mori* L. Sci & Cult., 59 (3-6): 51-52.
- TALLIS G.M. (1962). A selection index for optimum genotype. Biometrics, 18: 120-128.
- TSUCHIYA S. & KURUSHIMA H. (1956). Study on the heritability of the measurable characters in *Bombyx mori*. I- Heritability in the weight of the cocoon shell. J. Seric. Jpn., 26: 167-168.
- VAN VLECK L.D., POLLAK J.E., OLTENACU B.E. (1987). Genetics for the animal sciences. W.H. Freeman and Co New York. pp 391.
- YAN L.L. (1983). The estimates of heritability of pupal weight, cocoon weight and number of eggs laid in silkworm (*Bombyx mori*) and the genetic correlation between these characters and path coefficient analysis, J. Seric. Sci., China, 9, 3, 149-155.
- YOKOYAMA T. (1957). On the application of heterosis in Japanese sericulture, proc. Internat. Symp. Suppl., 527-533.

COMPARAISON DE METHODES DE SELECTION DE TRAITS MULTIPLES ENTRE INDIVIDUS

H. GREISS¹, N. PETKOV², K. BOYCHEV², G. DIMOV² & Z. PETKOV

1. Agromier Co. 9 Malek el Afdal str. Zamalek, Le Caire 11211, Egypte.

2. Institute of Animal Seienees, Kostinbrod, Bulgarie.

Nous avons testé la sélection de traits multiples (poids du cocon, poids de la coque et richesse soyeuse) en utilisant l'indice de sélection et l'élimination indépendante (en utilisant un ordinateur) en comparaison avec trois graineurs de vers à soie expérimentés pour le choix des parents sélectionnés dans trois populations de lignées pures de vers à soie mono et bivoltins représentant des races chinoises, européennes et japonaises. Nous n'avons pas trouvé de différence significative pour l'indice de sélection moyen entre les graineurs et l'ordinateur. Les effets de l'interaction de la méthode de sélection par la race, par la lignée et par le sexe sur l'efficacité de la sélection ne sont pas significatifs. On considère l'ordinateur comme un outil facile et rapide qui peut faire gagner du temps aux graineurs et permettre de réaliser une sélection en masse à grande échelle par un personnel moins expérimenté pour prendre les décisions appropriées.

INTRODUCTION

La plupart des chercheurs se concentrent sur l'exploitation de l'effet hétérotique chez les vers à soie hybrides de lignées consanguines la dominance étant le principal facteur d'attribution et n'étant pas héréditaire (Falconer, 1981).

Cependant, on a peu travaillé sur les méthodes de sélection en masse pour améliorer les lignées parentales par l'effet additif qui est héréditaire (Falconer, 1981 ; Van Vleck et coll., 1983). La plupart des graineurs utilisent leur longue expérience pour sélectionner et pour choisir des individus qui doivent s'accoupler pour obtenir la prochaine génération.

Le Japon est le premier pays à avoir introduit le concept de production de soie bivoltine de qualité supérieure à partir d'hybrides commerciaux. En fait, le lignage au Japon a commencé en 1911 et a montré la supériorité des hybrides F1 par rapport aux parents purs (Yokoyama, 1957). Mano et coll., 1991 et Chen et coll., 1994 ont affirmé que les graineurs chinois et japonais ont déjà réussi des progrès remarquables dans l'amélioration des caractères quantitatifs et qualitatifs de valeur économique chez le ver à soie *Bombyx mori* L. Récemment, des hybrides nouveaux du ver à soie *B. mori* ayant une productivité supérieure ont été sélectionnés dans différents pays (Petkov, 1995 ; Petkov & Naheva, 1996 ; Petkov et coll., 1999). Cependant, ces races très productives ont besoin d'une nourriture et de conditions d'élevage excellentes pour manifester leur potentiel au maximum (Datta et coll., 1999). D'autre part, le nourrissage insuffisant des larves de races pures parentales entraîne une baisse de la longueur et du poids des ovaires et aussi du poids et de la qualité des œufs pondus et cela influence les larves de la génération suivante avec une baisse significative de leur poids (Mathavan et coll., 1987 ; Paul et Deb, 1993).

Lerner (1958) a affirmé qu'une hérédité élevée ainsi qu'une avance génétique élevée indiquent une action génétique additive. Les caractères avec de telles caractéristiques répondent mieux à une sélection phénotypique simple que ceux qui ont une faible hérédité et une faible avance génétique. Il faut donc avoir recours à la sélection individuelle pour obtenir des résultats dans la direction désirée.

Les estimations de l'héritabilité pour des caractères quantitatifs variés chez *B. mori* révèlent des valeurs plus élevées pour la longueur du filament (Chatterjee et coll., 1990), le poids du cocon – 73,60 % (Yan, 1983), le poids de la coque soyeuse – 80,20 % (Tsuchiya & Kurushima, 1956) et la richesse soyeuse du cocon – 72,40 % (Singh & Singh, 1983). On a déterminé des valeurs d'héritabilité faibles et extrêmement faibles pour la nymphose (28 %) et la dévidabilité (19 %) (Gamo & Hirabiashi, 1983), ce qui indique que pour ces caractères l'efficacité de la sélection a peu d'importance parce qu'ici la plupart de la variation ne se transmet pas au cours des générations.

Lea (1993), Singh et coll., (1998) ; Van Vleck et coll., (1983) ont affirmé qu'il y a deux méthodes principales pour la sélection.

1) La sélection sur ascendance : utile quand on connaît bien le génotype et qui est une extension du test de performance pour évaluer les génotypes associés.

2) La sélection de masse, avec trois sous-groupes.

La sélection tandem (directionnelle) : la sélection est destinée à l'amélioration d'un caractère. Quand le but est atteint, on oriente la sélection vers un autre trait. Dans ce cas, on sélectionne les caractères l'un après l'autre. Elle est très inefficace.

La sélection par élimination indépendante : on considère quelques caractères à la fois, on fixe une norme minimum pour chaque caractère. Si un génotype est exceptionnellement bon pour un caractère mais mauvais pour un autre paramètre, on le rejette.

L'évaluation simultanée (indice) : on adopte plusieurs méthodes comme l'indice de base modifié (Baker, 1986), l'indice de sélection restreinte (Tallis, 1962), l'indice sans poids pour classer les génotypes (Elston, 1962) et certaines ont été proposées dans la pratique. L'indice de sélection est plus efficace que la sélection tandem pour améliorer les génotypes pour les caractères négativement corrélés (Baker, 1986).

L'objectif de cette étude est d'établir une méthode facile et rapide pour une sélection de masse de caractères multiples. Les pays moins avancés sur le plan sericicole qui n'ont pas le personnel et les graineurs expérimentés peuvent aussi utiliser cette méthode.

MATERIELS ET METHODES

On a réalisé les expériences dans la plantation de mûrier d'Agromier Co. SAE et dans les magnaneries situées dans la province d'Asyuta en Egypte à 320 km au sud du Caire dans une zone désertique de 1999 à 2000. La plantation est irriguée avec l'eau du Nil selon les besoins des plantes, car il n'y a pas de pluie dans cette zone. La salinité totale de l'eau d'irrigation est de 300 ppm.

La plantation de mûrier est principalement du *Morus alba* var. Kokuso 27, *Morus alba* var. Canva 2, taillée sous la forme de buissons arrondis après 3 récoltes de branches chaque année. Le sol est du terreau sablonneux constitué de 51,4 % de limon, de 8,8 % d'argile et 39,8 % de sable. Le pH du sol est de 8,1. Le niveau de l'eau souterraine est en dessous de 3 mètres. La teneur en humidité du terrain est de 24 %.

Les lignées représentent des origines différentes sur le plan géographique : 3 lignées chinoises, 3 japonaises et 3 européennes. Elles ont toutes été maintenues et sélectionnées dans la banque génétique d'AGROMIER (Tableau I).

On maintient des conditions d'élevage optimum chez la population des parents (Ajuzawa, 1972) et on utilise les nouvelles améliorations technologiques d'après les recommandations de Greiss et coll., (2001) comme suit :

1. Application de macronutriments (Ca₂₃₀, S₅₀ et Mg₅₅) et de micronutriments secondaires (Mn₃, Fe_{4.5}, Zn_{3.5}, Cu_{0.4}, B_{0.5}, Mo_{0.54} & Cl₂₀₀) dans la mûraie en plus des macronutriments primaires (N₃₀₀P₁₅₀J₁₂₀) et ajout de fumure, 15 tonnes, seulement pour la mûraie destinée au jeune âge.

2. Double désinfection avec de l'eau de javel à 5 % poids / volume et de l'acide acétique à 0,2 % pour la magnanerie et les ustensiles.

3. Désinfection des œufs avec de l'acide acétique à 0,04 % pendant 15 mn à température ambiante.

4. Désinfection de la litière et des larves avec de l'oxyde de calcium à 88 %, de la chaux à 10 %, de l'acide benzoïque à 1 % et un saupoudrage avec du diathane M45 à 1 % après chaque mue.

5. Température d'élevage à 23° C, intensité lumineuse de 25 Lux pendant toute la période larvaire. Vitesse de l'air de 0,1 m / sec et humidité relative de 85 % pour les jeunes âges et 0,3 m / sec et 70 % pour les derniers âges. Pendant la mue, on réduit l'humidité à 50 % d'HR pour tous les âges et dans le cas des jeunes larves, on enlève les ouvertures en nylon des litières.

6. Montée et filage naturels à 27° C, intensité lumineuse de 25 Lux, vitesse de l'air de 0,5 m / s et HR de 60 %.

On sélectionne les populations parentales grâce à une inspection visuelle et on pèse les individus qui répondent aux caractéristiques des races et on constitue les données brutes pour les populations à partir de 100 individus de chaque sexe pour les 9 lignées testées. Pour chaque éoeon on teste trois caractères, le poids du éoeon, le poids de la éoque et la richesse soyeuse.

On procède à deux méthodes de sélection :

1. On présente les données brutes à trois graineurs ayant une longue expérience de la sélection (plus de 20 ans chacun). Chaque graineur procède à la sélection selon son point de vue, il va sans dire qu'ils ont tous recours à l'élimination phénotypique indépendante sur les valeurs du caractère absolu, chaque graineur a des préférences différentes pour le choix des valeurs absolues minimum.

2. On sélectionne les mêmes populations par l'élimination indépendante d'après les valeurs phénotypiques relatives des individus (Van Vleck et coll., 1987) et en exerçant une pression de sélection égale sur les trois caractères (Singh et coll., 1998), dont deux sont négativement corrélés en l'occurrence le poids du éoeon et la richesse soyeuse. On procède à la sélection en utilisant un programme de tableur populaire et en utilisant la fonction (Filtre > Top n). La pression de la sélection varie entre un sommet de 30–45 pour les trois caractères filtrés simultanément.

Nous avons classé les individus d'après la formule (Ayener, 1985) de l'indice de caractères multiples après avoir estimé les valeurs réelles de l'héritabilité quand on élève les générations de descendants. Les valeurs utilisées comme objectif de sélection sont 3,5 et 2,5 g pour le poids du éoeon, 0,9 et 0,7 g pour le poids de la éoque et 25 et 35 % pour la richesse soyeuse respectivement pour les femelles et les mâles.

RESULTATS ET DISCUSSION

La description des lignées de l'étude montre (Tableau I) que les trois principales origines géographiques sont représentées par trois lignées chacune. La variation des moyennes entre et à l'intérieur des origines géographiques pour les mâles (Tableau II) et les femelles (Tableau III) assure la possibilité de tester l'efficacité des méthodes de sélection examinées à un niveau de production différent. Les paramètres de distribution de la kurtosis et de l'asymétrie ainsi que les coefficients de variation qui sont compris entre 8,20 et 16,22 pour les mâles et entre 8,13 et 16,84 pour les femelles suggèrent l'existence d'une distribution asymétrique normale, gauche et droite pour les deux sexes parmi les différentes lignées avec des caractères différents. En conséquence, on pourrait considérer les échantillons choisis comme représentatifs pour tester les approches de sélection.

Les valeurs de l'indice moyen pour les 7 individus sélectionnés sur les 100 individus disponibles sont présentées pour les méthodes de lignage d'intérêt et pour les deux sexes (Tableau IV). Dans tous les cas l'indice moyen présente les valeurs les plus élevées avec la méthode de l'indice de sélection (colonne 5). Plus on est proche de la moyenne avec les autres méthodes, meilleur est le classement respectif des individus sélectionnés. Les moyennes générales des lignées pour les mâles montrent que l'un des graineurs donne la deuxième estimation la plus élevée (1,905) après l'indice de sélection (1,947), qui est meilleur que l'élimination indépendante (1,897). Pour le groupe des femelles, l'élimination indépendante donne les valeurs les plus basses (1,633) pour l'indice par opposition aux graineurs (1,644 – 1,653). Les résultats des comparaisons des moyennes de l'indice montrent des valeurs très proches avec toutes les méthodes étudiées. Les différences sont très faibles et ne sont pas

significatives. Tandis qu'avec l'indice de sélection il faut disposer des valeurs de l'héritabilité, l'élimination indépendante (avec l'ordinateur) est capable d'assurer presque la même valeur d'indice moyen pour les individus les mieux sélectionnés. Cela est semblable avec les graineurs expérimentés. On peut en conclure que l'élimination indépendante est un moyen facile pour la sélection à l'intérieur d'une lignée, surtout quand on manque de graineurs expérimentés.

Comme on estime précisément l'héritabilité et la covariance génétique après l'élevage de la génération des descendants, l'utilisation des valeurs de la génération des grands parents pour indexer les parents sélectionnés peut être considérée comme un compromis acceptable.

Le degré de coïncidence des individus sélectionnés par les différentes méthodes avec la meilleure théoriquement (celle de l'indice de sélection) montre l'efficacité de la sélection (Tableau V). Le nombre d'individus qui coïncident pour les mâles sélectionnés avec l'indice de sélection avec les 12 premiers sélectionnés par les graineurs montre que le graineur 2 est le plus efficace (73,02 %) suivi par l'élimination indépendante (66,67 %). Pour les femelles, on obtient la meilleure coïncidence avec la méthode de l'élimination indépendante (84,13) (c'est à dire avec l'ordinateur) par opposition aux graineurs. Les exceptions par rapport à la tendance générale avec la lignée E14 pour les mâles, où seulement 2 individus coïncident avec ceux sélectionnés d'après l'indice de sélection et avec la lignée E5a pour les femelles, où seulement un individu (14,29 %) coïncide avec l'indice de sélection nécessitent une description plus détaillée. Cependant, la tendance générale par rapport à l'efficacité de la sélection à l'aide d'un ordinateur contribue à prouver l'importance de cet outil de sélection et aussi la fiabilité de son utilisation surtout pour les graineurs ayant une faible expertise.

L'utilisation des trois méthodes testées pose la question de leur utilisation universelle ou spécifique pour des origines différentes, des lignées différentes et pour les deux sexes. La variation de tous les individus indexés dépend principalement de facteurs principaux, qui ont un effet sur les caractères séparés. L'analyse regroupée de l'origine géographique et de la méthode de sélection (Tableau VI) ne montre une influence significative que de l'effet majeur de l'origine géographique tandis que les effets de la méthode et de l'interaction ne sont pas significatifs. Les résultats montrent qu'on peut utiliser de manière égale les méthodes de sélection malgré l'origine géographique.

L'analyse regroupée de la lignée et de la méthode donne des résultats similaires pour l'origine géographique. Le seul effet significatif est celui de la lignée tandis que la méthode de sélection et l'interaction ne sont pas significatifs (Tableau VII). On tire la même conclusion que l'on peut utiliser des méthodes de manière égale pour toutes les lignées.

Pour analyser l'effet du sexe en fonction de la méthode, on a trouvé comme on pouvait s'y attendre une influence significative du sexe (Tableau VIII). A nouveau, la méthode de sélection et les effets de l'interaction ne sont pas significatifs. Les résultats confirment qu'on peut appliquer la méthode de son choix pour les deux sexes sans aucune perte d'efficacité.

Les trois dernières analyses confirment la possibilité d'utiliser la méthode d'élimination indépendante comme une méthode de sélection et l'ordinateur comme un outil d'une efficacité égale pour les trois principales origines géographiques de *B. mori* L. pour toutes les lignées et pour les deux sexes. On peut donc avoir recours à l'élimination indépendante en utilisant des intensités de pression de sélection égales comme un compromis également acceptable et elle ne nécessite pas d'estimations de l'héritabilité. Cela est possible en utilisant la fonction (top n) disponible dans la plupart des programmes informatiques de logiciels de tableurs.

CONCLUSION

L'ordinateur est un outil rapide et facile qui peut faire gagner du temps aux graineurs et permettre de mener une sélection en masse à grande échelle et de faire prendre les décisions appropriées par un personnel moins expérimenté. Les pays moins avancés sur le plan séricicole qui n'ont pas le personnel et les graineurs expérimentés peuvent aussi utiliser cette méthode pour la sélection de masse et pour exploiter les effets additifs héréditaires.

BIOCHEMICAL STUDIES OF AMYLASE ACTIVITY IN TWO NON-MULBERRY SILKWORMS, *ANTHERAEA ASSAMA* AND *PHILOSAMIA RICINI* BOISDUVAL (LEPIDOPTERA : SATURNIIDAE) : A COMPARATIVE ANALYSIS

BALA GOPALAN UNNI*, JYOTI REKHA SAIKIA & ARCHANA YADAV

Biochemistry Department, Regional Research Laboratory (CSIR) Jorhat 785006, Assam, India.

*The amylase activity in the haemolymph and digestive fluid in the two silkworms **Antheraea assama** and **Philosamia ricini** were studied. Both the haemolymph and digestive fluid expressed developmental specific amylase activity, however the amylase activity of **P. ricini** haemolymph was very low. The amylase activity in the digestive fluid of **A. assama** was several fold lower than that in **P. ricini**. PAGE analysis revealed the occurrence of both anodal and cathodal amylase enzymes in the digestive fluid of **P. ricini** silkworms, whereas only anodal forms of the enzyme were observed in the haemolymph and digestive fluid of **Antheraea assama**.*

Keywords: Index: amylase; developmental pattern; *Antheraea assama*; *Philosamia ricini*.

INTRODUCTION

Amylase is one of the key enzymes involved in digestion and carbohydrate metabolism in insects (Daone *et al.*, 1975; Horie and Watanabe, 1980). Amylase enzymes have been characterised from different origins (Fisher and Stein 1960; Baker, 1991). Yokoyama (1959) reported the presence of two types of amylase activities in digestive fluid and haemolymph. Kanakatsu (1972) purified amylase from digestive fluid of *Bombyx mori* and studied its properties (Kanakatsu, 1978).

The muga silkworm *Antheraea assama* Westwood that produces the golden yellow silk is found only in the North-Eastern region of India. It is semi-domesticated and reared outdoors. On the other hand eri silkworm, *Philosamia ricini* Boisduval has been domesticated and is reared indoors and it produces a rough type of silk. Both the silkworms lay non-diapausing eggs and breed throughout the year (polyvoltine). The *A. assama* larvae are exposed to the vagaries of nature, and their mortality is very high during summer and winter seasons and they are therefore not commercially viable in this period. The *P. ricini* larvae on the other hand are hardier and since they are reared indoors have less mortality even under adverse tropical conditions.

The present study reports the biochemical differences in relation to amylase activity in the two silkworms, *Antheraea assama* and *Philosamia ricini*. Salient characteristics of the two species are given in Table I.

MATERIALS AND METHODS

Silkworms and collection of samples:

* Address for correspondence: Fax. 91-376-2370011; E-mail: bgunnid@sancharnet.in, bgunnid@yahoo.com

The larvae of *P. ricini* silkworms were fed on fresh castor leaves (*Ricinus communis* L.) while the larvae of *A. assama* silkworms were brushed directly on 2-3 year old Som (*Machilus bombycina* K.). The fifth instar larvae for the experiments were selected at random from their respective colonies.

Haemolymph was collected everyday from the first day of the fifth instar up to the third day of spinning. Digestive fluid was collected everyday from the 0 day of the fifth larval instar up to the onset of spinning.

Enzyme assay:

Amylase activity was measured with the dinitrosalicylic acid procedure using soluble starch as substrate (Bernfeld, 1955; Baker, 1991). Briefly, 50 microliter haemolymph was incubated in 1.5 ml of 20 mM phosphate buffer (pH 6.8) containing 0.2% soluble starch and 1 mM CaCl_2 at 37 °C for 30 minutes. Released maltodextrins were estimated by boiling with 2 ml of dinitrosalicylic acid solution for 10 min and by measuring the absorbance at 525 nm. For controls, enzyme was added after the addition of dinitrosalicylic acid. For digestive fluid, enzyme assay conditions are the same except for the incubation buffer which was 10 mM borate (pH 9.2). Maltose was used as standard and the enzyme activity was expressed as mg of maltose released/mg protein/30 min. at 37 °C. The protein content in the enzyme sources was measured by Lowry's method (1951).

Electrophoresis:

Haemolymph from fifth instar, fifth day larvae were separated on 7.5% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (Gabriel, 1971). After the run, the gel was washed and incubated in 20 mM phosphate buffer (pH 6.8) containing 0.5% soluble starch and 1 mM CaCl_2 at 37 °C for 45 minutes and stained with KI-I₂ solution (Baker, 1989). Digestive fluid was separated on 7.5% PAGE and amylase zymograms were made as described above except that the incubation buffer was 10 mM sodium borate (pH 9.2). Reversing the polarity of the current separated the cathodal isozymes. Electrophoresis was carried out at 30 milliamps constant current for 4 hours. Scans were then made of the zymograms obtained.

RESULTS AND DISCUSSION

The amylase activity in the haemolymph of both *P. ricini* and *A. assama* silkworms was determined from 0-day of fifth instar till the third day of spinning. In both species there was an increase in enzyme activity during larval development (Figs. 1 and 2). In *A. assama*, amylase activity showed an increase from 1st to 3rd day of fifth instar and another spurt in activity from 6th to 9th day after which there was a decrease in activity. The activity was found to be maximum at the pre-spinning stage.

The amylase activity in the digestive fluid of both *P. ricini* and *A. assama* was determined from 0-day of fifth instar up to the onset of spinning (Fig. 2). The digestive amylase activity in *P. ricini* silkworms was several folds higher than that in haemolymph. The enzyme activity in *A. assama* increased from 0-day up to 3rd day of fifth instar, followed by another spurt in activity from 7th to 9th day (Fig. 1). The trend in *P. ricini* was similar with an increase in enzyme activity from 1st to 4th day, a decrease in the middle of the instar followed by another spurt in activity from 7th day to 9th day. The amylase activity was at least 2-folds higher in *P. ricini* as compared to *A. assama*. The maximum amylase activity has been observed in the beginning and towards the end of the fifth instar. The *P. ricini* haemolymph exhibited lower amylase activity as compared to the *A. assama* haemolymph, but the amylase activity in the digestive fluid was double that of *A. assama* digestive fluid. The higher enzyme activity of the digestive fluid as compared to that in haemolymph may contribute to an efficient digestive system, which has enabled the silkworms to adapt and survive under tropical conditions.

Table 1. Differences in the characteristics of the two silkworms *Antheraea assama* and *Philosamia ricini* used in the study.

Tableau 1. Différences de caractéristiques chez les deux vers à soie *Antheraea assama* et *Philosamia ricini* utilisés dans l'étude.

	Voltinism	Larval span (days)	Single cocoon wt. (g)	Single cocoon shell wt (g)	Silk filament length (metres)	Size (Denier)	Cocoon colour	Cocoon shape
	<i>Voltinisme</i>	<i>Durée larvaire (jours)</i>	<i>Poids d'un cocon (g)</i>	<i>Poids d'une coque (g)</i>	<i>Longueur du filament de soie (m)</i>	<i>Titre (denier)</i>	<i>Couleur du cocon</i>	<i>Forme du cocon</i>
<i>P. ricini</i>	Polyvoltine	20-22	2.4	0.26	Spun yarn (1.5)	2.9	White	Oval (open ended)
	<i>Polyvoltin</i>				<i>Fil filé</i>		<i>Blanc</i>	<i>Ovale (ouvert au bout)</i>
<i>A. assama</i>	Polyvoltine	25-30	4.9	0.42	250-300	3.9	Golden yellow	Oval (continuous)
	<i>Polyvoltin</i>						<i>Jaune doré</i>	<i>Ovale (continu)</i>

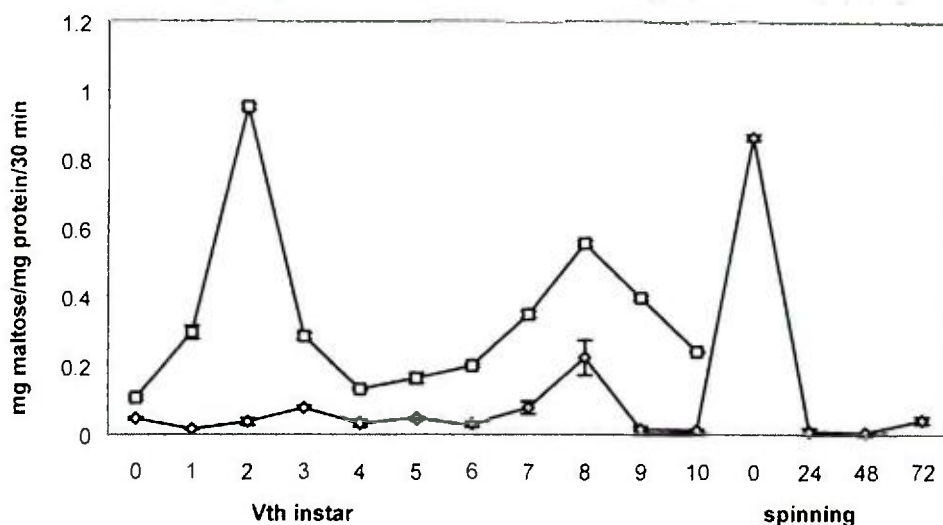


Fig. 1. Amylase activity in the digestive fluid (□) and haemolymph (◇) of *Antheraea assama* during development in the fifth instar and spinning period.

Enzyme activity is expressed as mg of maltose released /mg protein / 30 min. Each point is the mean of five individuals in two replicates.

Fig. 1. Activité amylase dans le liquide digestif (□) et l'hémolymph (◇) d'*Antheraea assama* pendant le développement du 5^{ème} âge et la période de filage.

L'activité de l'enzyme est exprimée en mg de maltose libéré / mg de protéine / 30 min. Chaque point est la moyenne de cinq individus dans deux répétitions.

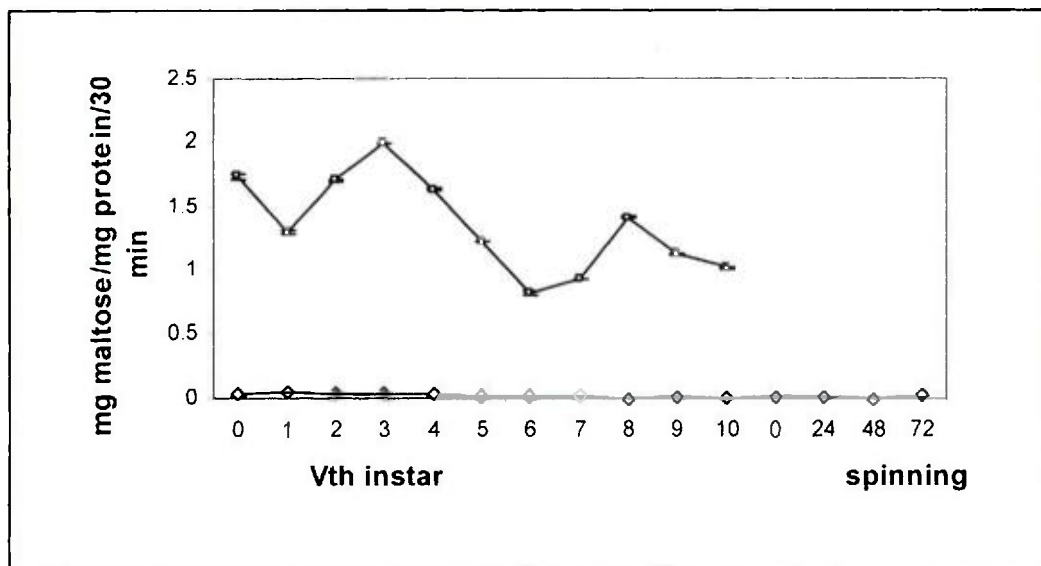


Fig. 2. Amylase activity in the digestive fluid (□) and haemolymph (◇) of *Philosamia ricini* during development in the fifth instar and spinning period.

Enzyme activity is expressed as mg of maltose released /mg protein /30 min.
Each point is the mean of five individuals in two replicates.

Fig. 2. Activité amylase dans le liquide digestif (□) et l'hémolymph (◇) de *Philosamia ricini* pendant le développement du 5ème âge et la période de filage.

L'activité de l'enzyme est exprimée en mg de maltose libéré / mg de protéine / 30 min.
Chaque point est la moyenne de cinq individus dans deux répétitions.

Crude haemolymph and digestive fluid samples from fifth instar 5-day larvae were separated on vertical PAGE with a discontinuous buffer system. The amylase activity in the haemolymph is comparatively low in both the silkworms when compared to the digestive fluid. However, the anodal bands in both cases were distinct and of high intensity (Fig. 3). Three cathodal amylase isozymes were detected in the digestive fluid of *P. ricini* silkworm, in addition to the anodal ones, while *A. assama* digestive fluid revealed only anodic isozymes (Figs. 3 & 4). The anodic isozymes detected in the haemolymph of *P. ricini* is similar to the one reported by Banno *et al.* (1984) in the haemolymph of diapausing strain of *B. mori*. The electrophoretic pattern of the digestive amylase is different in both the silkworms. The amylase activity migrated as three closely spaced cathodal bands in *P. ricini* silkworm, while the *A. assama* haemolymph did not show any cathodal activity (Fig. 4). The anodic digestive and haemolymph amylase were present in both the silkworms.

Cathodal amylase activity of haemolymph was absent in both the silkworms, whereas, only *P. ricini* demonstrated cathodal amylase activity of the digestive fluid (Fig. A). This is in contrast to the findings by Abraham *et al.* (1992) who reported cathodal amylase activity of both digestive fluid and haemolymph in all non-diapausing strains of *B. mori*. Both the silkworms studied in the present

case are non-mulberry silkworms and so may account for the reported difference only in the geographically distinct populations of non-diapausing polyvoltine strains.

The cathodal amylase banding pattern observed in the *P. ricini* silkworm resembles that of *Drosophila hydei* (Doane *et al.*, 1975), and human (Karn and Rosenblum, 1975). Karn and Rosenblum (1975) have demonstrated in humans that the amylase isozyme heterogeneity is due to deamidation, a post translational modification. It is possible that the multimeric forms of the amylase isozyme observed in digestive enzyme of *P. ricini* silkworm may be the result of post translational modifications such as amidation or could be a multimeric form of the same polypeptide.

The increased enzyme activity may have adaptive significance in the *P. ricini* silkworm, which survives under tropical conditions. The effectiveness of amylases in survival has been reported in insect species such as *Tenebrio molitor* (Buonocore *et al.*, 1976). The *A. assama* silkworm on the whole has a lower amylase activity as compared to the *P. ricini* silkworms. This low activity of amylase in *A. assama* silkworms may be one of the reasons for the high mortality of this silkworm especially during summer and winter seasons.

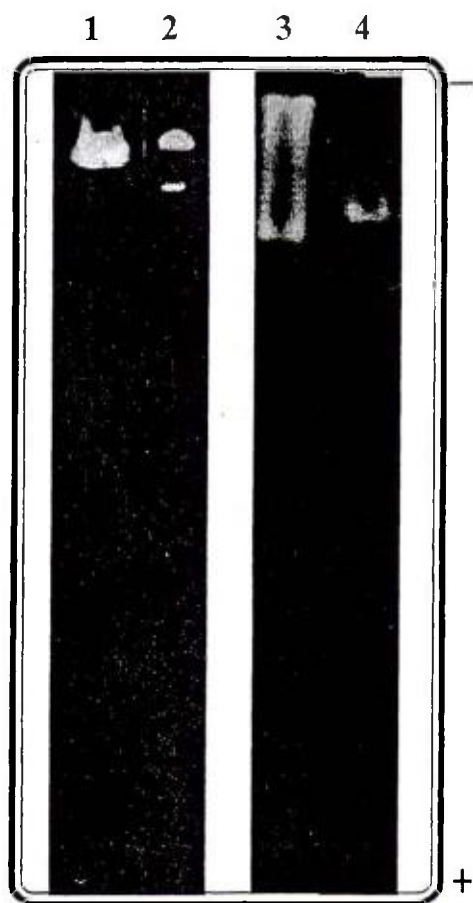


Figure 3. Vertical-PAGE (pH 8.8) of crude haemolymph and digestive fluid samples stained for amylase activity with KJ-I₂ solution after incubation with 0.5 % starch

Anodal bands:

- Lane 1: Haemolymph of *Antheraea assama*.
- Lane 2: Haemolymph of *Philosamia ricini*.
- Lane 3: Digestive fluid of *Philosamia ricini*.
- Lane 4: Digestive fluid of *Antheraea assama*.

Figure 3. Electrophorèse verticale (pH 8,8) sur gel de polyacrylamide d'échantillons d'hémolymphe brute et de liquide digestif colorés pour l'activité amylase avec de la solution KJ-I₂ après incubation avec 0,5 % d'amidon.

Bandes anodiques :

- Trajet 1 : Hémolymphe d'*Antheraea assama*.
- Trajet 2 : Hémolymphe de *Philosamia ricini*.
- Trajet 3 : Liquide digestif de *Philosamia ricini*.
- Trajet 4 : Liquide digestif d'*Antheraea assama*.

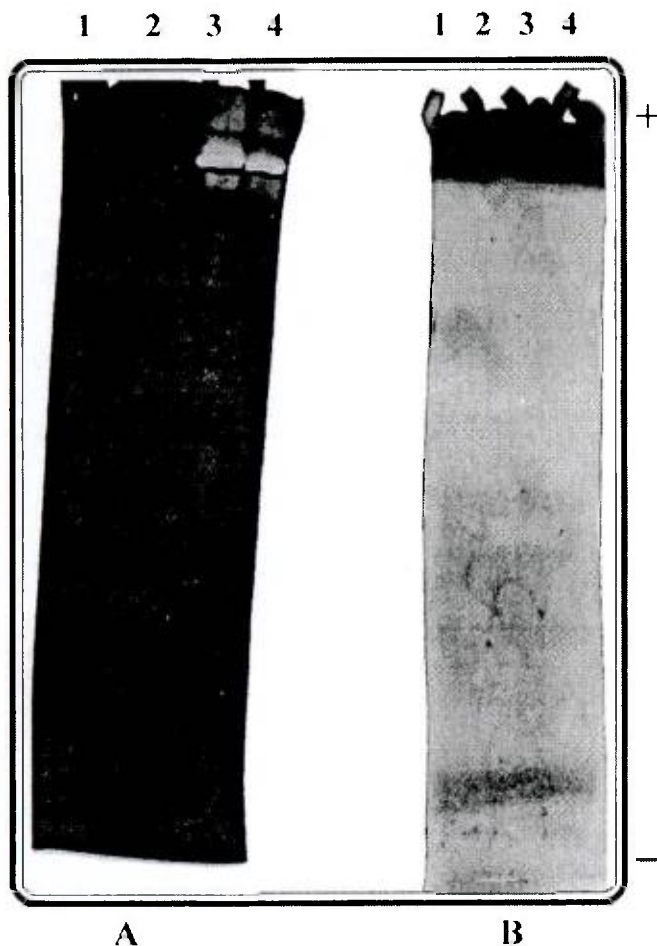


Figure 4 . Vertical-PAGE (pH 8.8) of crude digestive fluid (A) and haemolymph (B) stained for amylase activity with KI-I₂ solution after incubation with 0.5 % starch.

A. Cathodal bands:

Lanes 1-2: Digestive fluid of *A. assama*.

Lanes 3-4: Digestive fluid of *P. ricini*.

B. Cathodal bands:

Lanes 1-2: Haemolymph of *A. assama*.

Lanes 3-4: Haemolymph of *P. ricini*.

Figure 4. Electrophorèse verticale sur gel de polyacrylamide (pH 8,8) du liquide digestif brut (A) et de l'hémolymph (B) colorée pour l'activité amylase avec la solution KI-I₂ après incubation avec de l'amidon à 0,5 %.

A. Bandes cathodiques :

Trajets 1-2 : Liquide digestif d'*A. assama*.

Trajets 3-4 : Liquide digestif de *P. ricini*.

B. Bandes cathodiques :

Trajets 1-2: Hémolymph de *A. assama*.

Trajets 3-4 : Hémolymph de *P. ricini*.

The function of haemolymph amylase is not fully understood although Wyatt (1967) suggested its possible involvement in the degradation of fat body glycogen. The presence of this enzyme in abundance during larval development implies that this enzyme has some important physiological role. The developmental regulation of the digestive amylase and the expression of anodal forms only in *A. assama* silkworms make digestive amylase an interesting candidate for the study of its molecular biology.

REFERENCES

- ABRAHAM E.G., NAGARAJU J. & DATTA R.K. (1992). Biochemical studies of amylases in the silkworm *Bombyx mori* L: comparative analysis in diapausing and non-diapausing strains. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 22, 867-873.
- BAKER J.E. (1991). Purification and partial characterisation of amylase allozymes from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*. *Insect Biochem.* 21, 303-311.

- BANNO Y., KAWAGUCHI Y. & DOIRA H. (1984). Sexual dimorphism and developmental changes in haemolymph amylase of *Bombyx mori*. J. Sericult. Sci. Jpn. 53, 335-340.
- BERNFELD P. (1955). Amylases a and b. In Methods in Enzymology. (Colowick S.P. and Kaplan N.O. eds), Vol. 1, pp 149-158. Academic Press, New York.
- BUONOCORE V., POERIO E., SILANO S. & TOMASI, M. (1976). Physical and catalytic properties of a-amylase from *Tenebrio molitor* L. larvae. Biochem J. 153, 621-625.
- DAONE W.W., ABRAHAM I., KOLAR M.M., MARTENSON R.E. & DEIBLER G.E. (1975). Purified *Drosophila* a- amylase isozyme. In Isozyme IV, Genetics and Evolution (Martet C.L. eds), pp 585-607.
- FISHER E.H. & STEIN E.A. (1960). a-Amylases. In The Enzymes (Boyer P.D., Lardy H. and Myrback K.eds), 2nd edition Vol 4, pp 313-343. Academic Press, New York.
- GABRIEL O. (1971). Analytical disc gel electrophoresis. In Methods in Enzymology (Joakoby W.B.-ed.), Vol. 22, pp 565-578. Academic Press, New York.
- HORIE Y. & WATANABE H. (1980). Recent advances in Sericulture. Ann. Rev. Ent. 25, 49-71.
- KANAKATSU R. (1972). Purification and some properties of amylase in the digestive juice of silkworm larvae, *Bombyx mori*. J. Sericult. Sci. Jpn. 42, 285-292.
- KANAKATSU R. (1978). Studies on further properties for an alkaline amylase in the digestive juice of silkworm larvae, *Bombyx mori*. J.F.T.S. Technol. 76, 1-21.
- KARN R.C. & ROSENBLUM B.B. (1975). Genetic and post translational mechanism determining human amylase isozyme heterogeneity. In Isozyme IV, Genetics and Evolution (Martet, C.L. ed), Vol. 4, pp 745-776. Academic Press, New York.
- LOWRY O.H., ROSENBROUGH N.J., FARR A.L. & Randall R.J. (1951). Protein estimation with the folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- SADASIVAM S. & MANIKAM A. (1992). Determination of glucose by glucose oxidase method. In: Biochemical Methods for Agricultural Sciences, Wiley Eastern Ltd. New Delhi.
- SANTOS C.D., RIBERIO A.S & TERRA W.R (1986) Differential centrifugation, calcium precipitation, ultrasonic disruption of midgut cells of *Erinnys ello* caterpillars. Purification of cell microvilli and inference concerning secretory mechanisms. Can J Zool., 64, 490-500
- SANTOS C.D & TERRA W.R (1984) Plasma membrane associated amylase and trypsin. Insect Biochem, 14 , 587-594
- UNNI B.G. & PANT R. (1985) Photoperiodic response on the silk gland of *P. ricini* during fifth instar larval development and spinning period. Indian J. Comp. Animal Physiol. 3, 33-42.
- UNNI B.G. & CHOUDHURY A. (1997). Metabolism of carbohydrate in non mulberry silkworm, *Philosamia ricini* and *Antheraea asama* -A comparative investigation. J. Ent. Research, 21 (3), 259-266.
- WYATT G.R. (1961). The biochemistry of insect haemolymph. Ann. Rev. Ent. 6, 75-102.
- WYATT G.R. (1967). The biochemistry of sugars and polysaccharides in insects. Advances in Insect Physiol. 4, 287-360.
- YOKOYAMA T. (1959) Silkworm Genetics Illustrated. Japanese S. P. Sc. Ueno Park, Tokyo.

ETUDE COMPARATIVE DE L'ACTIVITE DE L'AMYLASE CHEZ DEUX VERS A SOIE NON-MURIER, *ANTHRAEA* *ASSAMA* ET *PHILOSAMIA RICINI* BOISDUVAL (LEPIDOPTERA : SATURNIIDAE)

BALA GOPALAN UNNI, JYOTO REKHA SAIKIA & ARCHANA YADAV*

Biochemistry Department, Regional Research Laboratory (CSIR) Jorhat – 785 006, Assam, Inde.

*Nous avons étudié l'activité amylase dans l'hémolymphe et le liquide digestif chez deux vers à soie, *Antheraea assama* et *Philosamia ricini*. L'hémolymphe et le liquide digestif expriment tous les deux une activité amylase spécifique de développement, cependant l'activité amylase de l'hémolymphe de *P. ricini* est très faible. L'activité de l'amylase dans le liquide digestif de *A. assama* est plusieurs fois inférieure à celle de *P. ricini*. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide révèle la présence d'amylases anodiques et cathodiques dans le liquide digestif des vers à soie *P. ricini* tandis qu'on n'observe que des formes anodiques de l'enzyme dans l'hémolymphe et le liquide digestif d'*Antheraea assama*.*

INTRODUCTION

L'amylase est l'une des enzymes clé impliquées dans la digestion et le métabolisme des hydrates de carbone chez les insectes (Daone et coll., 1975 ; Horie et Watanabe, 1980). Des amylases d'origines différentes ont été caractérisées (Fisher et Stein 1960 ; Baker, 1991). Yokoyama (1959) a rapporté la présence de deux types d'activités amylase dans le liquide digestif et dans l'hémolymphe. Kanakatsu (1972) a purifié l'amylase du liquide digestif de *Bombyx mori* et étudié ses propriétés (Kanakatsu, 1978).

On ne trouve le ver à soie muga *Antheraea assama* Westwood qui produit de la soie jaune doré que dans le nord-est de l'Inde. Il est semi-domestiqué et élevé à l'extérieur. D'autre part, le ver à soie Eri, *Philosamia ricini* Boisduval a été domestiqué et est élevé à l'intérieur et il produit une soie de type brute. Les deux vers à soie pondent des œufs sans diapause et sont élevés toute l'année (polyvoltins). Les larves d'*A. assama* sont exposées aux caprices de la nature et leur mortalité est très élevée pendant les saisons d'été et d'hiver et elles ne sont donc pas commercialement viables pendant cette période. D'autre part, les larves de *P. ricini* sont plus résistantes et puisqu'elles sont élevées à l'intérieur, elles ont une mortalité inférieure même dans des conditions tropicales défavorables.

Cette étude rapporte les différences biochimiques de l'activité amylase chez deux vers à soie *Antheraea assama* et *Philosamia ricini*. Les caractéristiques principales des deux espèces sont présentées dans le Tableau I.

MATERIELS ET METHODES

Vers à soie et recueil des échantillons :

* Adresse de correspondance : Fax 91 – 376 – 3370011. E-mail : bgunnid@sancharnet.in, bgunni@yahoo.com

Les larves des vers à soie *P. ricini* sont nourries sur des feuilles de ricin fraîches (*Ricinus communis* L.) tandis que les larves des vers à soie *A. assama* sont levées directement sur du Som de 2 à 3 ans (*Machilus bombycina* K.). On sélectionne des larves du cinquième âge au hasard pour les expériences.

On recueille l'hémolymphe chaque jour du premier jour du cinquième âge jusqu'au troisième jour du filage. On recueille le liquide digestif chaque jour à partir du jour 0 du cinquième âge jusqu'au début du filage.

Dosage de l'enzyme :

On mesure l'activité de l'amylase avec une procédure à base d'acide dinitrosalicylique qui utilise de l'amidon soluble comme substrat (Bernfeld, 1955 ; Baker, 1991). On incube 50 microlitres d'hémolymphe dans 1,5 ml de tampon phosphate 20mM (pH 6,8) contenant 0,2 % d'amidon soluble et 1 mM de CaCl_2 à 37° C pendant 30 minutes. On estime les maltodextrines libérées en faisant bouillir avec 2ml de solution d'acide dinitrosalicylique pendant 10 minutes et en mesurant l'absorption à 525 nm. Pour les témoins, on ajoute de l'enzyme après l'ajout d'acide dinitrosalicylique. Pour le liquide digestif, les conditions de dosage de l'enzyme sont les mêmes sauf pour le tampon d'incubation qui est du borate à 10 mM (pH 9,2). On utilise du maltose comme étalon et on exprime l'activité de l'enzyme en mg de maltose libéré / mg de protéine / 30 min à 37° C. On mesure la teneur en protéines dans les sources d'enzymes avec la méthode de Lowry (1951).

Electrophorèse :

On fractionne l'hémolymphe de larves du cinquième jour du cinquième âge par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 7,5 % (PAGE) (Gabriel, 1971). Après l'opération, on lave le gel et on l'incube dans 20 mM de tampon phosphate (pH de 6,8) contenant 0,5 % d'amidon soluble et 1 mM de CaCl_2 à 37° C pendant 45 minutes et on le colore avec une solution KI-I₂ (Baker, 1989). On sépare le liquide digestif avec une électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 7,5 % et on révèle l'amylase d'après la description ci-dessus sauf que le tampon d'incubation est du borate de sodium à 10 mM (pH 9,2). L'inversion de la polarité du courant sépare les isozymes cathodiques. On réalise l'électrophorèse à un courant constant de 30 milliampères pendant 4 heures. On scanne ensuite les zymogrammes obtenus.

RESULTATS ET DISCUSSION

On détermine l'activité amylase dans l'hémolymphe des vers à soie *P. ricini* et *A. assama* du jour 0 du cinquième âge jusqu'au troisième jour du filage. Chez les deux espèces, il y a une augmentation de l'activité de l'enzyme pendant le développement larvaire (fig. 1 et 2). Chez *A. assama* l'activité amylase présente une augmentation du 1^{er} au 3^{ème} jour du cinquième âge et une autre poussée du 6^{ème} au 9^{ème} jour après lesquels il se produit une baisse de l'activité. On trouve que l'activité est maximum au stade avant le filage.

On détermine l'activité amylase dans le liquide digestif de *P. ricini* et de *A. assama* du jour 0 du cinquième âge jusqu'au début du filage (Fig. 2). L'activité amylase digestive chez les vers à soie *P. ricini* est plusieurs fois plus élevée que celle de l'hémolymphe. L'activité de l'enzyme chez *A. assama* augmente du jour 0 jusqu'au 3^{ème} jour du cinquième âge, suivie par une autre poussée d'activité du 7^{ème} jour au 9^{ème} jour (Fig. 1). La tendance chez *P. ricini* est similaire avec une augmentation de l'activité de l'enzyme du 1^{er} au 4^{ème} jour, une baisse au milieu de l'âge, suivie par une autre poussée d'activité du 7^{ème} au 9^{ème} jour. L'activité amylase est au moins deux fois plus élevée chez *P. ricini* que chez *A. assama*. On observe l'activité amylase maximum au début et à la fin du cinquième âge. L'hémolymphe de *P. ricini* présente une activité amylase plus basse par comparaison à l'hémolymphe de *A. assama* mais l'activité de l'amylase dans le liquide digestif est le double de celle du liquide digestif de *A. assama*. L'activité plus élevée de l'enzyme du liquide digestif

par comparaison à celle de l'hémolymphe pourrait contribuer à l'efficacité du système digestif qui permet aux vers à soie de s'adapter et de survivre dans des conditions tropicales.

On sépare des échantillons bruts de l'hémolymphe et du liquide digestif de larves de 5 jours du 5^{ème} âge par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec un système de tampon discontinu. L'activité de l'amylase de l'hémolymphe est comparativement faible chez les deux vers à soie quand on la compare à celle du liquide digestif. Cependant, dans les deux cas les bandes anodiques sont distinctes et d'une intensité élevée (Fig. 3). On détecte trois isozymes cathodiques de l'amylase dans le liquide digestif du ver à soie *P. ricini* en plus des anodiques, tandis que le liquide digestif d'*A. assama* révèle seulement des isozymes anodiques (Fig. 3 et 4). Les isozymes anodiques détectés dans l'hémolymphe de *P. ricini* sont similaires à ceux rapportés par Banno et coll., (1984) dans l'hémolymphe de la souche à diapause de *B. mori*. Le profil électrophorétique de l'amylase digestive est différent chez les deux vers à soie. L'activité amylase migre sous la forme de trois bandes cathodiques étroitement espacées chez le ver à soie *P. ricini* tandis que l'hémolymphe de *A. assama* ne présente pas d'activité cathodique (Fig. 4). L'amylase digestive anodique et de l'hémolymphe sont présentes chez les deux vers à soie.

L'activité de l'amylase cathodique dans l'hémolymphe est absente chez les deux vers à soie tandis que seul *P. ricini* présente une activité de l'amylase cathodique dans le liquide digestif (Fig. A). Cela est contradictoire avec les observations d'Abraham et coll., (1992) qui ont rapporté une activité cathodique de l'amylase dans le liquide digestif et dans l'hémolymphe chez toutes les souches sans diapause de *B. mori*. Les deux vers à soie étudiés dans ce cas sont des vers à soie non-mûrier et cela pourrait expliquer la différence signalée seulement chez des populations distinctes géographiquement de souches polyvoltines sans diapause.

Le profil des bandes de l'amylase cathodique observé chez le ver à soie *P. ricini* ressemble à celui de *Drosophila hydei* (Doane et coll., 1975) et de l'être humain (Karn et Rosenblum, 1975). Karn et Rosenblum (1975) ont montré que chez les êtres humains l'hétérogénéité de l'isozyme de l'amylase est due à la déamidation, une modification post traductionnelle. Il est possible que les formes multimériques de l'isozyme de l'amylase observées dans l'enzyme digestive du ver à soie *P. ricini* soient le résultat de modifications post-traductionnelles telles que l'amidation ou elles pourraient être une forme multimérique du même polypeptide.

L'augmentation de l'activité de l'enzyme pourrait signifier l'adaptation du ver à soie *P. ricini* qui survit dans des conditions tropicales. On a rapporté l'efficacité des amylases dans la survie chez des espèces d'insectes telles que *Tenebrio molitor* (Buonocore et coll., 1976). Dans l'ensemble, le ver à soie *A. assama* a une activité amylase plus faible par comparaison au ver à soie *P. ricini*. Cette faible activité de l'amylase chez les vers à soie *A. assama* pourrait être l'une des raisons du taux de mortalité élevé de ce ver à soie pendant les saisons de l'été et de l'hiver.

On n'a pas encore complètement compris la fonction de l'amylase de l'hémolymphe bien que Wyatt (1967) ait suggéré son implication possible dans la dégradation du glycogène du corps gras. La présence de cette enzyme en abondance pendant le développement larvaire indique que cette enzyme a un rôle physiologique important. La régulation développementale de l'amylase digestive et l'expression des formes anodiques que l'on observe seulement chez les vers à soie *A. assama* font de l'amylase digestive un candidat intéressant pour l'étude de sa biologie moléculaire.

STUDIES ON *IN SITU* ORGANIC FARMING FOR EFFICIENT WATER CONSERVATION AND SOIL FERTILITY MANAGEMENT UNDER DRY FARMING MULBERRY

B. N. SUHSHEELAMMA, S. B. DANDIN, C. K. KAMBLE* & PRITHIVIRAJE URS

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

In Asian and African countries, water resources are limited. The question often arises as to what happens to rainfall received every year by different sites. If the rain water is not properly harvested and conserved, nearly 60% of rain water runs off from the plots.

The sericulture belt of dry farming areas represents the characteristic features having erratic rainfall coupled with high temperature, high evapo-transpiration and poor soil fertility. Most of the dry farming sericulturists do not give importance for the formation of bunds to prevent run off loss and contour bunds to conserve the rainwater. Organic matter is the key constituent of cultivated soils having profound influence on the physio-chemical and biological characteristics of the soil. Therefore, a simple technology was developed at RSRS, Chamarajanagar of CSR&TI, Mysore for efficient conservation of rainwater. Bunds and contour bunds were formed surrounding the plot to conserve rainwater. Application of bio-fertilizer was followed by formation of deep furrows and gullies, which were filled with neem leaf. After record of second leaf harvest sun hemp a green manure crop was cultivated and mulched with soil. The application of bio-fertilizer, neem leaf coupled with cultivation of green manure crop helped to increase soil moisture near root zone by efficient conservation of rainwater. The leaf yield recorded during rainy season was maximum due to efficient water conservation in insitu organic farming plot in comparison to control. The average of three years leaf data recorded from insitu organic farming plot was 15.242 kg/ha/yr with S-13 variety whereas control plot leaf yield was 10762 kg / ha / yr. This increase in leaf yield helps sericulturists to have more layings brushing capacity and thereby increase in cocoon production. Therefore, the adoption of this simple technology resulted not only in improvement of soil moisture, soil fertility and soil organic matter but also in improvement of leaf productivity and also control of weeds and pests.

INTRODUCTION

India is the second largest producer of silk. But the silk productivity per hectare is about 61.00 kg, which is far less compared to other advanced sericultural countries like China, Japan, etc. With the development of sericulture industry and relevant increase in technical know-how, it is necessary to develop simple technologies which improve soil fertility and water conservation and in turn improve leaf productivity. The importance of the bio-fertilizer in mulberry cultivation, soil organic matter utilization, soil health care and soil fertility management are yet to make a prominent mark in mulberry cultivation (Kashiviswanathan *et al.*, 1980, Bongale and Dandin, 1993, Gopinath and Shankar, 1996 and Gourley *et al.*, 1994). Increasing the inputs such as fertilizers, plant protection chemicals, irrigated waters have been used with little reliance on maintenance of soil organic matter. Consequently, the traditional agronomical practices such as green manuring, organic farming and composting have not

* Regional Sericultural Research Station, Nanjangud Road, Chamarajanagar.

become part of farming systems (Vyas *et al.*, 1998). This has resulted in a slow but steady decline in the productive and reproductive capacity of the soil. In a natural eco-system equilibrium gets disturbed.

Organic matter is one of the most important constituents of the soil and from antiquity man has recognised its importance in regulating soil fertility at desirable levels. Organic farming is the only means to achieve the stable / sustainable target of production (Ravisankar *et al.*, 2002). It is feasible by adopting multi-dimensional approach, which involves co-ordination and interaction between several major or minor factors, the cumulative effects of which are quite encouraging. Insitu organic farming is the only redressal in this behalf. The constituents of insitu organic farming can be (i) integrated plant nutrient supply (ii) integrated insect, pest and disease management and integrated soil and water management (Vyas *et al.*, 1998). In Asian countries, dry farming tract has low soil fertility, on account of erosion both by wind and water (Darra and Kalyan Hironi, 1973). The prime object of soil and water conservation programme is to treat each unit area of land as per its requirement capabilities so as to attain higher and sustained production. The cultivation of sun hemp (*Crotolaria juncea*) as green manure under semi-arid conditions in rice crops, 42% increase in yield was obtained in field experiments (Subramanian and Dorairaj, 1952 ; Watanabe, 1984 and Subba Rao, 1988). Bio-fertilizers harness atmospheric nitrogen with the help of specialized soil micro-organisms. Such nitrogen fixing micro-organisms are either free living in soil or symbiotic with plants and directly or indirectly contribute towards the nitrogen nutrition of plants (Subba Rao, 1988).

More than 40% of the land in India is cultivated either under dry farming or insufficient irrigation condition. The rural farmers who cultivate mulberry as dry farming constitute resource base for major sericulture programmes. Majority of rural sericulture farmers are either small or marginal. The increase in productivity in sericulture provides a significant boost to the economic growth of the country as well as improved income distribution within the country. Earlier work carried out by adoption of physical methods for water conservation was able to give a leaf yield of only 12 000 kg / ha / yr with S-13 variety (Susheelamma *et al.*, 1992). Therefore, to have further improvement in leaf productivity, this simple technology was developed through insitu organic farming at Regional Sericultural Research Station, Chamaraajanagar of CSR&TI, Mysore.

METHODOLOGY

The experiment was taken in two years old plantation with improved drought resistant variety, S-13. The experimental plots were pruned during July only after the onset of monsoon. The ploughing was done with iron plough to remove the weeds followed by application of bio-fertilizer at the rate of 20 kg/ha in two split doses (10 kg per dose), which was applied near the plants. The bunds and contour bunds were formed as shown in figure 4 to have efficient rain water conservation. After 15 days of application of bio-fertilizer, furrows of 20 cm depth were made in between the rows. The gullies measuring 2 feet length, one foot in width and one foot in depth were made between the rows as shown in the figure 5. The fresh neem leaf available in the farm was collected and applied in the furrows as well as gullies as shown in the figure 6 at the rate of 5000 kg / ha / year. One hundred and fifty kg single super phosphate, 2 kg zinc sulphate and 2 kg ferrous sulphate were mixed with neem leaf. On application of neem leaves, furrows and gullies were covered with soil.

After three months, the plot was ploughed, so that insitu organic manure developed was mixed well with the soil. The control plot was given 10 M. tons of Farm Yard Manure and N: P: K in the ratio of 100 : 50 : 50 as per the recommendation (Krishnaswami, 1978). After second crop harvest, ie during first week of October, 10 kg of bio-fertilizer was applied near the plants. During last week of October, 10 kg of bio-fertilizer was applied near the plants. During last week of October, 60 kg of sun hemp (*Crotolaria juncea*) was sown in between the rows. After 40 days of sowing i. e., during first week of January, sun hemp plants were mulched thoroughly in the soil by deep ploughing. The rainfall recorded during 1998 to 2001 during different months of the years is depicted in Figure 1.

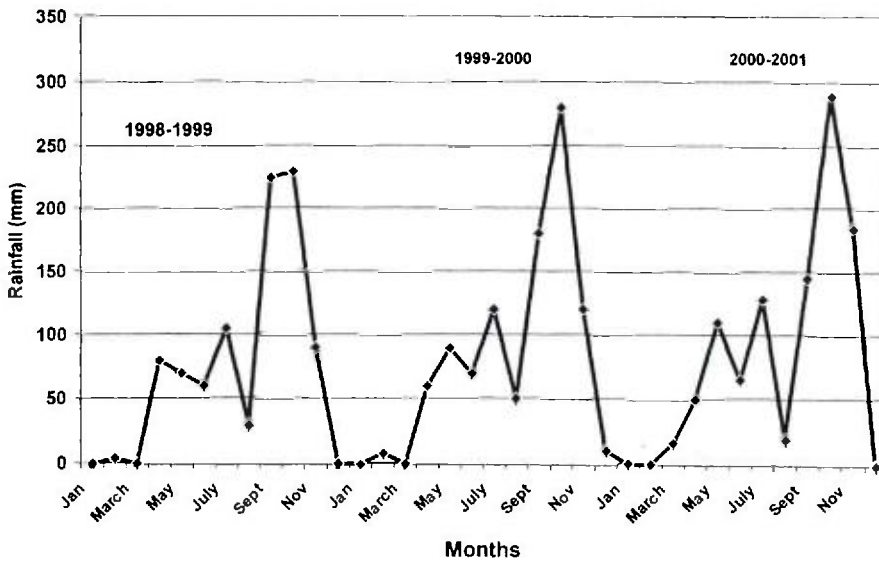


Fig. 1. Rainfall data of Chamaraajanagar during 1998-2001 (mm).

Fig. 1. Données sur les précipitations à Chamaraajanagar de 1998 à 2001 (mm).

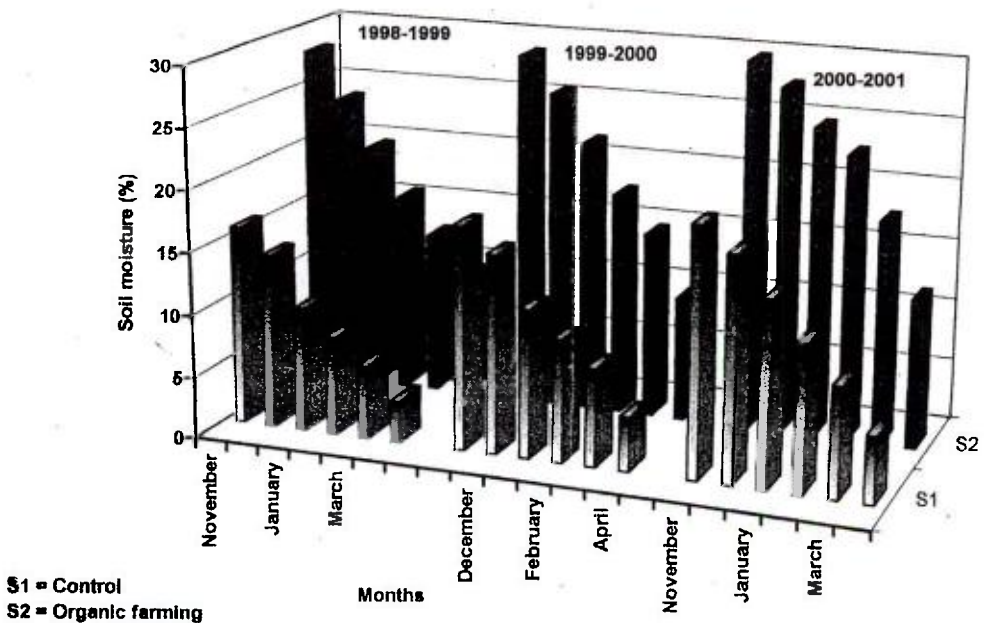


Fig. 2. Soil moisture data collected *in situ* organic manuring plot and control plot from Nov. to April (1998-2001).

Fig. 2. Données sur l'humidité du sol recueillies *in situ* sur la parcelle de fumure biologique et sur la parcelle témoin de Nov. à Avril (1998-2001).

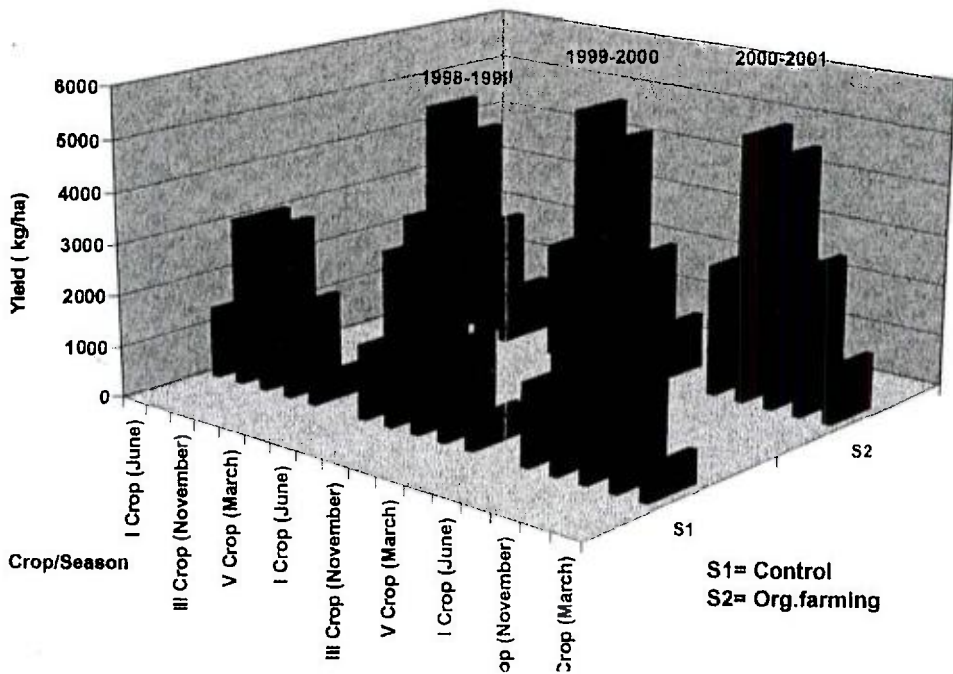


Fig. 3. Season wise / cropwise leaf yield data of insitu organic farming plot and control plot.

Fig. 3. Données sur le rendement foliaire en fonction de la saison / de la récolte sur la parcelle de fumure biologique et sur la parcelle témoin.

During 6 months period (non-rainy season), soil moisture was recorded from surface soil starting from November in control plot and insitu organic manure plot. The soil moisture percentage of insitu organic manure plot was 30.00 (November), 28.00 (December) 25.00 (January), 23.00 (February) 18.00 (March) and 12.00 (April) and in the control plot the respective values were 20.00, 18.00, 15.00, 12.00, 8.00 and 5.50 during 2000-2001 and the same is depicted in Figure 2.

OBSERVATIONS

The leaf yield recorded during 1998-99, 1999-2000 and 2000-2001 is depicted in Figure 3. The leaf yield recorded during rainy season was maximum due to efficient water conservation in the insitu organic farming plot in comparison to control plot. The average of three years leaf yield data recorded from insitu organic manure plot was 15242 kg / ha / yr, whereas control plot leaf yield was 10 762 kg / ha / ya. The percentage of improvement in leaf yield was 41.81% due to efficient water conservation and soil fertility management through insitu organic farming. The pH of the soil was reduced by 0.5 The leaf moisture recorded indicated a 4% increase insitu organic farming plot leaf over control plot leaf during non-rainy season. The cocoon yield was 50 kg for 100 dfls with leaf fed from insitu organic farming whereas the cocoon yield was 40 kg for 100 dfls with the leaf fed from control plot.



Fig. 4. Formation of gullies in the farmer's garden for efficient water conservation.

Fig. 4. Formation de rigoles dans la mûraie pour une conservation efficace de l'eau.



Fig. 5. Application of neem leaf in the gully as *in situ* organic farming.

Fig. 5. Application de feuilles de margousier dans la rigole dans le cadre de la culture biologique in situ.

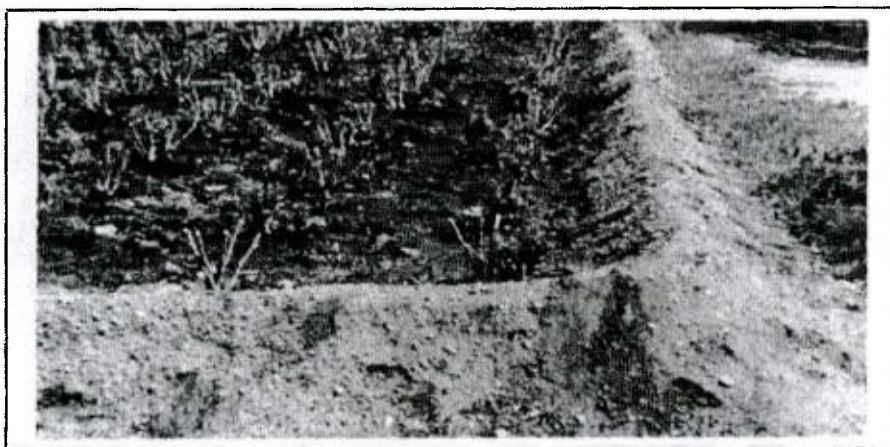


Fig. 6. Bund formation for efficient soil fertility management and water conservation in the *in situ* organic farming.

Fig. 6. Formation de digue pour une gestion de la fertilité du sol et une conservation de l'eau efficaces avec la culture biologique *in situ*.

The incidence of common diseases like thukra and leaf roller, which are common menace to the dry farming mulberry were found in negligible percentage in situ organic manure plot and 11% and 13% respectively in control plot. This technology was tested with limited number of farmers field during 2000-2001 and got the same encouraging results.

Advantages of technology developed:

Maximum utilisation of natural resources available in the farm for insitu organic farming.

Efficient conservation of rainwater received during rainy season.

Efficient utilisation of soil moisture by the mulberry plants during non-rainy season and reduction in evapo-transpiration.

Controls soil erosion due to wind.

Improvement in soil fertility and soil health.

Increase in soil organic carbon and nitrogen content.

Control of weeds.

Acts as organic amendment and reduces the pH of the soil by 0.5.

Control of thukra and leaf roller diseases.

DISCUSSION

The formation of bunds and contour bunds surrounding and in between the plots resulted in efficient rain water conservation and in turn helped to increase the soil moisture and leaf productivity. This observation is in conformation with the finding of Sushelamma *et al.*, (1992) in mulberry and Darra and Kalyan Hironi (1993) in forage crops. The application of neem leaves helped to increase the organic carbon content and soil fertility ant to reduce the pest incidence. This observation is in conformation with the findings of Gopinath and Shankar (1996). Cultivation of green manure helped

to increase the soil fertility and water holding capacity of the soil. Further, it helped to control the weeds. Therefore, the leaf yield recorded in insitu organic farming plots showed 41.81% increase over control plot. This finding is in confirmation with the findings of Watanabe (1984) and Subba Rao, (1988) in rice. Application of neem leaves coupled with cultivation of green manure acted as soil amendment to reduce the pH of the soil and also to control tukra and leaf roller disease.

CONCLUSION

This technology is very useful under dry farming mulberry for efficient utilization of rainwater which in turn helps to improve the leaf productivity. It is eco-friendly and increases the soil fertility as a result of which sericulturists can boost their productivity with minimum expenditure. It could also be adopted even in semi-irrigated condition for effective utilization of water. In Asian and African countries, where dry farming sericulture is in prevalent this technology could be adopted for better prosperity of sericulture.

REFERENCES

- BONGALE U. D. & DANDIN S. B. (1993) Nitrogen fixing bacterial bio-fertilizers. *Indian Silk* 32: 28-33.
- DARRA D. L. & KALYAN HIRONI (1993) Soil and water conservation planning and strategies in Rajasthan. In "Integrated water use management" ed by M. L. Gupta and R. K. Gurjan Raawat Publication New Delhi pp 83-93.
- GLENN O. SCHWAB, DELMAR D., FANGMEIER, WILLIAM J. ELLIOT & RICHARD K. (1993) Runoff of rainwater. In "Soil and water conservation engineering " John Wiley and sons. Inc. New York, pp. 68.
- GOPINATH G. R. & SHANKAR M. A. (1996) Farming with nature in sericulture. In *Global silk Scenario 2001*. Proc. Of the International conference on Sericulture. Oxford and IBH. Publishing Co. Pvt. Ltd. Pp 135-142.
- GOURLEY C. J. P., ALLAN, D. L. & RUSSEL M. P. (1994) Plant nutrient efficiency: A comparison of definitions and suggested improvement. *Plant and soil* 158: 29-37.
- KRISHNASWAMI S. (1978) Bulletin on mulberry cultivation, CSB Publication.
- MEDINA JORGE (1976) Harvesting surface runoff and ephemeral stream flow in arid zones. In *Conservation in arid and semi-arid zones*. FAO conserv. Guide 3, Food and Agriculture Organisation, Rome, Italy p 61-73.
- RAVISHANKAR N., CHANDRASHEKHARAN B. & SHIVA KUMAR C. (2002) Management of plant nutrients for efficient use of water. *Agric. Rev.* 23: 23-30.
- SUBRAMANIAN M. K. V. & DORAIRAJ K. (1952) Green manuring for semi-dry paddy Madras. *Agric. J.* 39: 157-159.
- SUBBA RAO N. S. (1988) Green manure. In *Bio-fertilizers in agriculture*. Oxford and IBH Publishing. Co. Pvt. Ltd. New Delhi. Pp. 126-128.
- SUSHEELAMA B. N., JOLLY M. S., SENGUPTA K., GIRDHAR K., BAKSH S., MOGILI T., MALLIKARJUNA R. S. & PAVAN KUMAR T. (1992) Statistical analysis of adaptability of drought resistant mulberry genotypes. *Sericologia* 32: 619-628.
- WATANABE I. (1984) Use of green manure in North East Asia in organic matter and rice. The international Rice Research Institute, Las Benos, Philippines. Pp 229-234.

ETUDES SUR L'AGRICULTURE BIOLOGIQUE *IN SITU* POUR UNE GESTION EFFICACE DE LA CONSERVATION DE L'EAU ET DE LA FERTILITE DU SOL DANS LE CADRE DE LA CULTURE DU MURIER EN ZONE SECHE

B. N. SUSHEELAMMA, S. B. DANDIN, C. K. KAMBLE* & PRITHIVIRAJE URS

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

Dans les pays asiatiques et africains, les ressources en eau sont limitées. Il se pose souvent la question de savoir ce qui arrive chaque année aux précipitations dans les différents sites. Si on ne recueille et on ne conserve pas l'eau de pluie correctement près de 60 % de l'eau de pluie disparaît des parcelles.

*La ceinture séréricole des zones de cultures sèches présente comme trait caractéristique d'avoir des précipitations irrégulières associées à une température élevée, une évapo-transpiration élevée et une mauvaise fertilité du sol. La plupart des sériculteurs des zones sèches n'accordent pas d'importance à la formation de digues pour empêcher la perte due à l'évaporation et de digues de contour pour conserver l'eau de pluie. La matière organique est le constituant clé des sols cultivés et elle a une influence profonde sur les caractéristiques physico-chimiques et biologiques du sol. On a donc mis au point une technologie simple au RSRS du CSR&TI de Chamarajanagar, à Mysore pour conserver efficacement l'eau de pluie. On forme des digues et des digues de contour qui entourent les parcelles pour conserver l'eau de pluie. Après avoir appliqué de l'engrais biologique, on procède à la formation de sillons et de rigoles profonds qui sont remplis de feuilles de margousier. Après la deuxième récolte de feuilles, on cultive du chanvre, un engrais vert et on le paille avec le sol. L'application de l'engrais biologique sous forme de feuilles de margousier associée à la culture d'engrais vert permet l'augmentation de l'humidité du sol près de la zone de la racine grâce à une conservation efficace de l'eau de pluie. Le rendement foliaire enregistré pendant la saison des pluies est maximum grâce à la conservation efficace de l'eau sur une parcelle de culture biologique *in situ* par comparaison au témoin. La moyenne des données foliaires sur trois ans enregistrée sur la parcelle d'agriculture biologique est de 15 242 kg / ha / année avec la variété S13 tandis que le rendement foliaire de la parcelle témoin est de 10 762 kg / ha / année. L'augmentation du rendement foliaire aide les sériculteurs à avoir une capacité de montée des pontes plus importante et augmente ainsi la production de cocons. L'adoption de cette technologie simple permet donc non seulement l'amélioration de l'humidité du sol, de la fertilité du sol et de la matière organique du sol mais aussi l'amélioration de la productivité foliaire et aussi la lutte contre les mauvaises herbes et les parasites.*

INTRODUCTION

L'Inde est le deuxième plus grand producteur de soie. Mais la productivité de la soie par hectare est d'environ 61 kg, ce qui est beaucoup moins que dans d'autres pays avancés sur le plan séréricole comme la Chine, le Japon, etc... Avec le développement de l'industrie séréricole et l'augmentation du savoir-faire technique qui en résulte, il est nécessaire de mettre au point des technologies simples qui améliorent la fertilité du sol et la conservation de l'eau et à leur tour permet d'augmenter la productivité foliaire. Les engrais biologiques, l'utilisation de la matière organique du sol, l'entretien

du sol et la gestion de la fertilité du sol n'ont pas encore fait leur entrée dans la culture du mûrier (Kashiviswanathan et coll., 1980 ; Bongale et Dandin, 1993 ; Gopinath et Shankar, 1996 et Gourley et coll., 1994). On a augmenté les apports tels que les engrais, les substances chimiques de protection des plantes, les eaux d'irrigation sans se soucier de conserver la matière organique du sol. Les pratiques agronomiques traditionnelles telles que les engrais verts, l'agriculture biologique et le compost ne font donc pas partie des systèmes d'agriculture (Vyas et coll., 1998). Cela a entraîné un déclin lent et régulier de la capacité reproductive et productive du sol. Dans un écosystème naturel, l'équilibre est dérangé.

Les matières organiques sont l'un des constituants les plus importants du sol et depuis l'antiquité l'homme a reconnu leur importance pour réguler la fertilité du sol à des niveaux désirables. L'agriculture biologique est le seul moyen d'obtenir un objectif de production stable / durable (Ravisankar et coll., 2002). Cela est faisable en adoptant une approche multidimensionnelle, qui comprend la coordination et l'interaction entre plusieurs facteurs majeurs ou mineurs, dont les effets cumulatifs sont assez encourageants. La culture biologique *in situ* est le seul remède dans ce domaine. Les constituants de l'agriculture biologique peuvent être (i) l'apport intégré de nutriments des plantes (ii), une gestion intégrée des insectes, des parasites et des maladies et la gestion intégrée du sol et de l'eau (Vyas et coll., 1998). Dans les pays asiatiques, le sol dans les zones de culture sèche est peu fertile, à cause de l'érosion à la fois par le vent et l'eau (Darra et Kalyan Hironi, 1973). Le principal objectif du programme de conservation du sol et de l'eau est de traiter chaque unité de surface de terre d'après ses besoins de manière à obtenir une production plus élevée et durable. Avec la culture du chanvre (*Crotolarai juncea*) comme engrais vert dans les conditions semi-arides de culture du riz, on obtient une augmentation de 42 % dans des expériences sur le terrain (Subramanian et Dorairaj, 1952 ; Watanabe, 1984 et Subba Rao, 1988). Les engrais biologiques exploitent l'azote atmosphérique à l'aide de micro-organismes spécialisés du sol. De tels micro-organismes qui fixent l'azote vivent soit librement dans le sol ou en symbiose avec les plantes et contribuent directement ou indirectement à la nutrition en azote des plantes (Subba Rao, 1988).

Plus de 40 % de la terre en Inde est cultivée soit dans des conditions de culture sèche ou dans des conditions d'irrigation insuffisante. Les fermiers qui cultivent le mûrier en zone de culture sèche sont la ressource de base pour les principaux programmes de sériciculture. La majorité des sériciculteurs ruraux sont soit petits soit marginaux. L'augmentation de la productivité de la sériciculture apporte une augmentation significative de la croissance économique du pays ainsi qu'une amélioration de la distribution des revenus à l'intérieur du pays. Les études précédentes réalisées grâce à l'adoption de méthodes physiques pour la conservation de l'eau ont pu donner un rendement de seulement 12 000 kg / ha / année avec la variété S-13 (Susheelamma et coll., 1992). Nous avons donc mis au point cette technologie simple grâce à l'agriculture biologique à la *Regional Sericultural Research Station*, à Chamarajanagar, du CSR&TI de Mysore pour obtenir une amélioration supplémentaire de la productivité foliaire.

METHODOLOGIE

On a réalisé l'expérience sur une plantation de deux ans, avec une variété améliorée résistante à la sécheresse S-13. On taille les parcelles expérimentales en juillet après le commencement de la mousson. On laboure avec une charrue en fer pour enlever les mauvaises herbes et on procède à l'application d'engrais biologiques au taux de 20 kg / ha en deux doses séparées (10 kg par dose), que l'on applique près des plants. On procède à la formation de digues et de digues de contour, comme le montre la figure 4, pour avoir une conservation efficace de l'eau de pluie. Après 15 jours d'application d'engrais biologique, on fait des sillons de 20 cm de profondeur entre les rangées. On fait des rigoles mesurant 60 cm de longueur, 30 cm de largeur et 30 cm de profondeur entre les rangées comme le montre la figure 5. On récolte les feuilles de margousier fraîches disponibles dans la mûraie et on les applique dans les sillons et dans les rigoles comme le montre la figure 6 au taux de 5000 kg

/ ha / année. On mélange cent cinquante kilos de super phosphate, 2 kg de sulfate de zinc et 2 kg de sulfate de fer avec les feuilles de margousier. Lors de l'application des feuilles de margousier, on recouvre les sillons et les rigoles avec de la terre.

Trois mois après, on laboure la parcelle, de sorte que le fumier organique *insitu* se mélange bien avec le sol. On applique 10 tonnes de fumure et du N : P : K : dans un rapport 100 : 50 : 50 dans la parcelle témoin d'après les recommandations (Krishnaswami, 1978). Après la deuxième récolte, c'est à dire pendant la première semaine d'octobre, on applique 10 kg d'engrais biologique près des plants. Pendant la dernière semaine d'octobre, on sème 60 kg de chanvre (*Crotalaria juncea*) entre les rangées. Quarante jours après les semailles c'est à dire pendant la première semaine de janvier, on procède au paillage avec soin des plants de chanvre dans le sol en labourant profondément. Les précipitations enregistrées de 1998 à 2001 pendant les différents mois de l'année sont présentées dans la Figure 1. On enregistre l'humidité du sol à la surface du sol pendant 6 mois (saison sans pluie), en commençant en novembre dans la parcelle témoin et dans la parcelle de fumier *in situ*. Le pourcentage d'humidité du sol de la parcelle de fumier *in situ* est de 30,00 (novembre), 28,00 (décembre) 25,00 (janvier), 23 (février) 18,00 (mars) et 12 (avril) et dans la parcelle témoin les valeurs respectives sont de 20, 18, 15, 12, 8 et 5,50 de 2000 à 2001 comme le montre la Figure 2.

OBSERVATIONS

Le rendement foliaire enregistré de 1998 à 99, de 1999 à 2000 et de 2000 à 2001 est présenté dans la Figure 3. Le rendement foliaire enregistré pendant la saison des pluies est maximum en raison de la conservation efficace de l'eau dans la parcelle d'agriculture biologique *in situ* par comparaison à la parcelle témoin. La moyenne des données pour le rendement foliaire en trois ans enregistrée *in situ* sur la parcelle d'engrais biologique est de 15 242 kg / ha / année tandis que le rendement foliaire de la parcelle témoin est de 10 762 kg / ha / année. Le pourcentage d'amélioration du rendement foliaire est de 41,81 % en raison de la conservation efficace de l'eau et de la gestion de la fertilité du sol grâce à l'agriculture biologique. Le pH du sol diminue de 0,5. L'humidité de la feuille indique une augmentation de 4 % dans la feuille provenant de la parcelle d'agriculture biologique *in situ* par rapport à la feuille provenant de la parcelle témoin pendant la saison sans pluie. Le rendement en cocons est de 50 kg pour 100 pontes saines pour un nourrissage avec des feuilles provenant de l'agriculture biologique *in situ* tandis que le rendement en cocons est de 40 kg pour 100 pontes saines avec un nourrissage à base de feuilles du lot témoin. L'incidence des maladies courantes comme le tukra et l'enrouleur de la feuille qui sont une menace courante dans la zone de culture sèche du mûrier s'avère négligeable en pourcentage dans la parcelle d'engrais biologique *in situ* et de l'ordre respectivement de 11 % et 13 % chez le lot témoin. On a testé cette technologie avec un nombre limité de mûraies de 2000 à 2001 et obtenu les mêmes résultats encourageants.

Les avantages de cette technologie sont les suivants :

Utilisation maximum des ressources naturelles disponibles dans la mûraie pour une agriculture biologique *in situ*.

Conservation efficace de l'eau de pluie reçue pendant la saison des pluies.

Utilisation efficace de l'humidité du sol par les plants de mûrier pendant la saison sans pluie et diminution de l'évapo-transpiration.

Lutte contre l'érosion due au vent.

Amélioration de la fertilité du sol et de l'état du sol.

Augmentation du carbone organique du sol et de la teneur en azote.

Lutte contre les mauvaises herbes.

Action d'amendement biologique et réduction du pH du sol de 0,5.

Lutte contre les maladies de la tukhra et de l'enrouleur de la feuille.

DISCUSSION

La formation des digues et des digues de contour autour et entre les parcelles entraîne une conservation efficace de l'eau de pluie et elles permettent à leur tour d'augmenter l'humidité du sol et la productivité foliaire. Cette observation est en accord avec celles de Sushelamma et coll., (1992) chez le mûrier et de Darra et Kalyan Hironi (1993) chez les cultures fourragères. L'application de feuilles de margousier permet d'augmenter la teneur en carbone organique et la fertilité du sol et de réduire l'incidence des parasites. Cette observation est en accord avec celles de Gopinath et Shankar (1996). La culture d'engrais vert permet d'augmenter la fertilité du sol et la capacité de rétention de l'eau dans le sol. De plus, elle permet de lutter contre les mauvaises herbes. Le rendement foliaire enregistré dans les parcelles de culture biologique *in situ* montre une augmentation de 41,81 % par rapport à la parcelle témoin. Cette observation confirme celles de Watanabe (1984) et de Subba Rao, (1988) chez le riz. L'application de feuilles de margousier associée à la culture d'engrais vert amende le sol et réduit le pH du sol et permet aussi de lutter contre la maladie du tukra et de l'enrouleur de la feuille.

CONCLUSION

Cette technologie est très utile dans le cadre de la culture du mûrier en zone sèche pour une utilisation efficace de l'eau de pluie, ce qui permet d'améliorer la productivité foliaire. Elle ne nuit pas à l'environnement et augmente la fertilité du sol, en conséquence les sériciculteurs peuvent augmenter leur productivité avec un minimum de dépenses. Elle pourrait aussi être adoptée même dans des conditions de semi-irrigation pour une utilisation efficace de l'eau. Dans les pays asiatiques et africains, où la sériciculture en zone sèche domine, on pourrait adopter cette technologie pour une meilleure prospérité de la sériciculture.

REGENERATION OF ENCAPSULATED APICAL BUDS OF MULBERRY VARIETY – S54 (*MORUS INDICA* L.)

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

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

*In the present study, non-embryogenic vegetative propagule apical buds excised from in vitro shoots of mulberry variety-S54 (*Morus indica* L.) were utilized for encapsulation to investigate their morphogenetic response. It was observed that 4% Sodium alginate dipped in 50mM CaCl₂ solution and incubated for 40 mins in orbital shaker was found to be the best matrix and complexing agent respectively to produce firm, transparent and uniform synthetic seeds. These synthetic seeds were stored at 4° C for 1-6 months to study their viability. Further, the encapsulated apical buds when cultured on LS medium fortified with BAP (2 mg l⁻¹) and TIBA (1 mg l⁻¹) showed 96% germination response. Plants regenerated from the apical bud synthetic seeds were hardened off and transferred to soil. This technology can be adopted for ex-situ germplasm conservation of commercially important mulberry varieties.*

Keywords: Apical buds, encapsulation, Sodium alginate, regeneration, *Morus indica*.

Abbreviations : LSBM - Linsmaier and Skoog's basal medium.
BAP - 6 – Benzyl amino purine.
TIBA - Tri iodo benzoic acid.
CaCl₂ - Calcium chloride.

INTRODUCTION

The synthetic seed technology has gained considerable attention in plant biotechnology as a potential cost-effective clonal propagation system (Pattnaik and Chand, 2000). At present, a few reports are available on successful synthetic seed production and plantlet regeneration using somatic embryos for cereals, vegetables, fruits, ornamentals and aromatic plants (Redenbaugh *et al.*, 1991; Ghosh and Sen, 1994; Pattnaik and Debata, 1996; Castillo *et al.*, 1998). However, adequate efforts have not yet been made to explore the possibility of encapsulating non-embryogenic propagules derived *in vitro*. The encapsulated non-embryogenic vegetative propagules could be used for mass clonal propagation of high economically important crops where somatic embryos are not available for encapsulation (Piccioni and Standardi, 1995; Mathur *et al.*, 1989; Ganapathi *et al.*, 1992; Sharma *et al.*, 1994). In addition, these propagules could be useful in conservation of clonal germplasm of elite, endangered plant species (Fabre and Dereudde, 1990; Maruyama *et al.*, 1997).

Mulberry (*Morus* species) is one of the most important plants of sericulture industry. It forms the basic food material for silkworm *Bombyx mori* L. and the bulk of the silk goods produced in the world

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

are from the mulberry silkworm (Rangaswamy *et al.*, 1976). Mulberry is propagated conventionally through stem cuttings or grafting beset with many problems such as successful rooting from stem cuttings or grafting depends on environmental factors, physiological state, compatibility, nutrient and water content (Ohyama and Oka, 1987; Rajan and Ravindran, 1989). Further, seed propagation is not commonly practiced since mulberry is a cross pollinated plant. Under these conditions, synthetic seed technology would be a valuable tool for large-scale clonal propagation and germplasm conservation of mulberry. At present, the use of synthetic seed technology for mulberry propagation is limited to a few species of *Morus indica* (Bapat *et al.*, 1987; Bapat and Rao, 1990).

However, there is no report available at present on the development of synthetic seeds for high yielding mulberry variety – S54 using *in vitro* derived non-embryogenic propagule. Hence, the present study was undertaken to develop a repeatable protocol for encapsulation of apical bud obtained from *in vitro* shoot cultures of Mulberry variety – S54.

MATERIAL AND METHODS

Apical buds from mature tree of mulberry variety – S54 (*Morus indica* L.) were used to initiate *in vitro* cultures. The apical buds were surface sterilized following the standard procedure as described by Kavyashree *et al.*, (2001) and were inoculated on LSBM supplemented with BAP (2 mg l^{-1}) and TIBA (1 mg l^{-1}) to obtain multiple shoots. Cultures were maintained at a temperature of $25 \pm 2^\circ\text{C}$ with a 3000 lux light intensity and Relative Humidity (RH) between 55-60%.

Apical buds excised from well-developed *in vitro* shoots measuring 0.2 cm long were used for encapsulation. Sodium alginate and Carboxy methyl cellulose was added in the range of 2-8% (w/v) to liquid initiation medium separately. For complexation, 25-100 mM Calcium Chloride (CaCl_2) solution was prepared using distilled water. Both the gel matrix and complexing agents were autoclaved at 121°C for 15 mins after adjusting the pH – 5.8. Gel complexation was done by mixing the apical buds with encapsulating agents and dropping these into different concentrations of CaCl_2 solution, incubated in orbital shaker for different time intervals (20 – 60 mins) to obtain uniform beads. The Sodium alginate and Carboxy methyl cellulose embedded apical buds were collected using a sterilized tea strainer and rinsed 2-3 times in sterile water to remove traces of CaCl_2 and were stored in sterile water at 4°C for a period of six months to study their viability. The encapsulated buds were inoculated on LSBM supplemented with BAP (2 mg l^{-1}) and TIBA (1 mg l^{-1}) in order to retrieve plantlets. The regenerated plantlets were transferred to pots containing potting mixture peat:perlite:sand (50 : 25 : 25 v/v) for hardening. The hardened plants were transferred to soil.

RESULTS AND DISCUSSION

In the present investigation, it was noticed that the complexing ability of Sodium alginate and Carboxy methyl cellulose varied considerably. Of the two, Carboxy methyl cellulose failed to complex with CaCl_2 , producing only soft beads in all the four concentrations tested (Table I). This is probably due to differential purity in the mannuronic acid:glucuronic acid ratio as described by Redenbaugh *et al.*, (1986). Further, apical bud capsule formation is also influenced by the concentration of the gel matrix and complexing agent as suggested by Pattnaik and Chand (2000) in mulberry. A 4% solution of Sodium alginate upon complexation with 50mM CaCl_2 (Table II) produced firm, clear, transparent, uniform capsules with an ion exchange duration of 40 mins (Fig. 1, Table III). Lower concentration of Sodium alginate (2%) were not suitable because the resulting beads were too soft to handle and higher concentration of Sodium alginate (6 & 8%) were also not suitable because the beads were very hard and take lot of time to germinate. Further, lower (25 mM) and higher (75 and 100 mM) concentration of CaCl_2 not only prolonged the ion exchange time but also affects the beads quality. This agrees with the findings of Mathur *et al.*, (1989) and Pattnaik and Chand (2000).

Table I. Effect of different concentration of Sodium alginate and Carboxy methyl cellulose on encapsulation of apical buds in Mulberry variety – S₅₄

Tableau I. Effet de différentes concentrations d'alginate de sodium et de carboxy méthyl cellulose sur des bourgeons apicaux de la variété de mûrier – S₅₄.

Types (w/v) and concentrations (%) of gel		No. of beads produced	Quality of beads
<i>Types (p / v) et concentrations (%) de gel</i>		<i>Nbre de grains produits</i>	<i>Qualité des grains</i>
Sodium alginate	2	50	Soft / Tendres
	4	50	Firm / Fermes
	6	50	Hard / Durs
	8	50	Hard / Durs
	2	50	Soft / Tendres
Carboxy methyl cellulose	4	50	Soft / Tendres
	6	50	Soft / Durs
	8	50	Soft / Tendres

Table II. Effect of different concentration of complexing agent Calcium chloride (CaCl₂) on synthetic seed formation of apical buds in Mulberry variety – S₅₄.

Tableau II. Effet de différentes concentrations du complexant chlorure de sodium (CaCl₂) sur la formation de grains synthétiques de bourgeons apicaux de la variété de mûrier S₅₄.

Concentration of CaCl ₂	No. of beads produced	Quality of beads
<i>Concentration en CaCl₂</i>	<i>Nombre de grains produits</i>	<i>Qualité des grains</i>
25 mM	50	Soft and transparent <i>Tendres et transparents</i>
50 mM	50	Firm and transparent <i>Fermes et transparents</i>
75 mM	50	Hard / Durs
100 mM	50	Very hard / Très durs

Table III. Effect of CaCl_2 treatment at different durations on ion exchange process of encapsulated apical buds in Mulberry variety – S₅₄

Tableau III. Effet du traitement au CaCl_2 à différentes durées sur le processus d'échange d'ions des bourgeons de mûrier encapsulés chez la variété de mûrier S₅₄.

Duration (mins)	No. of beads produced	Quality of beads
<i>Durée (mins)</i>	<i>Nbre de grains produits</i>	<i>Qualité des grains</i>
20	50	Soft / <i>Tendres</i>
30	50	Soft / <i>Tendres</i>
40	50	Firm / <i>Fermes</i>
50	50	Hard / <i>Durs</i>
60	50	Very hard / <i>Très durs</i>

Table IV. Percentage of germination response of encapsulated apical buds of mulberry variety – S₅₄ on LSBM+BAP (2 mg l^{-1}) + TIBA (1 mg l^{-1}).

Tableau IV. Pourcentage de germination des bourgeons apicaux encapsulés de la variété de mûrier – S₅₄ sur du LSBM + BAP (2 mg l^{-1}) + TIBA (1 mg l^{-1}).

Duration (Months)	No. of beads stored (4°C)	Culture duration	Germination %
<i>Durée (mois)</i>	<i>Nbre de grains stockés (4°C)</i>	<i>Durée de culture</i>	<i>% de germination</i>
0	50	2 weeks / <i>2 semaines</i>	96
1	50	2 weeks / <i>2 semaines</i>	90
2	50	2 weeks / <i>2 semaines</i>	89
3	50	2 weeks / <i>2 semaines</i>	87
4	50	2 weeks / <i>2 semaines</i>	86
5	50	2 weeks / <i>2 semaines</i>	70
6	50	2 weeks / <i>2 semaines</i>	54

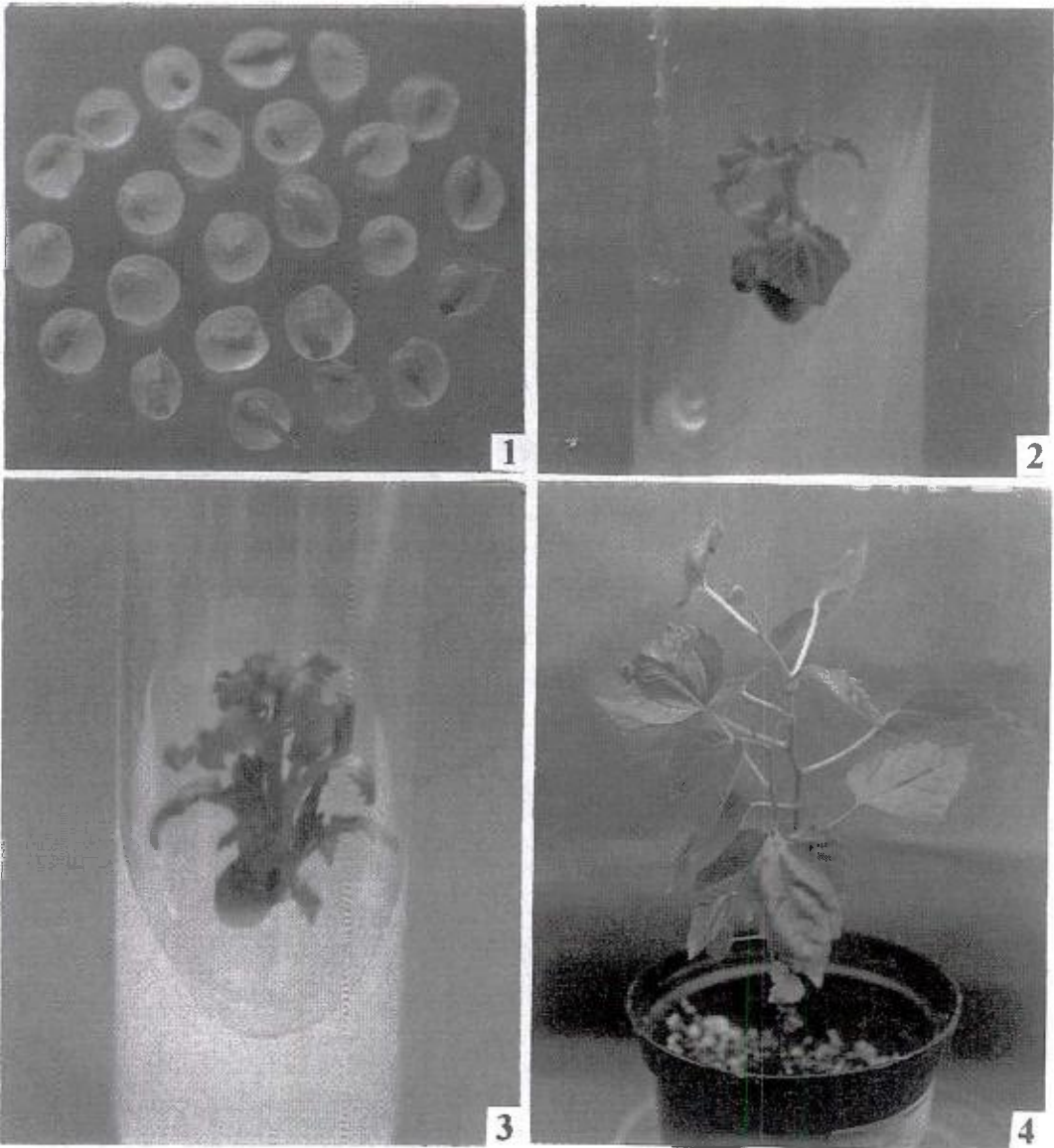


Fig. 1. Encapsulated apical buds of mulberry variety - S₅₄. / **Fig. 1.** Bourgeons apicaux encapsulés de la variété de mûrier S₅₄. **Fig. 2.** Shoot initiation from the capsule after two weeks of culture on LSBM + BAP (2 mg l⁻¹) + TIBA (1 mg l⁻¹). / **Fig. 2.** Début de pousses de la capsule après deux semaines de culture sur LSBM + BAP (2 mg l⁻¹). **Fig. 3.** Multiple shoot formation after four weeks of culture on LSBM + BAP (2 mg l⁻¹) + TIBA (1 mg l⁻¹). / **Fig. 3.** Formation de pousses multiples après quatre semaines de culture sur LSBM + BAP (2 mg l⁻¹). **Fig. 4.** Hardened retrieved plantlet from the capsule. / **Fig. 4.** Plant durci récupéré de la capsule.

The adequate attention has not been directed to storage of encapsulated non-embryogenic vegetative propagule as suggested by Fujii *et al.*, (1987). This has been achieved only in a few plant species, with a various degree of success. However, in the present study, the encapsulated propagules following storage at 4°C for 1-6 months germinated. It was observed in the present study that 1-4 months old beads obtained using 4% Sodium alginate upon complexation with 50 mM CaCl₂ resulted in retrieval of higher percentage (90-86%) of plants (Figs. 2 & 3) with well developed roots when cultured on LSBM supplemented with BAP (2 mg l⁻¹) and TIBA (1 mg l⁻¹) after two weeks, when compared to long period (5-6 months) (Table IV). It is thought that the decline in the germination percentage observed among encapsulating propagules stored for a period of 5-6 months may be due to inhibited respiration of plant tissues by alginate leading to loss of viability as described by Redenbaugh *et al.*, (1987) and Maruyama *et al.*, (1997). The plantlets with appropriate shoots and roots (Fig. 4) were hardened off and transferred to field.

The objective of the present investigation was to explore the possibility of using *in vitro* derived non-embryogenic vegetative propagules for synthetic seed production and to use them for mass clonal propagation, *ex-situ* germplasm conservation and easy transportation of important mulberry varieties to distant places.

ACKNOWLEDGEMENT

Financial assistance provided by Council of Scientific and Industrial Research (CSIR), New Delhi, to one of the authors Kavyashree.R. is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- BAPAT V. A., MHATRE M. & RAO P. S. (1987). Propagation of *Morus indica* L. (mulberry) by encapsulated shoot buds. Plant Cell Rpt. 6: 393-395.
- BAPAT V.A. & RAO P.S. (1990). *In vivo* growth of encapsulated axillary buds of mulberry (*Morus indica* L.) Plant Cell Tiss. Org. Cult. 20: 69-70.
- CASTILLO B., SMITH M.A.L. & Yadav U.L. (1998). Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of *Carica papaya* L. Plant Cell Rpt. 17: 172-176.
- FABRE J. & DEREUDDRE J. (1990). Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of Solanum shoot tips. Cryo-letters. 11: 413-426.
- FUJII J. A., SLADE D., REDENBAUGH K. & WALKER K. A. (1987). Artificial seeds for plant propagation. Trends in Biotech. 5: 335-339.
- GANAPATHI T.R., SUPRASANNA P., BAPAT V.A. & RAO P.S. (1992). Propagation of banana through encapsulated shoot tips. Plant Cell Rpt. 11: 571-575.
- GHOSH B. & SEN S. (1994). Plant regeneration from alginate encapsulated somatic embryos of *Asparagus cooperi* baker. Plant Cell Rpt. 13: 381-385.
- KAVYASHREE R., GAYATRI M.C., & REVANASIDDAIAH H.M. (2001). A repeatable protocol for the production of gynogenic haploid plants in mulberry. Sericologia. 41(3) : 517-521.
- MARUYAMA E., KINOSHITA I., ISHII K., OHBA K. & SAITO A (1997). Germplasm conservation of the tropical forest trees, *Cedrela odorata* L., *Guazuma crinita* Mart. and *Jacaranda mimosaeifolia* D.Don. by shoot tip encapsulation in Calcium alginate and storage at 12-25° C. Plant Cell Rep. 16: 393-396.
- MATHUR J., AHUJA P.S., LAL N. & MATHUR A.K. (1989). Propagation of *Valleriana wallichii* DC. using encapsulated apical and axial shoot buds. Plant Sci. 60 : 111-116.
- OHYAMA K. & OKA S. (1987). Mulberry. In: Bonga J. M. & Durjan D.J. (eds.) Cell and Tissue Culture in Forestry. Vol. 3 , 272-284. Martinus-Nijhoff Publ., The Netherlands.
- PATTHAIK J. & DEBATA B.K. (1996). Germination of artificial seeds of *Cymbopogon martinii*. In: Pank F (ed) Proc. International Symposium Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants. 330-333. Quedlinburg, Germany.

- PATTNAIK S. & CHAND P.K. (2000). Morphogenic response of the alginate-encapsulated axillary buds from *in vitro* shoot cultures of six mulberries. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 60: 177-185.
- PICCIONI E. & STANDARDI A. (1995). Encapsulation of micropropagated buds of six woody species. *Plant Cell Tiss.Org.Cult.* 42: 221-226.
- RAJAN M.V. & RAVINDRAN S. (1989). Propagation methods of mulberry germplasm under tropical conditions. In: Dandin S.B. & Sengupta S. (eds.) *Genetic resources of mulberry and utilization.* (pp 81-86). CSR&TI, Mysore, India.
- RANGASWAMY G., NARASIMHANNA M.N., KASIVISWANATHAN, SASTRY, C.R. & MANJEET S. JOLLY (1976). *Manual on Sericulture. Vol-1. Mulberry cultivation.* Agricultural Service Bulletin No. 15. AGS: ASB/15. Rome: 1-10.
- REDENBAUGH K., FUJII J.A. & SLADE D (1991). Synthetic seed technology. In: Vasil I.K. (ed.) *Scale-up and Automation in Plant Propagation.* (pp 35-74). Academic Press, San Diego.
- REDENBAUGH K., PAASCH B.D., NICHOL J.W., KOSSLER M.E., VISS P.R. & WALKER K.A. (1986). Somatic seeds: encapsulation of asexual plant embryos. *Bio. Technol.* 4: 797-801.
- REDENBAUGH K., SLADE D., VISS P.R. & FUJII J.A. (1987). Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats. *Hort Science* 22: 803-809.
- SHARMA T.R., SINGH B.M. & CHAUHAN R.S. (1994). Production of disease free encapsulated buds of *Zingiber officinale* Rosc. *Plant Cell Rpt.* 13: 300-302.

REGENERATION DE BOURGEONS APICAUX ENCAPSULES DE LA VARIETE DE MURIER S54 (*MORUS INDICA* L.)

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

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

*Dans cette étude, nous avons utilisé des propagules végétales de bourgeons apicaux non embryonnaires coupés sur des pousses in vitro de la variété de mûrier S54 (*Morus indica* L.) pour les encapsuler afin d'étudier leur réponse morphogénétique. On observe que de l'alginate de sodium à 4 % trempé dans 50 mM de solution de CaCl_2 et incubé pendant 40 minutes dans une secoueuse orbitale est le meilleur complexant et la meilleure matrice pour produire des "graines" synthétiques fermes, transparentes et uniformes. On stocke ces "graines" synthétiques à 4°C pendant 1 à 6 mois pour étudier leur viabilité. De plus, quand on cultive les bourgeons apicaux sous capsule sur du milieu LS fortifié avec du BAP (2 mg l^{-1}) et du TIBA (1 mg l^{-1}), ils présentent une réponse de germination de 96 %. On laisse les plants régénérés à partir de "graines" synthétiques de bourgeons apicaux durcir et on les transfère dans le sol. On peut adopter cette technologie pour la conservation ex situ de germoplasmes de variétés de mûrier importantes sur le plan commercial.*

Abréviations : **LSBM** – Milieu de base de Linsmaier et Skoog,
BAP – Benzyl amino purine – 6.
TIBA – Acide tri iodo benzoïque
 CaCl_2 – Chlorure de calcium

INTRODUCTION

On a accordé une attention importante à la technologie de grainage synthétique dans la biotechnologie des plantes comme système potentiel de multiplication clonale (Pattnaik et Chand, 2000). A présent, il existe quelques rapports sur la production réussie de graines synthétiques et la régénération de plants en utilisant des embryons somatiques chez les céréales, les légumes, les fruits et les plantes ornementales et aromatiques (Redenbaugh et coll., 1991 ; Ghosh et Sen, 1994 ; Pattnaik et Debata, 1996 ; Castillo et coll., 1998). Cependant, on n'a pas encore fait les efforts nécessaires pour explorer les possibilités d'encapsuler des propagules végétales non embryonnaires obtenues *in vitro*. Les propagules végétales non embryonnaires encapsulées pourraient être utilisées pour la multiplication clonale en masse de cultures importantes sur le plan économique là où on ne dispose pas d'embryons somatiques à encapsuler (Piccioni et Standardi, 1995 ; Mathur et coll., 1989 ; Ganapathi et coll., 1992 ; Sharma et coll., 1994). De plus, ces propagules pourraient être utiles pour la conservation de germoplasmes clonaux d'espèces de plantes supérieures et en danger (Fabre et Dereuddre, 1990 ; Maruyama et coll., 1997).

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

Le mûrier (espèce *Morus*) est l'une des plantes les plus importantes de l'industrie séricicole. C'est l'alimentation de base du ver à soie *Bombyx mori* L. et la plupart des articles en soie produits dans le monde proviennent du ver à soie du mûrier (Rangaswamy et coll., 1976). La multiplication du mûrier de manière conventionnelle grâce à des boutures de tige ou des greffes est très problématique parce que le racinement à partir de boutures de tige ou de greffes dépend des facteurs environnementaux, de l'état physiologique, de la compatibilité et de la teneur en nutriments et en eau (Ohyama et Oka, 1987 ; Rajan et Ravindran, 1989). De plus, on n'a pas couramment recours à la multiplication par les graines parce que le mûrier est une plante à pollinisation croisée. Dans ces conditions, la technologie de grainage synthétique pourrait être un outil précieux pour une multiplication clonale à grande échelle et pour conserver les germoplasmes de mûrier. A présent, l'utilisation de la technologie de grainage synthétique pour la multiplication du mûrier est limitée à quelques variétés de *Morus indica* (Bapat et coll., 1987 ; Bapat et Rao, 1990).

Cependant, il n'existe pas de rapport disponible à présent sur la mise au point de "graines" synthétiques avec la variété de mûrier à haut rendement – S54 en utilisant une propagule non-embryonnaire obtenue *in vitro*. Ainsi, cette étude a été entreprise pour mettre au point un protocole que l'on pourrait répéter pour encapsuler des bourgeons apicaux obtenus à partir de cultures de pousses *in vitro* de la variété de mûrier – S54.

MATERIEL ET METHODES

On utilise des bourgeons apicaux de la variété de mûrier – S54 (*Morus indica* L.) provenant d'un arbre mature pour démarrer des cultures *in vitro*. On stérilise la surface des bourgeons apicaux en suivant la procédure habituelle décrite par Kavyashree et coll., (2001) et on les inocule sur du LSBM additionné avec du BAP (2 mg l^{-1}) et du TIBA (1 mg l^{-1}) pour obtenir des pousses multiples. On maintient les cultures à une température de $25 \pm 2^\circ \text{C}$ avec une intensité lumineuse de 3000 lux et une humidité relative (HR) comprise entre 55 et 60 %.

On utilise des bourgeons apicaux coupés sur des pousses bien développées *in vitro* mesurant 0,2 cm pour l'encapsulation. On ajoute séparément entre 2 à 8 % (p/v) d'alginate de sodium et de carboxy méthyl cellulose au milieu liquide de départ. Pour la complexation, on prépare une solution de 25-100 mM de chlorure de calcium (CaCl_2) en utilisant de l'eau distillée. On autoclave le gel matriciel et les agents complexants à 121°C pendant 15 minutes après l'ajustement du pH à 5,8. On procède à la complexation du gel en mélangeant les bourgeons apicaux avec les agents d'encapsulation et en les plongeant dans différentes concentrations de solution CaCl_2 , et en les incubant dans une secoueuse orbitale pendant des durées différentes (20 –à 60 min) pour obtenir des graines uniformes. On recueille les bourgeons apicaux inclus dans de l'alginate de sodium et de la carboxy méthyl cellulose en utilisant une passoire à thé stérilisée et en les rinçant 2 à 3 fois dans de l'eau stérile pour enlever les traces de CaCl_2 et on les stocke dans de l'eau stérile à 4°C pendant une période de six mois pour étudier leur viabilité. On inocule les bourgeons encapsulés sur du LSBM additionné de BAP (2 mg l^{-1}) et de TIBA (1 mg l^{-1}) pour obtenir des plants. On transfère les plants régénérés dans des pots contenant un mélange de tourbe : perlite : sable (50 : 25 : 25 v/v) pour les durcir. Puis, on transfère les plants durcis dans le sol.

RESULTATS ET DISCUSSION

Dans cette étude, on remarque que la capacité de complexage de l'alginate de sodium et de la carboxy méthyl cellulose varie considérablement. La carboxy méthyl cellulose n'arrive pas à se complexer avec le CaCl_2 , en ne donnant que des graines tendres avec les quatre concentrations testées (Tableau I). Cela est probablement dû à la pureté différentielle dans le ratio acide mannuronique : acide guluronique comme l'ont décrit Redenbaugh et coll., (1986). De plus, la formation de la capsule est aussi influencée par la concentration du gel matriciel et de l'agent complexant comme l'ont suggéré

Pattnaik et Chand (2000) chez le mûrier. Une solution d'alginate de sodium à 4 % complexée avec 50 mM de CaCl_2 (Tableau II) produit des capsules fermes, claires, transparentes, uniformes avec une durée d'échange d'ions de 40 min (Fig. 1, Tableau III). Les concentrations plus faibles en alginate de sodium (2 %) ne sont pas adaptées parce que les graines qui en résultent sont trop tendres à manipuler tandis qu'une concentration plus élevée en alginate de sodium (6 & 8 %) n'est également pas adaptée parce que les graines sont très dures et mettent beaucoup de temps à germer. De plus, une concentration plus faible (25 mM) et plus élevée (75 et 100 mM) en CaCl_2 prolonge non seulement la durée d'échange d'ions mais a aussi un effet sur la qualité des grains. Cela confirme les observations de Mathur et coll., (1989) et de Pattnaik et Chand (2000).

D'après Fujii et coll., (1987), on n'a pas accordé assez d'attention au stockage des propagules végétales non embryonnaires encapsulées. Il n'a été réussi que chez quelques espèces de plantes, avec un degré de réussite variable. Dans cette étude, les propagules encapsulées après un stockage à 4° C pendant 1 à 6 mois germent. On observe que des grains de 1 à 4 mois obtenus en utilisant de l'alginate de sodium à 4 % complexé avec 50 mM de CaCl_2 donnent un plus grand pourcentage (90 à 86 %) de plantes au bout de deux semaines (Figs 2 et 3) aux racines bien développées quand on les cultive sur du LSBM additionné de BAP (2 mg l^{-1}) et de TIBA (1 mg l^{-1}) par comparaison à une longue période de stockage (5 à 6 mois) (Tableau IV). On pense que le déclin du pourcentage de germination que l'on observe chez les propagules encapsulées stockées pendant une période de 5 à 6 mois pourrait être dû à l'inhibition de la respiration des tissus des plantes par l'alginate, ce qui entraîne une perte de viabilité, comme l'on décrit Redenbaugh et coll., (1987) et Maruyama et coll., (1997). Les plants avec des pousses et des racines correctes (Fig. 4) durcissent et sont transférés sur le terrain.

L'objectif de cette étude est d'explorer la possibilité d'utiliser des propagules végétales non embryonnaires obtenues *in vitro* pour la production de grains synthétiques pour une multiplication clonale en masse, applicable à la conservation des gémoplastes *ex situ* et au transport des variétés de mûrier importantes vers des endroits éloignés.

POPULATION DYNAMICS OF THE ROOT MEALY BUG, *PARAPUTO* SP. ON MULBERRY IN THE HILLS OF DARJEELING

D. DAS, S. BISWAS*, S. SARKAR, S. K. DAS** & S. CHAKRABARTI

Regional Sericultural Research Station, 7th mile, Kalimpong – 734301, West Bengal, India.

*Among the pests causing economic injury to mulberry in the hills of Darjeeling in West Bengal the Root Mealy Bug, **Paraputo** sp. (Pseudococcidae, Hemiptera) was observed to be the most persistent and notorious one.*

*Highest density of this perennial pest was observed at 7.5 cm to 15 cm depth of soil (3.58 ± 2.34 nos. adults + nymphs per plant) on the underground stem and root region of mulberry (**Morus** sp.) during June to September. The population diminished with the fall in atmospheric temperature and humidity. Nymphal population was noted to be double vis a vis the adults (females) from March to August, which remained at par with adults during autumn and winter.*

***Paraputo** sp. was observed to have alternate hosts in some common weeds of the mulberry field of this hilly region like Kuro (**Bidens pilosa**), Titapatty (**Artemisia indica**), Parparey (**Tridax** sp.) and Mothey (**Cyperus rotundus**), but, no specific infestation pattern could be established. Among these weeds Kuro (**Bidens pilosa**) was the most preferred by the mealy bug (0.37 ± 0.72 nos. adults + nymphs per plant).*

Keywords: Root mealy bug, *Paraputo* sp., mulberry, *Morus alba*, pest, population, alternate host, percent infestation.

INTRODUCTION

Among the several pests that infest mulberry in the hills of Darjeeling, West Bengal, India, the root mealy bug, *Paraputo* sp. has been observed to be most persistent and causes appreciable damage to mulberry, directly by sucking the sap and indirectly by making way for some fungal infections leading to rotting of the root and ultimately death of the plants (Biswas *et al.*, 2001). Moreover, high concentration of the mealy bug and desaping by it has been observed to be the reason for loss of vigour, yellowing of leaves and restriction in growth in mulberry (Misra *et al.*, 1996).

The pest was observed to be occurring in this region at an altitude of 2500 ft. and above and using some common weeds in the mulberry field as its alternate hosts (Biswas *et al.*, 2001).

Much work has been done on mealy bugs infesting the aerial parts of plants, but, very limited information is available on root mealy bugs in general and *Paraputo* sp. in particular. However, Wang (1982) identified *Paraputo speciosus* from *Camellia oleifera* (oleosa) in China and a mutually beneficial relationship was noted between *Paraputo anomala* and the ant *Aphomomyrmex afer* (Gaume *et al.*, 2000).

* Present Address : * ICAR Research Complex for NEH Region, Tripura Centre Lembuchera, West Tripura, India.

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

Table I. Seasonal population fluctuations of *Paraputo* sp. at different depths of soil.Tableau I. Fluctuations saisonnières de la population de *Paraputo* sp. à différentes profondeurs du sol.

Month / Year	Percentage Infestation			Number of mealy bugs per plant (adults + nymphs) at different depths of soil			Temperature (°C)		Relative Humidity		Rainfall (mm)
Mois / année	Pourcentage d'infestation			Nb're de cochenilles / plant (adultes + nymphes) à différentes profondeurs du sol					Humidité Relative		Précipitations (mm)
	D1	D2	D3	D1	D2	D3	MAX.	MIN.	MAX.	MIN.	
August -99	56.7	50.0	26.7	5.2	4.5	3.2	26.7	20.6	96	71	609.7
Sept -99	60.0	53.4	48.3	6.6	8.3	8.9	27.4	19.8	96	70	273.8
Oct. -99	36.7	41.7	37.4	3.2	3.0	3.4	26.0	17.5	95	50	131.0
Nov. -99	28.3	30.0	25.0	2.4	2.2	1.3	22.7	14.7	95	55	31.0
Dec -99	28.4	51.7	45.0	1.4	1.0	0.6	20.0	9.5	89	38	2.5
January-00	35.0	36.7	30.0	1.6	2.1	1.7	17.7	8.8	94	45	5.5
Feb -00	23.4	33.3	38.3	1.2	1.1	1.2	17.3	9.0	94	28	18.6
March -00	16.7	40.0	40.0	0.7	1.2	0.8	22.7	12.6	94	26	5.6
April -00	28.3	35.0	31.7	0.8	1.1	0.9	25.71	16.71	95	39	58.9
May -00	23.4	46.7	41.7	1.6	1.9	2.2	26.64	18.84	96	62	69.8
June -00	45.0	53.4	53.4	4.1	3.7	4.5	27.20	21.20	100	65	263.8
July -00	50.0	63.3	51.7	3.0	5.8	5.2	26.20	21.80	100	70	297.0
August-00	56.7	63.4	63.4	6.8	8.7	7.9	26.54	21.62	100	71	359.19
Sept. -00	48.3	56.7	58.4	6.0	7.8	8.1	25.71	19.88	100	53	228.2
Oct. -00	33.3	48.3	46.7	2.0	2.7	3.3	25.70	17.60	100	38	44.5
Nov. -00	46.7	51.7	56.7	3.0	2.7	2.8	21.60	14.40	100	45	3.5
Dec. -00	38.3	41.7	40.0	3.3	1.9	3.1	19.60	10.20	88	46	0
January-01	28.3	45.0	53.3	1.3	2.7	3.7	17.60	9.36	100	46	0
Feb. -01	13.3	31.7	35.0	0.7	1.2	2.0	19.30	11.50	100	40	9.7
March -01	31.7	43.3	40.0	0.8	1.5	1.9	23.30	13.10	90	33	0
April -01	20.0	50.0	35.0	1.4	4.9	3.1	27.00	16.67	91	52	29.3
May -01	43.4	48.4	33.3	6.9	3.9	3.1	25.92	18.54	96	60	84.8
June -01	46.7	55.0	56.7	6.6	6.5	7.1	27.38	20.69	95	76	419.6
July -01	51.7	51.7	46.7	7.1	5.0	4.2	27.70	22.31	100	71	377.1
August -01	52.3	62.9	62.8	3.8	4.0	4.1	27.72	22.12	100	83	306.7
MEAN S.D.	37.70 ± 13.41	47.40 ± 9.56	43.89 ± 11.07	3.26 ± 2.27	3.58 ± 2.34	3.53 ± 2.33	24.05 ± 3.56	16.40 ± 4.70	96.16 ± 3.82	53.32 ± 15.89	145.19 ± 171.75

D : Depth from soil surface. / Profondeur. D1 : 0 – 7.5 cm. D2 : 7.5 – 15 cm. D3 : 15 – 22.5 cm.

It needs to be mentioned that every insect population has some unique characteristics and to understand the population dynamics it is necessary to quantify these (Pedigo, 1991).

Hence, the present investigation was taken up towards acquiring detailed knowledge on the population distribution and specific localized concentration of the pest on mulberry and its severity on alternate hosts in this specific agro-climate of Darjeeling hills.

MATERIALS AND METHODS

Population dynamics of the root mealy bug:

To study the population dynamics of the root mealy bug 4 different locations were selected in and around Kalimpong i.e. Sangsey, Pedong, Bongbasti and Reshambadi, with altitudes ranging between 4100 ft. to 4700 ft., in the Darjeeling hills of West Bengal. At each location 5 farmers' mulberry garden were selected and 5 mulberry plants (*Morus alba*) of BC259 variety were randomly chosen from each garden. The soil sample from the base of each plant at a depth of 22.5 cm. was collected, carefully, and the underground stem and root region of each plant was demarcated from the soil level downwards into 3 regions i.e. 0 – 7.5 cm. (D-1), 7.5 – 15 cm. (D-2) and 15 – 22.5 cm. (D-3). Recording of the no. of root mealy bugs at each separate and specified depth was done.

The data on the population dynamics were collected during the period ranging from August 1999 to August 2001 and mean and standard deviation values were calculated.

With a view to gather information on the proportional infestation by the adult female and nymphs of *Paraputo* sp., as males were very rarely observed (Hill, 1987), critical visual estimation of the same were done with the help of a hand lens (5 × magnification) during 4 specific periods of the year i.e. spring (February - March), rainy (July – August), autumn (September – October) and winter (December – January), from the underground stem and root region of mulberry plants, at the aforementioned 4 sites. Five farmers' field and 15 mulberry plants (var. BC259) from each plot was considered for this study on proportional infestation during 1999 - 2000 and mean and standard deviation values were enumerated.

Regular meteorological observations were taken into account towards study on the population fluctuations of the pest, as influenced by the abiotic factors.

Severity of the root mealy bug on alternate hosts:

The commonly occurring 8 different weeds in the mulberry field i.e. Kuro (*Bidens pilosa*), Titapatty (*Artemisia indica*), Sunguray (*Crassocephalum crepidioides*), Udasay (*Galinsoga parviflora*), Illamey (*Ageratum conyzoides*), Abhijalo (*Drymaria diandra*), Parporey (*Tridax* sp.) and Mothey (*Cyperus rotundus*) in this agro-climate were selected to study their possibility of acting as alternate hosts of the root mealy bug, *Paraputo* sp. The study was conducted from August 1999 to August 2001, separately at 3 sites i.e. Sangsey, Pedong and Bongbasti, where concentration of these weeds in the mulberry field was noted to be higher in comparison to other places. 15 different mulberry plots were selected at each site and 3 plants each of the aforementioned 8 weeds were considered from each plot for observation. The soil around each plant were dug upto 22.5 cm. depth and the total number of root mealy bugs (adult female and nymphs together) present were noted.

Mean and S.D. values for the data generated were calculated for each weed separately.

RESULTS AND DISCUSSION

Infestation of mulberry by the root mealy bug, *Paraputo* sp. occurred throughout the study period (August '99 to August '01) at all the 4 different sites of Sangsey, Pedong, Bongbasti and Reshambadi. The population of the pest (both % infestation and number per plant) reached its peak during June to September i.e. during the monsoon in the hills. Though a downward trend in the same occurred with the fall in atmospheric temperature and humidity (Table I), but, the biotic – potential of the pest was

assertively high, as even under the extreme climatic condition of the winter in this region the pest maintained its population, though in a restrictive manner (Mani, 1982).

The maximum localized concentration of the pest was at 7.5 cm. to 15 cm. depth of soil, underground stem and root region showing a mean percent infestation of 47.40 ± 9.56 and 3.58 ± 2.34 numbers of adults + nymphs (Table I). This was followed by a mean percent infestation of 43.89 ± 11.07 and number 3.53 ± 2.33 (adults + nymphs) at 15 cm. to 22.5 cm. depth of soil (Table I). The steadiness of the pest population (infestation) pattern (D2 D3 D1), throughout the study period suggests that the micro-climate at 7.5 – 15 cm. depth of soil i.e at the root – stem transition zone was to the best of liking and most congenial for this persistent pest of mulberry.

Table II. Proportional infestation (number / plant) on mulberry by the adults and nymphs of the root mealy bug, *Paraputo* sp.

Tableau II. Infestation (nombre / plant) du mûrier par les adultes et les nymphes de la cochenille de la racine, *Paraputo* sp.

	Number per plant							
	SPRING February-March		RAINY July - August		AUTUMN September - October		WINTER December - January	
	Adult	Nymph	Adult	Nymph	Adult	Nymph	Adult	Nymph
	Nombre par plant							
	PRINTEMPS février - mars		SAISON DES PLUIES juillet - août		AUTOMNE septembre - octobre		HIVER décembre - janvier	
	Adulte	Nymphe	Adulte	Nymphe	Adulte	Nymphe	Adulte	Nymphe
Site-1 (Sangsey)	0.45 $\pm$ 0.33	1.07 $\pm$ 1.28	0.69 $\pm$ 0.62	1.91 $\pm$ 0.96	0.97 $\pm$ 1.07	1.36 $\pm$ 1.55	0.98 $\pm$ 1.10	1.79 $\pm$ 2.87
Site-2 (Pedong)	2.79 $\pm$ 2.33	3.41 $\pm$ 1.98	5.46 $\pm$ 3.24	14.20 $\pm$ 5.38	11.16 $\pm$ 10.12	13.17 $\pm$ 10.07	2.92 $\pm$ 1.77	6.24 $\pm$ 5.10
Site-3 (Bongbasti)	3.80 $\pm$ 1.59	6.47 $\pm$ 5.65	6.95 $\pm$ 6.05	13.83 $\pm$ 6.50	8.23 $\pm$ 3.53	5.87 $\pm$ 4.76	3.32 $\pm$ 0.98	4.04 $\pm$ 3.39
Site-4	1.33 $\pm$ 0.99	6.50 $\pm$ 9.07	6.19 $\pm$ 4.25	12.43 $\pm$ 7.59	4.83 $\pm$ 5.15	5.78 $\pm$ 3.69	1.44 $\pm$ 0.81	3.00 $\pm$ 3.00
Mean S. D. (Reshambadi)	2.09 $\pm$ 1.49	4.36 $\pm$ 2.63	4.82 $\pm$ 2.82	10.59 $\pm$ 5.84	6.30 $\pm$ 4.39	6.55 $\pm$ 4.89	2.17 $\pm$ 1.13	3.77 $\pm$ 1.88
Total (Adult + Nymph clubbed) Total (Adultes + nymphes regroupées)								

Data presented in the table are mean and S.D. values / Les données présentées dans le Tableau sont les valeurs moyennes et l'écart type.

Table III. Root mealy bug infestation on common weeds in the mulberry field.

Tableau III. Infestation des mauvaises herbes courantes dans la mûraie par la cochenille de la racine.

Month / Year	Number of root mealy bugs (adults + nymphs) / plant on the common weeds in mulberry field							
Mois / Année	Nombre de cochenilles de la racine (adultes + nymphes) / plant sur les mauvaises herbes courantes dans la mûraie							
	Kuro (<i>B. pilosa</i>)	Titapathy (<i>Artemisia indica</i>)	Sunguray (<i>Crassoc ephalum crepidioides</i>)	Udasay (<i>Galinsoga praviflora</i>)	Illamey (<i>Ageratum conizoides</i>)	Abhijalo (<i>Drymaria diandra</i>)	Parparey (<i>Tridax sp.</i>)	Mothey (<i>Cyperus rotundus</i>)
Aug.'99	1.17	0.06	0	0	0	0	0	0.42
Sept.'99	1.35	0	0	0	0	0	0	0
Oct.'99	0	0	0	0	0	0	0	0
Nov.'99	0.21	0	0	0	0	0	0	0
Dec.'99	0	0	0	0	0	0	0	0
Jan.'00	0.29	0	0	0	0	0	0	0.25
Feb.'00	0	0	0	0	0	0	0	0
Mar.'00	0	0	0	0	0	0	0	0
April'00	0	0	0	0	0	0	0	0
May'00	0.9	2.0	0	0	0	0	0	0
June'00	0	0	0	0	0	0	0	0
July'00	0	0	0	0	0	0	0	0.13
Aug.'00	3.28	0	0	0	0	0	0	0
Sept.'00	0.27	0	0	0	0	0	0	1.19
Oct.'00	0	0	0	0	0	0	0	0.19
Nov.'00	0.73	1.4	0	0	0	0	0.09	0
Dec.'00	0	0	0	0	0	0	0.05	0
Jan.'01	0	0	0	0	0	0	0	0
Feb.'01	0.03	0	0	0	0	0	0	0
Mar.'01	0.19	0	0	0	0	0	0	0
April'01	0	0	0	0	0	0	0	0
May'01	0	0	0	0	0	0	0	0.02
June'01	0.58	0	0	0	0	0	0	0
July'01	0.25	0	0	0	0	0	0	0
Aug.'01	0	0	0	0	0	0	0	0
MEAN / S.D.	0.37	0.14	0	0	0	0	0.006	0.09 ±
Moyenne / Ecart type	± 0.72	± 0.49					± 0.02	0.25

Studies on population ratio among adults and nymphs of this root mealy bug during different seasons revealed that during spring (February - March) and rainy (July - August) the nymphal population was almost double that of the adult female. But, the population structure / pattern changed during autumn and winter, hence the mean population of both the adult and nymphs became at par (Table II). Summing up, the no. of adults and nymphs for each period separately, again showed that, the mean maximum population during the rainy season to be the highest, agreeing with the findings noted in Table I.

Some commonly occurring weeds in the mulberry field acted as alternate host of *Paraputo* sp. *Bidens pilosa*, commonly known as Kuro in the local language, was observed as the dominant secondary host of the pest with a mean value of 0.37 ± 0.72 no. of root mealy bug (adults + nymphs) per plant. Titapatty (*Artemisia indica*) harboured a mean number of 0.14 ± 0.49 adults + nymphs (Table III) per plant. Parparcy (*Tridax* sp.) and Mothey (*Cyperus rotundus*) also nurtured this pest, though to a much lesser percent. In the case of all these weeds, the pest was noted on the underground stem and root region, like in mulberry. But it needs to be noted that persistency in infestation on the weeds was lacking, except to some extent on *Bidens pilosa*. However, this characteristic of *Paraputo* sp. of using some common weeds as its alternate host establishes the fact that the pest is polyphagous (Hill, 1987 and Biswas *et al*, 2001).

Hence, it is observed that this polyphagous pest of the mulberry plant (Root mealy bug, *Paraputo* sp.) has carved out a separate niche for itself within the economics of sericulture, under this specific agro-climate of the hills of Darjeeling, in West Bengal, India.

REFERENCES

- BEARDSLEY J.W. (1959), On the taxonomy of pineapple mealy bugs in Hawaii, with a description of a previously unnamed species (Homoptera : Pseudococcidae). Proc. Hawaiian Entomol. Soc., 17(1), 29 – 37.
- BEARDSLEY J. W. (1965), Notes on the pineapple mealy bug complex with descriptions of two new species (Homoptera : Pseudococcidae). Proc. Hawaiian Entomol. Soc., 19(1), 55 – 68.
- BISWAS S., DAS D., CHATTOPADHYAY S., DAS S. K. AND MANDAL K. (2002), Root mealy bug (*Paraputo* sp.) of mulberry in Darjeeling hills – its severity, biology and control. Sericologia, 42(1), 39-48.
- GAUMEL L., MATILE – FERRERO D., MICKEY D. (2000), Colony foundation and acquisition of coccoid trophobionts by *Aphomomyrmex afer* (Formicinae) : Co-dispersal of queens and phoretic mealy bugs in an ant-plant-homopteran mutualism. Insects Sociaux., 47(1), 84-91.
- HILL D. S. (1987), Agricultural insect pest of the tropics and their control. Cambridge University Press, New York, P : 214-219.
- MANI M. S. (1990), General Entomology. Oxford and IBH, New Delhi, P – 279.
- MISRA A. K., DAS B. K., AHSAN M. M. (1996), New record of *Paraputo* sp. (Pseudococcidae : Homoptera) as a pest of mulberry (*Morus alba* L.). Sericologia, 36(2), 369-371.
- PEDIGO L. P. (1989), Entomology and pest management. Macmillan Publishing Company, New York, P-168, 174-177.
- RANGASWAMI G., JOLLY M. S. (1978), Sericulture Manual-I (Mulberry cultivation). FAO – Oxford and IBH, New Delhi, P : 71-76.
- SENGUPTA K. (1990), Handbook on pest and disease control of mulberry and silkworm. ESCAP, Bangkok, P : 17-33.
- WANG T. C. (1982), A study on the Chinese *Paraputo* and *Heliococcus* with description of new species (Homoptera : Coccoidea : Pseudococcidae). Acta. Entomologia Sinica, 25(3), 315-320.

DYNAMIQUE DE LA POPULATION DE LA COCHENILLE DE LA RACINE, *PARAPUTO* SP. SUR LE MURIER DANS LES COLLINES DE DARJEELING

D. DAS, S. BISWAS*, S. SARKAR, S. K. DAS** & S. CHAKRABARTI

Regional Sericultural Research Station, 7th Mile, Kalimpong – 734301, West Bengal, Inde.

Parmi les parasites qui causent des dégâts économiques chez le mûrier dans les collines de l'ouest du Bengal, la cochenille de la racine *Paraputo* sp. (Pseudococcidae, Hemiptera) est le plus persistant et le plus connu.

On observe la densité la plus élevée de ce parasite perpétuel sur la tige souterraine et dans la zone de la racine du mûrier (*Morus* sp.) dans le sol à une profondeur de 7,5 à 15 cm ($3,58 \pm 2,34$ adultes + nymphes par plante) de juin à septembre. La population diminue avec la baisse de la température atmosphérique et de l'humidité. On constate que de mars à août la population nymphale représente le double des adultes (femelles) et elle reste égale à celle des adultes en automne et en hiver.

On observe que *Paraputo* a des hôtes alternés, des mauvaises herbes courantes dans la mûraie de cette région de collines telles que Kuro (*Bidens pilosa*), Titapatty (*Artemisia indica*), Parparey (*Tridax* sp.) et Mothey (*Cyperus rotundus*) mais on n'a pas pu établir de schéma spécifique d'infestation. Parmi ces mauvaises herbes, c'est Kuro (*Bidens pilosa*) que la cochenille préfère ($0,37 \pm 0,72$ adultes + nymphes par plante).

INTRODUCTION

Parmi les divers parasites qui infestent le mûrier dans les collines de Darjeeling, dans le Bengale Ouest en Inde, on observe que la cochenille de la racine, *Paraputo* sp. est le plus vivace et il cause des dégâts considérables chez le mûrier, directement en suçant la sève et indirectement en laissant la place à des infestations fongiques qui entraînent le pourrissement de la racine et finalement la mort des plants (Biswas et coll., 2001). De plus, on a observé que la concentration élevée en cochenilles de la racine et l'absorption de la sève qui en résulte entraînent la perte de vigueur, le jaunissement des feuilles et la diminution de la croissance chez le mûrier (Misra et coll., 1996).

Le parasite est présent dans cette région à une altitude d'au moins 750 m et il utilise des mauvaises herbes courantes dans la mûraie comme hôtes alternés (Biswas et coll., 2001).

De nombreux travaux ont été effectués sur l'infestation des parties aériennes des plantes par les cochenilles mais l'information disponible sur la cochenille de la racine en général et sur *Paraputo* sp. en particulier est très limitée. Cependant, Wang (1982) a identifié *Paraputo speciosus* sur *Camellia*

* Adresse actuelle : * ICAR Research Complex for NEH Region, Tripura Centre Lembuchera, West Tripura, Inde.

**Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, West Bengal, Inde.

oleifera (oleosa) en Chine et on a constaté une relation mutuellement bénéfique entre *Paraputo anomala* et la fourmi *Aphomomyrmex afer* (Gaume et coll., 2000).

On doit mentionner que chaque population d'insectes a des caractéristiques uniques et pour comprendre la dynamique de population, il est nécessaire de la quantifier (Pedigo, 1991).

Nous avons donc entrepris cette étude pour acquérir des connaissances détaillées sur la distribution de la population et la concentration localisée spécifique du parasite chez le mûrier et sa sévérité sur les hôtes alternés dans cet agro-climat spécifique des collines de Darjeeling.

MATERIELS ET METHODES

Dynamique de population de la cochenille de la racine :

Pour étudier la dynamique de population de la cochenille de la racine, nous avons sélectionné 4 endroits différents à Kalimpong et aux alentours, c'est à dire Sangsey, Pedong, Bongbasti et Reshambadi, à des altitudes comprises entre 1230 m et 1410 m dans les collines de Darjeeling dans le Bengale ouest. A chaque endroit, 5 muraies ont été sélectionnées et 5 plants de mûrier (*Morus alba*) de la variété BC259 choisis au hasard dans chaque mûraie. On recueille soigneusement l'échantillon de sol à la base de chaque plant à une profondeur de 22,5 cm et on divise la zone de la tige souterraine et de la racine au niveau du sol en 3 zones, c'est à dire 0–7,5 cm (D-1), 7,5–15 cm (D-2) et 15-22,5 cm (D3). On enregistre le nombre de cochenilles de la racine séparément et spécifiquement pour chaque profondeur.

On recueille les données sur la dynamique de population pendant la période comprise entre août 1999 et août 2001 et on calcule les valeurs de l'écart type et de l'écart moyen.

Afin de rassembler des informations sur l'infestation relative par les adultes et les nymphes femelles de *Paraputo sp.*, puisqu'on observe rarement des mâles (Hill, 1987), on procède à leur estimation visuelle critique à l'aide d'une loupe manuelle (grossissement de 5 ×) pendant 4 périodes spécifiques de l'année, c'est à dire au printemps (février – mars), pendant la saison des pluies (juillet – août), à l'automne (septembre – octobre) et en hiver (décembre – janvier) dans la zone souterraine de la tige et de la racine, aux 4 endroits mentionnés précédemment. On prend en considération cinq muraies et 15 plants de mûrier (var. BC259) dans chaque parcelle pour cette étude de 1999 à 2000 et on mesure les valeurs de l'écart type.

On prend en compte les observations météorologiques pour l'étude sur les fluctuations de population du parasite sous l'influence des facteurs abiotiques.

Sévérité de la cochenille de la racine sur les hôtes alternés :

On sélectionne les 8 mauvaises herbes courantes de la mûraie, c'est à dire Kuro (*Bidens pilosa*), Titapatty (*Artemisia indica*), Sunguray (*Crassocephalum crepidioides*), Udasay (*Galinsoga parviflora*), Illamey (*Ageratum conyzoides*), Abhijalo (*Drymaria diandra*), Parparey (*Tridax sp.*) et Mothey (*Cyperus rotundus*) dans cet agro-climat pour étudier leur utilisation comme hôtes alternés de la cochenille de la racine, *Paraputo sp.* On réalise l'étude d'août 1999 à août 2001, séparément sur 3 sites, c'est à dire Sangsey, Pedong et Bongbasti où on remarque que la concentration de ces mauvaises herbes est plus élevée par rapport aux autres endroits. 15 parcelles de mûrier à chaque endroit ont été sélectionnées et 3 plants pour chacune des 8 mauvaises herbes mentionnées sur chaque parcelle sont pris en considération pour l'observation. On creuse le sol autour de chaque plante à une profondeur de 22,5 cm et on enregistre le nombre total de cochenilles de la racine (ensemble des adultes et des nymphes femelles).

On calcule les valeurs de la moyenne et de l'écart type séparément pour chaque mauvaise herbe.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'infestation du mûrier par la cochenille de la racine, *Paraputo* sp. s'est produit pendant toute la durée de l'étude (août 99 à août 01) dans les 4 endroits à Sangsey, Pedong, Bongbasti et Reshambadi. La population de ce parasite (à la fois le % d'infestation et le nombre par plant) atteint son sommet de juin à septembre, c'est à dire pendant la mousson dans les collines. Bien qu'on observe une tendance à la baisse avec la baisse de la température atmosphérique et de l'humidité (Tableau I) le potentiel biotique du parasite est assurément élevé puisque même pendant les conditions climatiques extrêmes de l'hiver dans cette région, le parasite maintient sa population bien que de manière restreinte (Mani, 1982).

La concentration localisée maximum du parasite a lieu à une profondeur du sol entre 7,5 cm et 15 cm, la tige souterraine et la région de la racine présentant un pourcentage d'infestation moyen de $47,40 \pm 9,56$ et de $3,58 \pm 2,34$ d'adultes + nymphes (Tableau I). Cela est suivi par un pourcentage moyen d'infestation de $43,89 \pm 11,07$ et un nombre de $3,53 \pm 2,33$ (adultes + nymphes) à une profondeur du sol de 15 cm à 22,5 cm (Tableau I). La régularité du schéma (D2, D3, D1) de la population du parasite (infestation) pendant la période d'étude suggère que le microclimat à une profondeur de 7,5 à 15 cm, c'est à dire dans la zone de transition racine – tige est l'endroit préféré et le plus propice pour ce parasite persistant du mûrier.

Les études sur le ratio de population des cochenilles adultes et nymphes pendant les différentes saisons révèlent qu'au printemps (février – mars) et pendant la saison des pluies (juillet – août) la population nymphale est presque le double de la population adulte femelle. Mais la structure / le schéma de population change pendant l'automne et l'hiver et la population moyenne des adultes et des nymphes devient égale (Tableau II). L'addition du nombre des adultes et des nymphes séparément pour chaque période montre encore que la population moyenne maximum est la plus élevée pendant la saison des pluies, ce qui confirme les observations contenues dans le Tableau I.

On observe qu'une mauvaise herbe courante présente dans la muraie comme hôte alterné de *Paraputo* sp., *Bidens pilosa*, connue dans la langue locale sous le nom de Kuro, est le deuxième hôte dominant du parasite avec une valeur moyenne de $0,37 \pm 0,72$ en nombre de cochenilles de la racine (adultes + nymphes) par plant. Titapatty (*Artemisia indica*) donne un nombre moyen de $0,14 \pm 0,49$ adultes + nymphes (Tableau III) par plant. Parparey (*Tridax* sp.) et Mothye (*Cyperus rotundus*) accueillent aussi ce parasite, bien qu'à un degré bien moindre. Chez toutes ces mauvaises herbes, on observe le parasite sur la tige souterraine et dans la zone de la racine, comme chez le mûrier. Mais on doit noter qu'il ne se produit pas d'infestation persistante sur les mauvaises herbes, sauf à un certain degré chez *Bidens pilosa*. Cependant, la caractéristique de *Paraputo* sp. à utiliser certaines mauvaises herbes courantes comme hôte alterné montre que ce parasite est polyphage (Hill, 1987 et Biswa et coll., 2001).

On observe donc que ce parasite polyphage du mûrier (la cochenille de la racine, *Paraputo* sp.) s'est constitué sa propre niche dans l'économie de la sériciculture, dans l'agro-climat spécifique des collines de Darjeeling, dans le Bengale de l'ouest en Inde.

EFFICIENCY OF INDIGENOUS PARASITOIDS AGAINST UZIFLY, *BLEPHARIPA ZEBINA* WALKER (DIPTERA: TACHINIDAE), A PARASITOID OF SILKWORM, *ANTHRAEA MYLITTA* DRURY

RAM KISHORE, S.P. SHARMA, S.N. SINHADEO, G. C. ROY & B. R. R. P. SINHA

Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi-835 303, India

The tachinid fly, *Blepharipa zebina* Walker (Diptera: Tachinidae) is a larval endo-parasitoid of the tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera: Saturniidae), that causes considerable damage to tasar silk industry. In recent years, biological studies on the parasitoids of *B. zebina* were conducted. Eight indigenous parasitoids have been reported to parasitise *B. zebina*. Laboratory studies indicate the superiority of *Nesolynx thymus* (Girault) (Eulophidae) as bio-control agent for *B. zebina* over *Spalangia endius* Walker (Pteromalidae) and *Brachymeria lasus* Walker (Chalcididae). These three parasitoids were mass multiplied in the insectary and released simultaneously three times during each silkworm crop rearing in the isolated area (uzi infested tasar area). Details of studies, which led to the selection of these parasitoids, are presented.

Parasitisation (%) of different parasitoids were collected from the host puparia kept at the time of each release (September 2000 to March 2002). The data indicate that *N. thymus* is the most efficient parasitoid followed by *S. endius* and *B. lasus*. Further highest parasitisation of 64.1% was observed in *N. thymus* during III crop of silkworm rearing followed by II crop (59.8%) and I crop (55.1%). The parasitization by *S. endius* ranged from 25.2 to 33.9% followed by *B. lasus* (10.3 to 11.9%). Factors responsible for low parasitization by *S. endius* and *B. lasus* and relationship between parasitisation by these parasitoids and uzi infestation in the field are discussed.

Keywords: Efficiency, *Blepharipa zebina*, Tachinidae, Parasitoid, *Antheraea mylitta*, Saturniidae

INTRODUCTION

The tachinid fly, *Blepharipa zebina* Walker is an endoparasitoid of the tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera: Saturniidae). It causes considerable damage to tasar silk industry (Jolly *et al.* 1974; Singh and Thangavelu, 1991). Sometimes, the loss due to this fly pest is about 40% in tropical tasar zone (Chaturvedi *et al.* 1986; Singh and Thangavelu, 1991). Various physical and chemical control measures, besides preventive ones, were adopted earlier to suppress uzi menace (Singh and Thangavelu, 1991). In recent years substantial efforts have been made on biological control of uzifly, *B. zebina* (Singh *et al.* 1995, Kishore *et al.* 1996, 1999 & 2000). Such efforts have led to identification of several natural enemies including these parasitoids namely, *Nesolynx thymus* (Girault) (Eulophidae), *Spalangia endius* Walker (Pteromalidae) and *Brachymeria lasus* Walker (Chalcididae). Screening of different parasitoids in the laboratory indicated the potentiality of parasitoids i. e., *N. thymus* (gregarious) ; *S. endius* and *B. lasus* (solitary) judged by their searching

and parasitizing ability to uzi maggots and/or puparia (Kishore *et al.* 1999). These parasitoids were therefore, selected as bio-control components for an integrated programme for uzifly control.

The present study is an attempt to investigate the actual and potential importance of *N. thymus*, *S. endius* and *B. lasus* as bio-control agents of *B. zebina* in the field.

MATERIALS AND METHODS

Daba, a trivoltine silkworm race was reared following the methods suggested by Jolly, (1972). The crop wise rearing period of silkworm was June – July (I – Crop), August – September (II – Crop) and October – December (III – Crop). *N. thymus*, *S. endius* and *B. lasus* were mass multiplied in the insectary of Entomology laboratory of C.T.R.T.I., Ranchi, India at $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $60 \pm 5\%$ RH and photoperiod of 12h L: 12h D following the methods evolved by Kishore *et al.* 2001. For release of these parasitoids silkworm rearing field of C.T.R.T.I., Ranchi was selected. One isolated silkworm rearing field at Bero, Ranchi was taken as control. The number of adults of these parasitoids released for 100 Disease free laying (Dfls) rearing field are:

N. thymus 10,000 (male to female ratio 1:15), *S. endius* 10,000 (male to female ratio 1:1), *B. lasus* 10,000 (male to female ratio 1:1)

After eclosion, the adults of *N. thymus*, *S. endius* and *B. lasus* were fed on 50% aqueous honey solution and maintained in the insectary for one day (*N. thymus*) and four days (*S. endius* and *B. lasus*) to ensure mating (Kishore *et al.* 2001).

Prior to release of the parasitoids, a base data on uzifly infestation of both treatment and control were collected. An average of 15.2% uzi infestation was recorded. Parasitoids were released in the late evening both during silkworm rearing and after the harvest of cocoons. To investigate the infestation rate of uzifly puparia by the released parasitoids, 500 puparia (Two day old) were kept in five locations having 100 puparia in each location in a rearing area of 100 disease free layings. The observations on infestation rate of uzifly puparia by the parasitoids were recorded in all the three crop seasons. Same numbers of puparia were kept in control. The data collected were analyzed statistically to determine the level of significance (Fisher and Yates, 1963) following one – way ANOVA.

RESULTS AND DISCUSSION

The parasitisation (%) of uzi puparia by the released parasitoids are presented in fig.1. The parasitisation percentage of uzi puparia by *N. thymus*, *S. endius* and *B. lasus* were 55.1 ± 6.3 , 33.9 ± 2.3 and 11.9 ± 1.5 during I crop; 59.8 ± 3.5 , 28.6 ± 4.3 and 11.6 ± 2.7 during II crop and 64.1 ± 4.6 , 25.2 ± 4.2 and 10.3 ± 3.9 during III crop respectively. The parasitisation of host puparia by *N. thymus* was significantly higher ($P < 0.01$) compared to *S. endius* followed by *B. lasus* in all the three crop seasons. The average uzifly infestation percentage to silkworm after release of referred parasitoids during I, II, and III crops were 2.3 ± 1.5 , 2.5 ± 1.3 and 2.8 ± 1.7 respectively while in control the uzifly infestation % were 10.5 ± 5.7 , 12.7 ± 4.9 and 15.5 ± 4.6 . The data revealed that the uzifly infestation in control area was significantly higher ($P < 0.01$) compared to cumulative effect of treatments during all the crop seasons (fig.2). Kumar *et al.* (1993) reported similar trend in bio-control for *Exorista sorbillans* when *N. thymus* and *Dirhinus* sp. were utilised.

The present study involving the introduction of three indigenous natural enemies (parasitoids) in the field as biocontrol agents of *B. zebina* demonstrated the following:

1. The recovery of *N. thymus*, *S. endius* and *B. lasus*, from the host though varied throughout the period of study (two years) but clearly indicated the persisting (surviving) ability of the parasitoids in the area of their release.

2. The parasitisation of host puparia available at different locations of rearing reflected the host searching ability of the released natural enemies under field conditions.

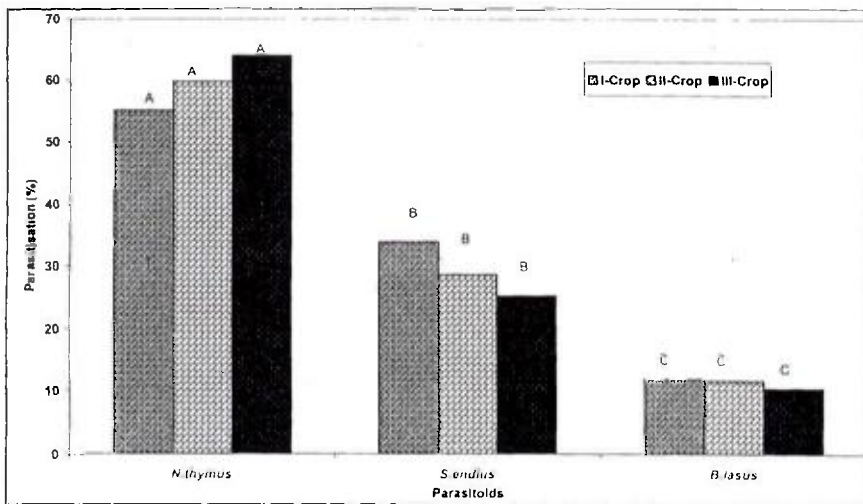


Fig. 1. Parasitisation percentage of uzifly puparia by parasitoids. The letters give the group of significance according to one-way ANOVA at 1%.

Fig. 1. Pourcentage de parasitisme de nymphes de la mouche uzi par les parasitoïdes. Les lettres donnent le groupe de signification selon une analyse de variance à un facteur au seuil de 1 %.

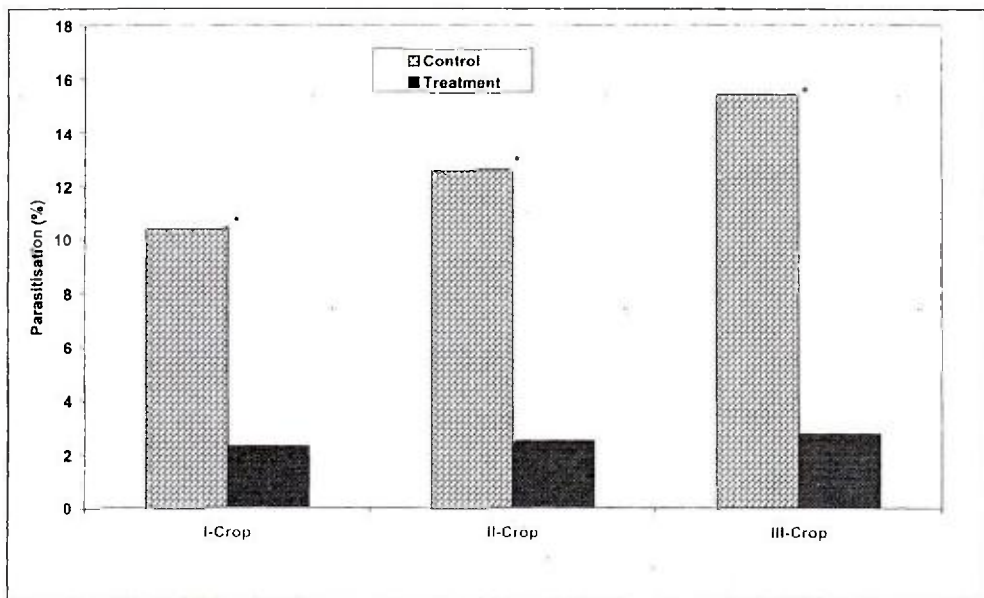


Fig. 2. Uzifly infestation after field release of the parasitoids namely, *Nesolynx thymus*, *Spalangia endius* and *Brachymeria lasus* (cumulative effect). * $P < 0.01$.

Fig. 2. Infestation par la mouche uzi après la libération sur le terrain des parasitoïdes en l'occurrence, *Nesolynx thymus*, *Spalangia endius* et *Brachymeria lasus* (effet cumulatif). * $P < 0,01$.

3. The highest parasitisation of host puparia in field condition was recorded by *N. thymus* (55.1 to 64.0%) followed by *S. endius* (25.2 to 33.9%) and *B. lasus* (10.3 to 11.9%). Thus *N. thymus* has been found to have a clear edge over *S. endius* and *B. lasus* in its host searching ability.

A novel bio-control agent include high host searching ability, good reproductive capability relative to the host, good host parasitising ability, higher degree of host specificity or preference, and better synchrony with host life cycle (White *et al.* 1970 and Embeden 1974). In the present study it has been observed that multiplication of *N. thymus* (through parasitised puparia) in the available environment was proportionate to the multiplication trend of uzifly (uzi infestation in silkworm larvae in control area). Such a trend may help in establishing a density dependent regulation of *N. thymus* and uzifly, *B. zebina* populations. The low multiplication /recovery of *S. endius* and *B. lasus* recorded in the present field study appears to have been influenced by the following factors:

1. Longer life cycle compared to *N. thymus* and
2. Poor synchronization with host life cycle (Kishore *et al.* 1999).

The survival of *N. thymus* throughout the year and its host searching ability observed in the present study clearly indicates that this parasitoid possesses certain desirable characters of a novel bio-control agent for the control of uzifly, *B. zebina*.

REFERENCES

- CHATURVEDI H.K., SAXENA V. & KHOTALE V. (1986) Survey of uzifly infestation in Baster District. Indian J. Zool., 14(2): 27-32
- EMBEDEN H. F. VAN (1974) Pest control and its ecology. Studies in biology No. 50, Edward, Arnold, London.
- FISHER R.A. & YATES F. (1963) Statistical tables for Biological, Agricultural and Medical research, Longman, England, 146p.
- JOLLY M. S. (1972) A new technique of tasar silkworm rearing, Indian Silk, 11(1): 5 - 8.
- JOLLY M.S., SEN S.K. & AHSAN M.M. (1974) Tasar Culture, Ambica publishers, Bombay, India, 266p.
- KISHORE R., BARDAIYAR B.N., GUPTA R. & KARNAN P. (1996) Bionomics and control of uzifly, Annual report, CTRTI, Ranchi, India, 48p.
- KISHORE R., SHARMA S. P., PRASAD B.C., SINHA B.R.R.P. & THANGAVELU K. (1999) Evaluation of four hymenopteran parasitoids against uzifly, *Blepharipa zebina* Walker (Diptera : Tachinidae), Proceedings Seminar on Tropical Sericulture, Bangalore, 1999:25- 26.
- KISHORE R., SHARMA S.P., SHARAN S.K., SINHA B.R.R.P. & THANGAVELU K. (2000) IPM approach to optimize tasar silkworm cocoon production. National Conference of Strategy for Sericulture Research and Development at Mysore, India, Nov. 16-18, 2000:89 p.
- KISHORE R., SHARMA S.P., SHARAN S.K., SINHADEO S.N. & THANGAVELU K. (2001) Optimal conditions of host- parasitoid density, ratio and age for the multiplication of *Nesolynx thymus* (Girault), a parasitoid of the uzifly, *Blepharipa zebina* Walker. Sericologia, 41(3) : 449-454.
- KUMAR P., PRASAD K.S., KISHORE R., MANJUNATH D. & DATTA R.K. (1993) Efficiency of introduced indigenous parasitoids against uzifly, *Exorista sorbillans*. Recent Adv. Uzifly Res., 127-133.
- SINGH R.N. & THANGAVELU K. (1991) Parasites and predators of tasar silkworm, *Antheraea mylitta* and their control measures. Indian Silk, 29(12): 33-36.
- SINGH R.N., MONDAL K.C. & THANGAVELU K. (1995) *Blepharipa zebina* Walker (Tachinidae: Diptera), a new host record for hymenopteran parasitoids, *Brachymeria lasus* Walker and *Thronia moskeliyae* Cameron. Indian J. Seric., 34(1): 72-73.
- WHITE E.B., DE BACH P. & GARTER M.J. (1970) Artificial selection for genetic adaption to temperature extremes in *Aphytis lingnanensis* Compere (Hymenoptera: Aphelinidae). *Hilgardia*, 40: 161-192.

EFFICACITE DE PARASITOIDES INDIGENES CONTRE LA MOUCHE UZI, *BLEPHARIPA ZEBINA* WALKER (DIPTERA : TACHINIDAE), UN PARASITOIDE DU VER A SOIE, *ANTHERAEA MYLITTA* DRURY

RAM KISHORE, S. P. SHARMA, S. N. SINHADEO, G. C. ROY & B. R. R. P. SINHA

Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi – 835 303, Inde

La mouche tachinaire, *Blepharipa zebina* Walker (Diptera : Tachinidae) est un endo-parasitoïde larvaire du ver à soie tasar, *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera : Saturniidae) qui cause des dégâts considérables pour l'industrie de la soie tasar. Récemment, on a réalisé des études biologiques sur les parasitoïdes de *B. zebina*. On a rapporté que huit parasitoïdes indigènes parasitent *B. zebina*. Les études en laboratoire indiquent la supériorité de *Nesolynx thymus* (Girault) (Eulophidae) comme agent de lutte biologique contre *B. zebina* par rapport à *Spalangia endius* Walker (Pteromalidae) et *Brachymeria lasus* Walker (Chalcididae). On multiplie ces trois parasitoïdes en masse dans l'insectarium et on les libère simultanément trois fois pendant chaque élevage du ver à soie dans la zone isolée (zone tasar infestée par l'uzi). Nous présentons les détails des études qui ont conduit à la sélection de ces parasitoïdes.

On mesure le parasitisme par les différents parasitoïdes en les recueillant sur les pupes hôtes conservées au moment de chaque libération (septembre 2000 à mars 2002). Les données indiquent que *N. thymus* est le parasitoïde le plus efficace suivi par *S. endius* et *B. lasus*. De plus, on observe la parasitisation la plus élevée avec *N. thymus* (64,1 %) pendant le 3^{ème} élevage suivi par le 2^{ème} élevage (59,8 %) et le 1^{er} élevage (55,1 %). Le parasitisme par *S. endius* est compris entre 25,2 et 33,9 % suivi par *B. lasus* (10,3 à 11,9 %). Nous discutons des facteurs pouvant expliquer le faible parasitisme de *S. endius* et *B. lasus* et de la relation entre le parasitisme par ces parasitoïdes et l'infestation par la mouche uzi sur le terrain.

INTRODUCTION

La mouche tachinaire, *Blepharipa zebina* Walker est un endoparasitoïde du ver à soie tasar, *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera : Saturniidae). Elle cause des dégâts considérables pour l'industrie de la soie tasar (Jolly et coll., 1974 ; Singh et Thangavelu, 1991). Parfois, la perte due à cette mouche parasite est d'environ 40 % dans la zone tasar tropicale (Chaturvedi et coll., 1986 ; Singh et Thangavelu, 1991). Dans le passé, on a adopté plusieurs mesures de lutte physique et chimique ainsi que des méthodes préventives pour supprimer la menace uzi (Singh et Thangavelu, 1992). Ces dernières années, des efforts remarquables ont été entrepris pour lutter de manière biologique contre la mouche uzi, *B. zebina* (Singh et coll., 1995, Kishore et coll., 1996, 1999 et 2000). De tels efforts ont entraîné l'identification de plusieurs ennemis naturels y compris de ses parasitoïdes en l'occurrence, *Nesolynx thymus* (Girault) (Eulophidae), *Spalangia endius* Walker (Pteromalidae) et *Brachymeria lasus* (Walker) (Chalcididae). L'évaluation des différents parasitoïdes en laboratoire indique la potentialité de ces parasitoïdes, en l'occurrence : *N. thymus* (grégaire) ; *S. endius* et *B. lasus* (solitaires), que l'on évalue d'après leur capacité de recherche et de parasitisme envers les larves et /

ou les pupes uzi (Kishore et coll., 1999). Ces parasitoïdes sont donc sélectionnés comme composants de la lutte biologique dans un programme intégré de lutte contre la mouche uzi.

Cette étude a été réalisée dans le but d'étudier l'importance réelle et potentielle de *N. thymus*, *S. endius* et *B. lasus* comme agents de lutte biologique contre *B. zebina*.

MATERIELS ET METHODES

On élève la race de ver à soie trivoltine Daba en suivant les méthodes suggérées par Jolly, (1972). La période d'élevage du ver à soie en fonction de la récolte est juin – juillet (Récolte I), août – septembre (Récolte II) et octobre – décembre (Récolte III). On multiplie *N. thymus*, *S. endius* et *B. lasus* en masse dans l'insectarium du Laboratoire d'Entomologie du C.T.R.T.I., à Ranchi en Inde à $25 \pm 2^\circ \text{C}$, $60 \pm 5\%$ d'HR et une photopériode de 12 h L : 12 h O en suivant les méthodes mises au point par Kishore et coll., 2001. Pour la libération de ces parasitoïdes, on sélectionne le terrain d'élevage du C.T.R.T.I. à Ranchi. On prend un terrain d'élevage isolé à Bero, Ranchi comme témoin. Le nombre d'adultes de ces parasitoïdes libérés pour 100 pontes saines sur le terrain d'élevage est :

N. thymus : 10 000 (ratio mâle femelle : 1 : 15), *S. endius* : 10 000 (ratio mâle femelle : 1 : 1), *B. lasus* : 10 000 (ratio mâle femelle : 1 : 1).

Après éclosion, les adultes de *N. thymus*, *S. endius* et *B. lasus* sont nourris sur une solution de miel aqueuse à 50 % et maintenus dans l'insectarium pendant un jour (*N. thymus*) et quatre jours (*S. endius* et *B. lasus*) pour assurer l'accouplement (Kishore et coll., 2001).

Avant la libération des parasitoïdes, on recueille les données de base sur l'infestation par la mouche uzi à la fois chez les traitements et le témoin. On enregistre une infestation moyenne uzi de 15,2 %. On libère les parasitoïdes en fin de soirée à la fois pendant l'élevage des vers à soie et après la récolte des cocons. Pour étudier le taux d'infestation des pupes de la mouche uzi par les parasitoïdes libérés, on conserve 500 pupes (de deux jours) à cinq endroits avec 100 pupes dans chaque endroit dans une zone d'élevage de 100 pontes saines. On enregistre les observations sur le taux d'infestation des pupes uzi par les parasitoïdes pendant les trois saisons de récolte. On conserve le même nombre de pupes pour le témoin. On analyse les données recueillies de manière statistique pour déterminer le niveau de signification (Fisher et Yates, 1963) en suivant une analyse de variance à un facteur.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les % de parasitisme des pupes uzi par les parasitoïdes libérés est présenté dans la fig. 1. Le pourcentage de parasitisme des pupes uzi par *N. thymus*, *S. endius* et *B. lasus* est respectivement de $55,1 \pm 6,3$; $33,9 \pm 2,3$ et $11,9 \pm 1,5$ pendant la récolte I ; $59,8 \pm 3,5$; $28,6 \pm 4,3$ et $11,6 \pm 2,7$ pendant la récolte II et $64,1 \pm 4,6$; $25,2 \pm 4,2$ et $10,3 \pm 3,9$ pendant la récolte III. Le parasitisme des pupes hôtes par *N. thymus* est significativement plus élevé ($P < 0,01$) par comparaison à *S. endius* suivi par *B. lasus* pendant les trois saisons de récolte. Les pourcentages moyens d'infestation de la mouche uzi sur le ver à soie après la libération des parasitoïdes mentionnés pendant les récoltes I, II et III sont de respectivement $2,3 \pm 1,5$; $2,5 \pm 1,3$ et $2,8 \pm 1,7$ tandis que chez le témoin le % d'infestation par la mouche uzi est de $10,5 \pm 5,7$; $12,7 \pm 4,9$ et $15,5 \pm 4,6$. Les données révèlent que l'infestation par la mouche uzi dans la zone témoin est significativement plus élevée ($P < 0,01$) par comparaison à l'effet cumulatif des traitements pendant toutes les saisons de récolte (fig. 2). Kumar et coll., (1993) ont rapporté une tendance similaire dans la lutte biologique contre *Exorista sorbillans* quand on utilise *N. thymus* et *Dirhinus* sp.

Cette étude qui comprend l'introduction de trois ennemis naturels indigènes (parasitoïdes) sur le terrain comme agents de lutte biologique contre *B. zebina* montre ce qui suit :

1. La présence de *N. thymus*, *S. endius* et *B. lasus* sur l'hôte varie pendant la période d'étude (deux années) mais indique clairement la capacité persistante (survie) des parasitoïdes dans la zone de leur libération.

2. Le parasitisme des pupes hôtes disponibles aux différents endroits d'élevage reflète la capacité de recherche de l'hôte par les ennemis naturels libérés sur le terrain.

3. On enregistre le parasitisme le plus élevé des pupes hôtes sur le terrain par *N. thymus* (55,1 à 64 %) suivi par *S. endius* (25,2 à 33,9 %) et *B. lasus* (10,3 à 11,9 %). On trouve donc que *N. thymus* l'emporte clairement suivi par *S. endius* et *B. endius* dans sa capacité à rechercher l'hôte.

Un nouvel agent de lutte biologique suppose une capacité de recherche de l'hôte élevée, une bonne capacité de reproduction sur l'hôte, une bonne capacité d'infestation de l'hôte, un degré élevé de spécificité ou de préférence par rapport à l'hôte et une synchronisation avec le cycle de vie de l'hôte (White et coll., 1970 et Embeden, 1974). Dans cette étude on observe que la multiplication de *N. thymus* (par le parasitisme des pupes) dans l'environnement disponible est proportionnelle à la tendance à la multiplication de la mouche uzi (infestation uzi sur les larves de ver à soie dans la zone témoin). Une telle tendance pourrait permettre d'établir une régulation dépendant de la densité des populations de *N. thymus* et de la mouche uzi, *B. zebina*. Les faibles multiplication / présence de *S. endius* et de *B. lasus* enregistrées dans cette étude sur le terrain semblent être influencés par les facteurs suivants :

1. Cycle de vie plus long par comparaison à *N. thymus* et

2. Mauvaise synchronisation avec le cycle de vie de l'hôte (Kishore et coll., 1999).

La survie de *N. thymus* pendant l'année et sa capacité à rechercher l'hôte observées dans cette étude indiquent clairement que ce parasitoïde possède certains caractères désirables comme nouvel agent de lutte biologique pour lutter contre la mouche uzi *B. zebina*.

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.

INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

1) Les articles présentés doivent concerner soit des travaux originaux, soit des synthèses. Ils doivent être rédigés en français ou en anglais. Ils doivent avoir trait à la sériciculture qui inclut les vers à soie, les plantes nourricières, la filature de la soie quelle que soit la nature des recherches (fondamentales ou appliquées) et des sujets (biochimie, écologie, économie, virologie, génétique, etc.).

2) Les articles doivent être soumis à ; **Dr G. CHAVANCY**. Les articles soumis au Rédacteur doivent être inédits et ne doivent pas être présentés pour publication chez un autre éditeur. Les articles acceptés pour publication dans *SERICOLOGIA* ne pourront être publiés ailleurs sous la même forme sans le consentement écrit de l'éditeur.

3) Les manuscrits et illustrations doivent être soumis en double exemplaire, l'auteur conservant une copie. Dans le cas d'une co-rédaction, les auteurs doivent indiquer le nom de celui qui recevra les épreuves.

4) Les manuscrits doivent être dactylographiés avec un double interligne et des marges importantes. Les auteurs sont priés de rédiger des communications aussi concises que possible. Les renvois de bas de page sont à éviter et les caractères en italique ne doivent pas être utilisés pour la mise en relief.

5) L'article doit être présenté de la façon suivante:

- Le titre suivi du nom de l'auteur et de son adresse complète.

- Le résumé qui doit indiquer le contenu et les conclusions de l'article et doit faire référence à des informations nouvelles. Le résumé ne doit pas excéder 200 mots et peut être divisé en paragraphes numérotés.

- Les mots clés. Une petite liste de mots clés permettant une rapide analyse du contenu de l'article et utilisable pour la compilation de l'index.

- Les articles doivent être divisés en : Introduction, Matériel et Méthodes, Résultats et Discussion. Pour les articles de synthèse, les auteurs peuvent choisir la présentation qui leur convient.

- Remerciements.

- Références. Les auteurs doivent suivre le "Harvard system". Les références doivent être données dans l'ordre suivant : nom de l'auteur et ses initiales, date (entre parenthèses), titre de l'article, nom du journal tel qu'il est abrégé dans la liste mondiale des périodiques scientifiques (4ème édit. 1963), le volume et les première et dernières pages de l'article.

Pour les livres, il est nécessaire d'indiquer le nom de l'auteur et ses initiales, la date de publication, le titre, l'édition, le nombre de pages, le nom de l'éditeur et le lieu d'édition.

Dans le texte, les références doivent être indiquées sous la forme suivante : Dupont (1964) ou (Dupont, 1964). Lorsque la référence comprend plus de deux auteurs, par exemple Dupont, Durand et Martin, l'article doit être cité comme Dupont et coll. sauf si cela peut prêter à confusion. Si l'on cite des articles d'un même auteur publiés la même année, ils doivent être distingués par les lettres a, b, etc.

La référence à un article sous presse doit signifier que l'article a été accepté pour publication et elle doit s'écrire de la façon suivante :

SETOYAMA K. (1982) Effect of water on molecular motion of silk fibroin. *J. Seric. Sci. Jpn.* Sous presse.

6) Illustrations. Le manuscrit sera accompagné de toutes les illustrations nécessaires mais celles-ci ne doivent pas être insérées dans le texte. Toutes les photographies, graphiques et diagrammes doivent être numérotés consécutivement en chiffres arabes, dans l'ordre de citation du texte.

Les photographies sur papier brillant, ou les épreuves positives (pas de négatifs ou de diapositives) doivent être envoyées si possible sans montage et en nombre limité.

Les cartes, graphiques ou diagrammes doivent être dessinés nettement à l'encre noire sur le papier ou du carton blanc de bonne qualité. Les inscriptions apparaissant sur les illustrations doivent être complètes et de taille suffisante pour permettre une réduction importante si nécessaire.

Les illustrations ne doivent pas dépasser le format 14 × 19 cm. Au dos de chaque illustration doivent être indiqués le nom de l'auteur, le n° de la figure (en chiffres arabes) et l'orientation de l'illustration si nécessaire.

Les légendes des figures doivent être dactylographiées sur une feuille séparée et non pas au dos de l'original et elles doivent être suffisamment explicites pour éviter que l'on se reporte au texte.

7) Tableaux. Ils doivent être numérotés en chiffres romains et dactylographiés sur des feuilles séparées. Les titres doivent être suffisamment clairs sans qu'il soit nécessaire de se reporter au texte. Tous les tableaux et figures doivent être cités dans le texte.

8) Seules les abréviations normalisées sont autorisées. Lorsque des abréviations particulières sont utilisées, le nom devra d'abord être donné en entier suivi de l'abréviation entre parenthèses.

9) Le nom latin de toutes les espèces étudiées doit être indiqué.

10) Les corrections des épreuves doivent se limiter aux fautes de frappe. Toutes modifications importantes de l'article seront facturées à l'auteur.

11) Un bon de commande de tirés à part est fourni en même temps que les épreuves. Les auteurs peuvent ainsi commander des tirés à part en renvoyant les épreuves. Il est à noter que 25 tirés à part sont envoyés gratuitement par l'éditeur.

