

sericologia

Revue des Vers à Soie

Journal of Silkworms

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

Directeur Gérant
Rédacteur en Chef

B. MAUCHAMP
G. CHAVANCY

Managing Director
Chief Editor

COMITE DE REDACTION **EDITORIAL BOARD**

ALMEIDA J. E. (Brésil / *Brazil*)
CAPPELLOZZA S. (Italie / *Italy*)
CHEN Y. (Chine / *China*)
COUBLE P. (France)
DANDIN S.B. (Inde / *India*)
DAS B.C. (Inde / *India*)
DOIRA H. (Japon / *Japan*)
FONSECA T.C. (Brésil / *Brazil*)
FREDDI G. (Italie / *Italy*)
GOLDSMITH M.R. (USA)
GUO X. (Chine / *China*)
HE K. (Chine / *China*)
IATROU K. (Grèce / *Greece*)
JOLLY M.S. (Inde / *India*)
KOBAYASHI M. (Japon / *Japan*)
KUSAKABE T. (Japon / *Japan*)
LEA H. Z. (Corée / *Korea*)

LEGAY J.-M. (France)
MACHII H. (Japon / *Japan*)
MANO Y. (Japon / *Japan*)
MASE K. (Japon / *Japan*)
MAUCHAMP B. (France)
MIRANDA J. E. (Brésil / *Brazil*)
REALI G. (Italie / *Italy*)
SHIMURA K. (Japon / *Japan*)
SOMASHEKAR T.H. (Inde / *India*)
SONWALKAR T.N. (Inde / *India*)
TAZIMA Y. (Japon / *Japan*)
TRENCZEK T. (Allemagne / *Germany*)
TZENOV P. (Bulgarie / *Bulgaria*)
VAGO C. (France)
XIA Q. (Chine / *China*)
YAMASHITA O. (Japon / *Japan*)
YUNGEN M. (Chine / *China*)

SOMMAIRE - CONTENTS

Articles scientifiques / Scientific papers

- Assesment of genetic diversity and association of PCR anchored ISSR markers with yield traits in silkworm, *Bombyx mori* L.** 1
 Evaluation de la diversité génétique et association des marqueurs ISSR générés par PCR avec les caractères de rendement chez le ver à soie, *Bombyx mori* L. 15
 MALIK FAROOQ, H. P. PUTTARAJU & S. N. CHATERJEE

- Development of polyvoltine breeds of the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. with androgenic origin** 21
 Mise au point de lignées polyvoltines du ver à soie mûrier, *Bombyx mori* L. avec une origine androgène 29
 RAVINDRA SINGH, R. NIRUPAMA, D. GANGOPADHYAY & C. K. KAMBLE

- Proteomic profiling of testis proteins from the silkworm, *Bombyx mori*** 33
 Profil protéomique des testicules du ver à soie, *Bombyx mori* 43
 KOHJI YAMAMOTO, PINGBO ZHANG, YUTAKA BANNO & H. FUJII

- The mouthpart sensillae in the larvae of tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D. (Lepidoptera: Saturniidae)** 47
 Sensilles de l'appareil buccal chez les larves du ver à soie tasar, *Antheraea mylitta* D. (Lépidoptères : Saturniidae) 59
 S. M. WAZALWAR & A. M. KHURAD

- Fluctuation in the concentration of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves with the timing of pruning of the branches** 63
 Fluctuation de la concentration en 1-deoxynojirimycine chez les feuilles de mûrier selon la période de taille des branches 71
 RITSUKO MURAKAMI, AKIO KOYAMA & HIROE YASUI

Rapports techniques / Technical reports

- Eco-friendly innovative techniques for reverting crop losses due to weeds, into gains, in sericulture** 75
 Techniques innovantes écologiques pour transformer en gains les pertes de récoltes dues aux mauvaises herbes en sériciculture 81
 P. S. SINHA, RAM KUMAR, S. BECK, R. K. MISHRA, M. C. JOSHI, S. N. SINHADEO & M. K. SINGH

- Effect of feeding duration on some economical parameters of the tasar silkworm *Antheraea mylitta* Drury** 85
 Effet de la durée d'alimentation sur certains paramètres économiques du ver à soie tasar *Antheraea mylitta* Drury 91
 DINESH KUMAR, P. K. MISHRA, B. M. K. SINGH, S. K. SHARAN & N. SURYANARAYANA

- Effect of oil cakes and pesticides on rhizosphere and rhizoplane microflora in mulberry (*Morus* spp.)** 95
 Effet des tourteaux et des pesticides sur les microflore de la rhizosphère et du rhizoplane chez le mûrier (*Morus* spp.) 107
 D. D. SHARMA, DIVIA BABY, V. NISHITA NAIK & V. R. MALA

Note brève / Brief note

Patterning defects in silkworm embryos analysed through cuticle preparations . . .	113
Défauts de structuration dans les embryons de ver à soie analysés par des préparations de cuticule	119
AMITH SINGH, MADHURI KANGO-SINGH & K. P. GOPINATHAN	

ASSESSMENT OF GENETIC DIVERSITY AND ASSOCIATION OF PCR ANCHORED ISSR MARKERS WITH YIELD TRAITS IN SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

MALIK FAROOQ, H. P. PUTTARAJU¹ & S. N. CHATTERJEE²

S.K. University of Agricultural Sciences and Technology, Division of Sericulture, Mirgund, Kashmir, India.

¹Department of Sericulture, Bangalore University, Bangalore, India.

²Seri-Biotech Research Laboratory, C.S.B., Bangalore, India

Silkworm (Bombyx mori L.) is characterized by a wide variability in yield and developmental traits, which has been proven through conventional genetic analysis. However; appropriate protocols that could unravel useful genetic variability in silkworms are yet to be developed. In this context, it is pertinent to mention that molecular markers are known to provide unambiguous estimates of genetic variability among populations since they are independent of confounding effects of environment. In view of this we studied inter- simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and association of these markers with yield parameters in 14 diverse strains of silkworm using primers that anneal to simple repeats of various lengths, sequence and non-repetitive motifs at the 5' and 3' end. The PCR products were visualized on agarose gels with ethidium bromide staining. Out of 20 primers used, 11 gave interpretable banding patterns and revealed substantial polymorphisms among the 14 silkworm strains of diverse geographic origin. Among the primers used, the dinucleotide motifs gave more useful and polymorphic banding patterns. Out of a total of 101 bands generated 92% were polymorphic. Diapausing and non-diapausing silkworm stocks could be distinguished by specific markers. The dendrogram generated by UPGMA analysis based on ISSR data resolved the 14 silkworm strains into two groups; one comprising of diapausing strains and the other non-diapausing strains. The studies revealed the suitability of PCR based ISSR technique in generating polymorphic markers and in the assessment of genetic diversity in silkworm.

Keywords: *Bombyx mori*, DNA polymorphism, genetic diversity, ISSR- PCR.

INTRODUCTION

The assessment of genetic diversity is a major concern in plant and animal improvement programme. This is important for several reasons: first the ability to distinguish reliably different genotypes is important for designing the breeding programme. Second an estimation of the magnitude of variation within and between genotypes is useful for predicting potential genetic gain in a breeding programme and in setting up appropriate crossbreeding strategies. Presently, morphological and phenotypic characteristics are being used for these purposes. Since such characteristics are often controlled by multiple genes and subject to varying degrees of environmental interaction, the differences between genotypes are not always reliable (Falconer and Mackay, 1996). Selectively neutral molecular markers are considered to provide the best estimates of genetic diversity since they are independent of the confounding effects of environmental factors (Nagaraju and Singh, 1997).

The advent of polymerase chain reaction (PCR) has resulted in the development of molecular techniques which have already made rapid impact in population genetics, analysis of biodiversity, genetic mapping and studies of relationships among populations at different levels. Many PCR based molecular techniques like RAPDs, SSRs and AFLPs have been developed and utilized to characterize

genetically the plant and animal populations (Panaud *et al.*, 1995; Provan *et al.*, 1996; Buteler *et al.*, 1999). Many of these molecular marker techniques have recently been employed to characterize and assess the DNA profile of different silkworm populations (Nagaraja and Nagaraju, 1995; Reddy *et al.*, 1999a; Tan *et al.*, 2001 and Chatterjee and Mohandas, 2003). In the light of these studies PCR based inter simple sequence repeats (ISSRs) technique was employed to study the DNA profile of fourteen diverse strains of silkworm. These DNA markers would be useful in producing reliable estimates of genetic divergence for the selection of parents for the development of elite hybrids of silkworm. The DNA markers generated and their association with yield traits could also be used in marker assisted selection.

Simple sequence repeats (SSRs) abundant in higher eukaryotic genomes, are tandem repetitive DNA sequences with repeat length of short motifs (1-5 base pairs). Repeated anchored primers that amplify regions between SSRs are referred to as inter-simple sequences repeats (Tsumura *et al.*, 1996). ISSRs are useful for detecting genetic polymorphism and have been used to fingerprint closely related individuals (Zietkiewicz *et al.*, 1994). ISSR markers involve PCR amplification of DNA using a single primer composed of a micro satellite sequence anchored at the 3' or 5' ends by 2 - 4 arbitrary nucleotides. (Fang and Roose, 1997)

MATERIALS AND METHODS

Basic Material / Silkworm stocks:

The experiment was conducted at Seri-Biotech Research Laboratory, Central Silk Board, Bangalore, India. Out of fourteen silkworm genotypes (Table I), eleven non-diapausing strains *viz.*, C₁₀₈, Gonkomonrie, Haulak, Jam₂₁, J₁₂₂, Sanish-P, M₇, M₄₂, K_A, NB₁₈ and P₅ were collected from The Division of Sericulture, S.K University of Agricultural Sciences and Technology, Mirgund, Kashmir, India. The remaining three non- diapausing silkworm strains *viz.*, C. Nichi, GNP and Sarupat were obtained from Seri-Biotech Research Laboratory, Bangalore, India. The larvae of these silkworm genotypes were reared and later used to extract DNA.

DNA Isolation:

Three day old 5th instar silkworm larvae free from any disease symptoms were dissected and their silk gland was extracted. The silk gland was ground in liquid nitrogen using a pestle and mortar. To this powder, extraction buffer (2 PK-100mM Tris HCL (pH 8.0); 50mM NaCl; 50mM EDTA and 1% SDS) was added and the samples were transferred to 50ml Oakridge tubes. Proteinase K (100µg/ml) was added and the samples were incubated at 37°C in a water bath for 3-4 hours with occasional swirling. After incubation an equal volume of saturated phenol was added to each tube and after mixing gently the samples were centrifuged at 8000 rpm for 10-15 minutes at room temperature. The supernatant DNA was collected in clean autoclaved Oakridge tubes and an equal volume of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (24:24:1) was added and the process of DNA isolation repeated. The supernatant DNA was collected again and an equal volume of chloroform was added and the process of DNA isolation repeated. After chloroform treatment the supernatant was collected in an autoclaved glass tube and 1/10th volume of 3M sodium acetate (pH: 5.2) and two volumes of cold double distilled alcohol was added and allowed to precipitate. The DNA pellet was collected, washed in 70% alcohol, dried in room temperature and dissolved in TE (10mM Tris HCL; 1mM EDTA :pH 8.0).

RNAase Treatment:

A considerable quantity of RNA is often precipitated during DNA isolation process. RNA can cause falsely elevated readings during DNA quantization. To overcome the problem caused by contaminating RNA, DNA samples were treated with RNAase. RNAase (100ug/ml) was added and the DNA samples were incubated for one hour at 37°C. The process of DNA isolation was carried

out twice, first with PCI and later with chloroform as was done earlier. The DNA was precipitated, washed with 70% alcohol and dried in room temperature. The dried DNA was dissolved in TE (pH: 8.0) and stored at -20°C . The genomic DNA was quantified on 0.8% agarose gels and diluted to uniform concentration (10ng/ μl) for PCR studies.

DNA amplification:

The amplification of genomic DNA (Polymerase chain reaction) was carried out in 25 μl reaction volume containing 5 μl (50ng) DNA; 5 μl of 10x formamide; 2.5 μl 10x buffer (25mM); 1.5 μl MgCl_2 (25mM); 2.5 μl dNTP; 4 μl ISSR primer (10mM); 0.3 μl of Taq DNA(Genei) and 4.2 μl ddH₂O (deionised water). The PCR reaction mix (20 μl) was prepared in one batch and then added to each sample. The PCR amplification was carried out in a DNA thermal cycler (MJ Research PTC-2000). The reaction was conducted under the following conditions: an initial 2min denaturation step at 94°C was followed by 35 cycles of denaturation for 30 s at 94°C , annealing for 30 s at 50°C and an extension for 2 min at 72°C . The final amplification was finished by 10min at 72°C to enable complete extension of the PCR products.

The PCR products were analyzed on 1.5% agarose gels in 1xTBE buffer (89mM Tris, 89mM boric acid and 2mM EDTA). Out of 25 μl reaction volume, 12.5 μl were loaded for electrophoresis. Along with amplified products 2 μl of DNA ladder (1Kb) was loaded on either side of the gel. The amplified products were detected by staining with ethidium bromide. The electrophoresis was carried out for 2 hours at 40-60 volts. The gels were documented with gel documentation unit of UVP, UK. The photographs were utilized for binary scoring.

Primers used:

The primers used were of University of British Columbia, Biotechnology Laboratory Primer kit No9. A total of twenty primers were utilized for the study, but only eleven primers amplified scorable PCR products. The details of the primers are given in Table III.

Data Analysis:

Each silkworm genotype was scored for the presence (1) and absence (0) of the amplified products. Faint, unstable and weak bands were not scored for analysis. The data were analyzed using SPSS/ PC +10 computer package. The package was used to assess the significance of different yield variables for the silkworm stocks used. The multiple regression analysis (MRA) was carried out using the step wise model of selecting variables for the regression equation. The procedures tested were average linkage analysis for the construction of dendrogram. Genetic distances were calculated for each pair of genotypes.

RESULTS

The fourteen silkworm genotypes selected for the present study comprised eleven high yielding bivoltine and three low yielding polyvoltine silkworm strains. These silkworm strains were of diverse geographic origin. To ascertain utility of ISSR-PCR in the assessment of genetic diversity among these diverse silkworm genotypes, we utilized twenty ISSR primers but only eleven primers amplified scorable PCR products. ISSR amplification of the fourteen silkworm strains with the eleven primers yielded a total of 101 bands of which 93 (92%) were polymorphic (Table IV). Most of the primers generated more than ten polymorphic fragments with reliable and reproducible polymorphic patterns. The number and size of amplified products varied depending upon the silkworm genotype (figs.1 & 2). The amplified products varied in size from 1.1-2.0 kb to 0.5 – 3.0 kb. All primers revealed polymorphisms among the fourteen silkworm stocks.

Table I. Yield and other parameters of 14 silkworm genotypes used for PCR-ISSR analysis

Tableau I. Rendement et autres paramètres de 14 génotypes de vers à soie utilisés pour l'analyse ISSR.

Silkworm race	Origin	H/NH NO	EGG NO	LAR WT	C WT	S WT	YLD WT	YLD NO	YLD SAT
<i>Race de ver à soie</i>	<i>Origine</i>								
C108	CHINA / CHINE	H	675	45	1.85	34	15.4	8187	H
Gonkomonrie	JAPAN / JAPON	H	595	44	1.86	33	15.2	7801	H
Haulak	CHINA / CHINE	H	611	45	1.87	32	17.1	8800	H
Jam21	INDIA / INDE	H	528	44	1.90	31	15.0	7763	H
J122	CHINA / CHINE	H	625	44	1.82	34	18.7	7633	H
Sanish P	RUSSIA / RUSSIE	H	594	44	1.84	33	18.0	7894	H
M7	INDIA / INDE	H	590	39	1.86	30	11.2	7008	H
M42	INDIA / INDE	H	694	45	1.88	33	14.3	7069	H
KA	INDIA / INDE	H	602	52	2.01	44	16.0	8255	H
NB18	INDIA / INDE	H	580	48	1.86	39	18.0	9066	H
P5	INDIA / INDE	H	701	53	2.11	47	22.5	8403	H
C Nichi	CHINA / CHINE	NH	397	21	1.00	12	8.2	7923	L
G N P	CHINA / CHINE	NH	417	24	1.13	17	8.5	7592	L
Saraput	INDIA / INDE	NH	405	25	1.16	17	9.0	7712	L

Table II. Details of abbreviations used in Table I.**Tableau II. Précisions sur les abréviations utilisées dans le Tableau I.**

S No	Parameter <i>Paramètre</i>	Abbreviation <i>Abréviation</i>	Unit <i>Unité</i>
1	No of eggs laid by one moth <i>Nbre d'oeufs pondus par un papillon</i>	EGG NO	No <i>Nbre</i>
2	Weight of ten mature larvae <i>Poids de dix larves matures</i>	LAR WT	g
3	Cocoon weight <i>Poids du cocon</i>	CWT	g
4	Shell weight <i>Poids de la coque</i>	SWT	Cg
5	Yield per 10,000 larvae by weight <i>Rendement pour 10 000 larves au poids</i>	YLDWT	Kg
6	Yield per 10,000 larvae in number <i>Rendement pour 10 000 larves en nombre</i>	YLD NO	no
7	Yield status (H=high ;L=low) <i>Etat du rendement H = Important ; L = faible</i>	YLDSAT	Numeric(1-2) <i>Numérique (1-2)</i>
8	Hibernating/Non-hibernating <i>A diapause / Sans diapause</i>	N/NH	

The hierarchical clustering was done on the bases of DNA markers generated by eleven primers and a dendrogram was generated (fig 3). The fourteen silkworm genotypes were separated into two major clusters. Cluster-A comprised three multivoltine genotypes viz., GNP, Sarupat and C.Nichi. Cluster-B included all bivoltine breeds except KA, which formed a separate cluster. Cluster-B was further resolved into four sub-clusters, viz; B1, B2, B3 and B4. Sub-cluster B-1 included Haulak, M7 and M42; Sub-cluster B-2 comprised Gonkomonrie, Sanish P, C₁₀₈ and Jam21; Sub-Cluster B-3 had only one silkworm stock viz., P₅ and Sub-Cluster B-4 had J₁₂₂ and NB₁₈. Cluster C comprised only KA.

While evaluating the estimates of genetic distance between different silkworm genotypes (Table V) it was observed that C₁₀₈ occupied a unique position because it served as a link in the formation of different clusters. GNP and Sarupat were most closely related genotypes at a distance coefficient of 10.0 followed by Haulak and M₇ at a distance coefficient of 21.0. The largest distance of 42.9 was observed between C₁₀₈ and KA so these two genotypes were the most distantly related.

Table III. Details of primers used in ISSR study.

Tableau III. Précisions sur les amorces utilisées dans l'étude ISSR.

Primer No.	Sequence
<i>No. de l'amorce</i>	
807	AGA GAG AGA GAG AGA GT
808	AGA GAG AGA GAG AGA GC
809	AGA GAG AGA GAG AGA CG
810	GAG AGA GAG AGA GAG AT
811	GAG AGA GAG AGA GAG AC
812	GAG AGA GAG AGA GAG AA
825	ACA CAC ACA CAC ACA CT
835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC
855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT
861	ACC ACC ACC ACC ACC ACC
881	GGGG TGG GGT GGG GTG

Table IV. Data on the generation of PCR products by 11 ISSR primers.

Tableau IV. Données sur la génération de produits PCR par 11 amorces ISSR.

Primer	No. of DNA fragments	Percentage polymorphism	Size Range Kb
<i>Amorce</i>	<i>Nbre de fragments d'ADN</i>	<i>Pourcentage de polymorphisme</i>	<i>Fourchette de taille Kb</i>
807	13	92.30	06-3.0
808	13	100.00	0.5-3.0
809	11	100.00	1.0-3.0
810	11	100.00	0.5-2.0
811	10	100.00	0.6-3.0
812	10	100.00	0.5-3.0
825	4	25.00	1.1-2.0
835	11	100.00	0.6-2.6
855	4	100.00	1.7-2.5
861	5	60.00	0.9-2.5
881	9	88.88	0.7-3.0

Table V. Agglomeration Schedule of silkworm genotypes

Tableau V. Regroupement des génotypes du ver à soie.

Stage	Cluster Combined		Coefficient
	Cluster 1	Cluster 1	
	Combinaison de groupe		
Etape	Groupe I	Groupe I	
01	13 (GNP)	14 (Sarupat)	10.00
02	3 (Haulak)	7 (M7)	21.00
03	2 (Gonkomonrie)	6 (Sanish P)	23.00
04	12 (C. Nichi)	13 (GNP)	26.00
05	3 (Haulak)	8 (M42)	26.50
06	1 (C108)	2 (Gonkomonrie)	27.50
07	1 (C108)	4 (Jam21)	30.00
08	1 (C108)	3 (Haulak)	31.66
09	1 (C108)	11 (P5)	33.14
10	5 (J122)	10 (NB18)	34.00
11	1 (C108)	5 (J122)	35.50
12	1 (C108)	12 (C. Nichi)	38.40
13	1 (C108)	9 (KA)	42.92

Association between ISSR markers and yield parameters:

The cluster analysis based on the ISSR DNA markers helps to find the genetic similarity or dissimilarity among the silkworm stocks. This however, will not provide information on the possible role of individual DNA markers in determining the expression of yield components. In this context multiple regression analysis (MRA) is of much utility. Therefore, stepwise multiple regression analysis of all the ISSR DNA markers generated using eleven primers for fourteen silkworm stocks was carried out to ascertain the possible association of DNA markers with various yield components. The results of this analysis are presented in Table VI. The table shows different DNA markers identified at consecutive steps and consequent change in the R^2 estimate for each of the nine parameters considered. The serial selection of the variables is shown up to the stage of significant change of F values. It is evident from the table that the number of bands selected varied from one each in case of yield status and diapause to twelve in case of larval weight. Out of 101 ISSR DNA markers subjected to MRA, a total of 60 markers were selected for their significant association with nine parameters.

It is interesting to note that some of the markers were selected for more than one character, while some were selected for only one yield parameter. For example markers 807.12 and 881.9 were selected for yield by number and origin code, respectively. These two markers were not selected for any other character. However, DNA marker 807.13 was selected at the first step for yield by weight, cocoon weight, egg number, larval weight, shell weight, yield status and diapause. This marker emerged to be the most important as it was selected to seven of the total nine parameters in the first stage of MRA selection. Another fragment 810.11 also seems to be important as it was selected at the 2nd stage for yield by weight and 3rd stage for larval weight. From these results it is evident that the analysis carried out, identified ISSR DNA markers for their significant association with nine yield and other parameters considered for the present study.

Table VI. Result of multiple regression analyses (Stepwise method) for identifying significant association between yield components and specific ISSR- markers.

Tableau VI. Résultat des analyses de régression multiple (méthode par étapes) pour identifier une association significative entre les composantes du rendement et des marqueurs ISSR spécifiques.

DNA-marker Marqueur ADN	R ²	R ² -Change	F-change	Sig. of F-change
YLD WT. / RENDEMENT EN POIDS				
807.13	0.742	0.742	34.566	0.000
+810.11	0.884	0.141	13.347	0.004
+808.9	0.951	0.068	13.934	0.004
+881.5	0.970	0.019	5.757	0.040
+810.9	0.985	0.015	7.708	0.024
+861.3	0.992	0.007	6.683	0.036
YLD NO. / RDT. EN NBRE				
807.12	0.592	0.592	17.383	0.001
+808.4	0.774	0.183	8.891	0.012
+807.10	0.881	0.107	9.020	0.013
+881.6	0.975	0.093	32.918	0.000
+812.5	0.989	0.014	9.949	0.014
+810.3	0.996	0.007	13.078	0.009
COC. WT. / PDS DU COCON				
807.13	0.946	0.946	210.164	0.000
+809.7	0.974	0.028	11.861	0.005
+809.1	0.987	0.013	9.553	0.011
+810.5	0.994	0.007	9.534	0.013
+811.3	0.998	0.005	22.299	0.001
+807.4	0.999	0.001	12.781	0.009
+807.10	1.000	0.000	6.869	0.040
+809.8	1.000	0.000	21.355	0.006
+835.7	1.000	0.000		
ORIGINCOD / CODE D'ORIGINE				
881.9	0.319	0.319	5.633	0.035
+810.5	0.626	0.306	8.995	0.012
+811.3	0.842	0.216	13.700	0.004
+811.8	0.910	0.068	6.791	0.028
+881.7	0.964	0.054	12.047	0.008
+855.2	0.989	0.024	14.875	0.006
+835.8	1.000	0.011		
EGG NO. / NBRE D'OEUFs				
807.13	0.799	0.799	47.636	0.000
+812.3	0.924	0.125	18.212	0.001
+855.3	0.992	0.067	79.923	0.000
+807.4	0.997	0.005	13.885	0.005
+835.10	0.998	0.002	7.569	0.025
+810.7	0.999	0.001	10.119	0.015
+881.1	1.000	0.000	6.690	0.041
+807.3	1.000	0.000	14.281	0.013
+811.10	1.000	0.000	18.087	0.013

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

LARV WT / POIDS DE LA LARVE				
807.13	0.878	0.878	86464	0.000
+809.7	0.961	0.083	23.524	0.001
+810.11	0.981	0.020	10.334	0.009
+807.7	0.989	0.008	6.805	0.028
+809.9	0.997	0.008	20.102	0.002
+811.4	0.999	0.002	23.083	0.002
+810.6	1.000	0.000	6.565	0.043
+808.11	1.000	0.000	13.091	0.015
+835.1	1.000	0.000	27.227	0.006
+881.1	1.000	0.000	22.049	0.018
+835.6	1.000	0.000	40.320	0.024
835.9	1.000	0.000		
SHELLWT / POIDS DE LA COQUE				
807.13	0.755	0.755	36.896	0.000
+811.4	0.938	0.184	32.728	0.000
+808.8	0.968	0.029	9.137	0.13
+808.4	0.981	0.013	6.420	0.032
+881.3	0.994	0.013	15.995	0.004
+812.8	0.998	0.004	14.134	0.007
+807.4	0.999	0.001	9.366	0.022
+809.8	1.000	0.001	107.315	0.000
+835.3	1.000	0.000		
YLDSTAT				
807.13	1.000	1.000		
DIAPOSST				
807.13	1.000	1.000		

DISCUSSION

Reliable estimates of genetic diversity within and between silkworm genotypes are essential for maintenance of germplasm stocks and for selection of parents for synthesis of elite hybrids (Nagaraju and Singh, 1997). The genetic diversity among plant and animal populations has been studied by conventional techniques but of late several DNA fingerprinting techniques have also been employed to study the genetic similarity among different populations. PCR based molecular markers are now playing an increasingly important role in the analysis of genetic diversity among plant and animal populations (Reddy *et al.*; 1999a).

PCR based ISSRs are useful for detecting genetic polymorphism and have been used to fingerprint closely related individuals (Zietkiewicz *et al.*, 1994). The ISSR markers have also been used for identifying closely related plant cultivars (Akagi *et al.*, 1997., Fang and Roose, 1997). But only a few studies have been carried out with silkworm (Reddy *et al.*, 1999 a and 1999 b; Chatterjee and Mohandas, 2003). However, keeping in view the reliability of PCR based ISSR, this technique was used to ascertain the genetic diversity in fourteen silkworm stocks. The association of DNA markers with yield traits was also studied using multiple regression analysis.

The dendrogram generated by UPGMA analysis based on ISSR data gives picture of the similarity among the fourteen silkworm stocks. The 14 strains of silkworm were resolved into two groups; one comprising the diapausing strains and other the non-diapausing strains. The three multivoltine strains viz., GNP, Sarupat and *C. Nichi* formed a separate cluster genetically quite distinct from bivoltine

strains. These three genotypes have different geographical origin: GNP having Chinese origin, Sarupat having Indian origin and *C. Nichi* having Japanese origin. The DNA profile revealed their close similarity obviously because of their non-diapause nature. GNP and Sarupat seemed to be closer to each other and *C. Nichi* a little distant from both. The results are in conformity with results obtained by Reddy *et al.*, (1999). The bivoltine strains except KA formed a major cluster (B). However, this cluster was further resolved into sub-cluster B-1 comprising Haulak, M7 and M42; B-2 comprising Gonkomonrie, Sanish P, C108 and Jam 21. P5 formed sub cluster B-3 while J122 and NB18 formed subcluster B-4. The ISSR based analysis reflected the geographical pedigree and morphological relations of the strains used in the study for example, M7 and M42 came together in sub-cluster B-1 along with Haulak. M7 and M42 are known as Mirgund races and are similar in many phenotypic respects and might have a common ancestry. Haulak has originated from China and M7 and M42 have originated from Kashmir. All these three races have plain larvae and spin oval white cocoons. Gonkomonrie having Japanese origin grouped together in cluster B-2 along with C108 and Jam21. Gonkomonrie and Sanish-P have plain larvae which spin white and elongated cocoons with slight constriction. C108 has plain larvae while Jam21 has marked larvae but both spin oval cocoons. C108 and Jam21 were slightly distant from Gonkomonrie and Sanish-P. J122 and NB18 formed sub-cluster B-4 which indicates their similarity. J122 is a Japanese race with plain larvae which spin long constructed cocoons. NB18 has been evolved from Japanese hybrids. This race resembles J122 in larval and cocoon characters. P5 formed cluster B-3 and KA a separate cluster.

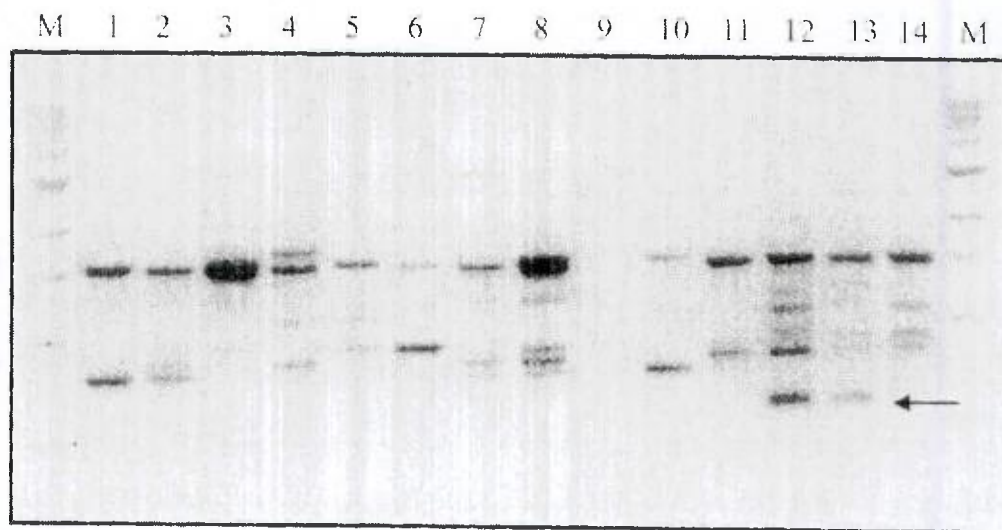


Fig. 1. Result of PCR amplification with ISSR-anchored primer 807. The arrow points out the band 807.13 selected at the first step of MRA for its significant association with YLDWT, COCWT, EGGND, LARWT, SHELLWT, YLDSTAT and DIAPOSST (see Table II).

Fig. 1. Résultat de l'amplification PCR avec l'amorce 807 générée par ISSR. La flèche montre la bande 807.13 sélectionnée à la première étape de la MRA pour son association significative avec YLDWT, COCWT, EGGND, LARWT, SHELLWT, YLDSTAT et DIAPOSST (voir Tableau II).

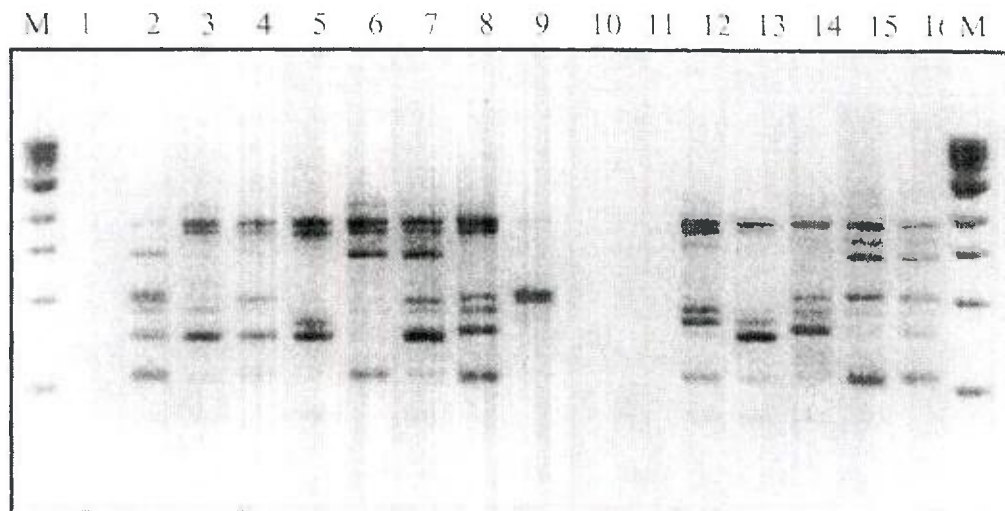


Fig. 2. The separation profile of PCR products realized from the use of ISSR primer 812.

Fig. 2. Profil de séparation des produits PCR réalisés à partir de l'utilisation de l'amorce ISSR 812.

The estimates of the genetic distances within and between clusters demonstrated considerable genetic variability among the silkworm genotypes. The closest strains were GNP and Sarupat among non-diapausing strains and Haulak and M7 among the diapausing races, respectively. The most distant races were C₁₀₈ and KA. C₁₀₈ had a unique position as it got linked to many other races at various clustering stages. The present study is a step towards utilizing the highly informative ISSR loci that provide a ubiquitous marker system for the characterization of silkworm genome. In conclusion ISSR markers offer good potential for differentiating closely related silkworm varieties. However, there is need to study more ISSR primers and investigate the molecular basis of difference among different silkworm strains.

The separation of PCR products on agarose gel stained with ethidium bromide as was done for the present study had been attempted by only a few scientists (Akagi *et al.* 1996; Tsumura *et al.* 1996). The present communication substantiates the suitability of the method in generating highly polymorphic marker profiles with various germplasm resources of a particular insect species. The wide variability of the mean number of markers realized with di-nucleotide primers in the present study supports the earlier observation made in plants (Akagi *et al.* 1996; Nagaoka and Ogihara, 1997).

Association between DNA markers and specific phenotypic characters has been worked out in various animal and plant populations using RFLP and RAPD techniques. Studies have been carried out on the analysis of bulk segregants of F₂, F₃ or back cross progenies for identifying genes for disease resistance (Michalmore *et al.*, 1999). Michalmore also found association of several markers with cocoon and shell weight in silkworm. The regression analysis has been employed to determine the association between genetic marker loci and morpho-biochemical traits in various animal systems including humans (Wilson *et al.*, 1999; Yonash *et al.*, 1999).

HIERARCHICAL CLUSTER ANALYSIS
Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)

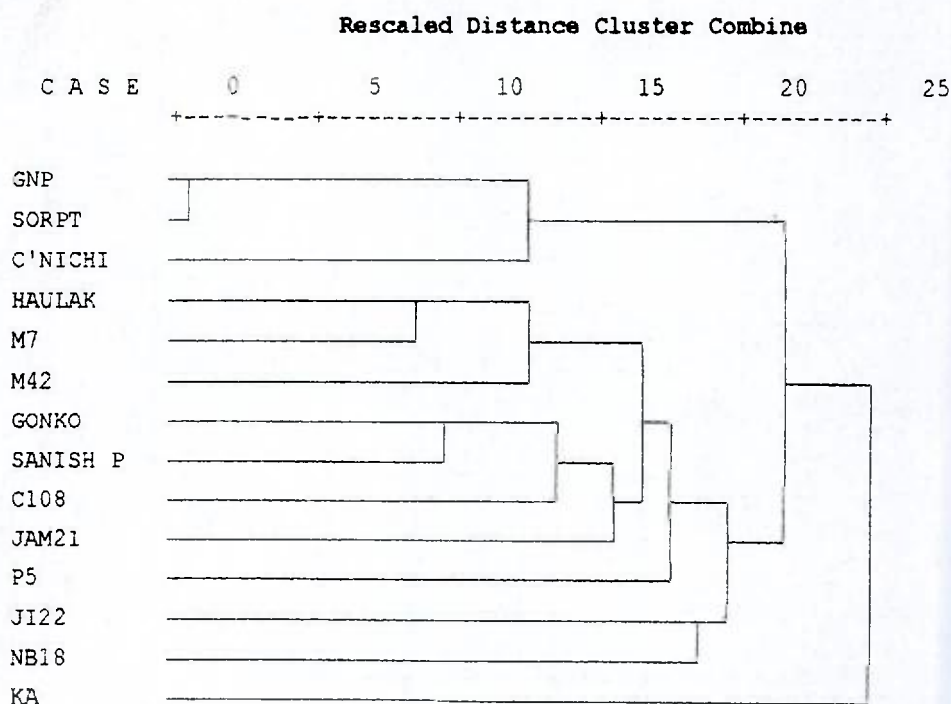


Fig. 3. Dendrogram of fourteen silkworm genotypes based on PCR-ISSR data.

Fig. 3. Dendrogramme de quatorze génotypes de vers à soie d'après les données ISSR.

(SORPT = Sarupat ; GONKO = Gonkomonrie)

Using multiple regression analysis, association of ISSR markers with yield parameters in silkworm has also been reported by Chatterjee and Mohandas (2003). A multivariate regression model was tested with the ISSR DNA markers generated in the present study. The number of markers showing significant contribution towards the yield contributing characters varied from one each in case of yield status and diapause to twelve in case of larval weight. This shows that the present approach appears to be effective in screening the relevant markers. For example some markers (807.13) were specific to non-diapausing strains. These markers are most likely associated with low yield or disease resistance. These markers can be utilized in marker assisted selection (MAS) programmes for improvement of silkworm breeds. This of course, needs further investigations on the generation and selection of markers using molecular techniques.

REFERENCES

- BUTELER, A.I.; JARRET R.L. AND LABONTE, D.R. (1999) Sequence characterisation of microsatellites in diploid and polyploid *Ipomoea*. *Theor. Appl. Genet.*, 99: 123-132.
- FALCONER, D.S. AND MACKAY, T.F.C. (1996) Introduction to quantitative genetics. Fourth Edn. Longman, London. pp. 459.
- FANG, D.C. AND ROOSE, M.L. (1997) Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.*, 95: 408-417.
- MICHALMORE, R.W.; PARAN, I. AND KESSILI, R.V. (1991) Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis; a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88: 9828-9832.
- NAGARAJA, G.M. AND NAGARAJU, J. (1995) Genome fingerprinting of the silkworm, *Bombyx mori* L. using random arbitrary primers. *Electrophoresis*, 16: 1633-1638.
- NAGARAJU, J. AND SINGH, L. (1997) Assessment of genetic diversity by DNA profiling and its significance in silkworm, *Bombyx mori* L. *Electrophoresis*, 18: 1676-1681.
- PANAUD, O.; CHEN, X AND MCCOUCH, S.R. (1995) Frequency of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Genome*, 38: 1170-1176.
- PROVEN, J.; POWELL, W. AND WAUGH, R. (1996) Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). *Theor. Appl. Genet.*, 92: 1078-1084.
- REDDY, K.D.; ABRAHAM, K.G. AND NAGARAJU, J. (1999a) Microsatellite in the silkworm *Bombyx mori* L.; abundance, polymorphism and strain characterization. *Genome*, 42(6): 1057-1065.
- REDDY, K.D.; NAGARAJU, J. AND ABRAHAM, E.G. (1999b) Genetic characterization of the silkworm *Bombyx mori* L. by simple sequence repeat (SSR) anchored PCR. *Heredity*, 83(6): 681-687.
- TAN, Y.D.; WAN, C.; ZHU, Y.; LOU, C.; XIANG, Z. AND DENG, H.W. (2001) An amplified fragment length polymorphism map of silkworm. *Genetics*, 157: 1277-1284.
- TSUMURA, Y.; OHBA, K. AND STRAUSS, S.H. (1996) Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglasfir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theor. Appl. Genet.*, 92: 40-45.
- WILSON, A.F.; ELSTON, R.C.; TRAN, L.D AND SIERVOGEL, R.M. (1999) Use of the robust sib-pair method to screen for single locus, multiple locus and pleiotropic effects: application to traits related to hypertension. *Am. J. Hum. Genet.* 48(5): 862-872.
- YONASH, N.; HELLER, E.D.; HILLEL, J AND CAHANER, A. (1999) Detection of markers associated with antibody response in meat type chickens, Haplotype/ genotype, single band, multiband analysis of RFLP in the major histocompatibility complex. *J. Heredity*, 91(1): 24-30.
- ZIETKIEWIEZ, E.; RAFALSKI, A AND LABUDA, D. (1994) Genetic fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176-183.

EVALUATION DE LA DIVERSITE GENETIQUE ET ASSOCIATION DES MARQUEURS ISSR GENERES PAR PCR AVEC LES CARACTERES DE RENDEMENT CHEZ LE VER A SOIE *BOMBYX MORI* L.

MALIK FAROOQ, H. P. PUTTARAJU¹ & S. N. CHATTERJEE

S. K. University of Agricultural Sciences and Technology, Division of Sericulture, Mirgund, Kashmir, Inde.

1. Department of Sericulture, Bangalore University, Bangalore, Inde.

2. Seri-Biotech Research Laboratory, C.S.B., Bangalore, Inde.

*Les caractères du rendement et du développement du ver à soie (*Bombyx mori* L.) présentent une grande variabilité que l'on a prouvée au cours d'analyses génétiques conventionnelles. Cependant, il reste encore nécessaire de mettre au point les protocoles appropriés qui pourraient révéler une variabilité génétique utile. Dans ce contexte, il est pertinent de mentionner que les marqueurs moléculaires fournissent des estimations claires de la variabilité génétique entre les populations, puisqu'ils sont indépendants des effets inattendus de l'environnement. Dans ce but, nous avons étudié le polymorphisme de séquence répétée inter-simple (ISSR) et l'association de ces marqueurs avec les paramètres de rendement chez 14 souches différentes du ver à soie, en utilisant des amorces qui se lient à des répétitions simples de longueurs, de séquence et de motifs non-répétitifs variés aux extrémités 5' et 3'. On visualise les produits PCR sur des gels d'agarose avec une coloration au bromure d'éthidium. Sur 20 amorces utilisées, 11 donnent des schémas de bandes qui peuvent être interprétés et révèlent des polymorphismes importants parmi les 14 souches de vers à soie d'origine géographique différente. Parmi les amorces utilisées, les motifs dinucléotidiques donnent des schémas de bandes plus utiles et polymorphiques. Sur un ensemble de 101 bandes produites, 92 % sont polymorphiques. On peut distinguer les souches de vers à soie à diapause et sans diapause grâce à des marqueurs spécifiques. Le dendrogramme sur les données ISSR obtenu par analyse UPGMA classe les 14 souches de vers à soie en deux groupes : l'un qui comprend des souches à diapause et l'autre des souches sans diapause. Les études révèlent que la technique ISSR basée sur la PCR est adaptée pour générer des marqueurs polymorphiques et pour évaluer la diversité génétique chez le ver à soie.*

INTRODUCTION

L'évaluation de la diversité génétique est une préoccupation majeure dans les programmes d'amélioration des plantes et des animaux. Elle est importante pour plusieurs raisons : d'abord il est important de distinguer les différents génotypes de manière fiable pour concevoir des programmes de lignage. En deuxième lieu, l'estimation de l'amplitude de la variation à l'intérieur et entre les groupes est utile pour prédire le gain génétique potentiel dans un programme de lignage et pour mettre au point des stratégies de croisement appropriées. A l'heure actuelle, pour atteindre cet objectif, on utilise les caractéristiques morphologiques et phénotypiques. Puisque ces caractéristiques sont souvent contrôlées par des gènes multiples et sont sujettes à des degrés variables d'interactions environnementales, les différences entre les génotypes ne sont pas toujours fiables (Falconer et Mackay, 1996). On considère que des marqueurs moléculaires sélectivement neutres apportent les

meilleures estimations de la diversité génétique, puisqu'ils ne dépendent pas des effets de l'environnement (Nagaraju et Singh, 1997).

La technique de la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) a débouché sur la mise au point de techniques moléculaires qui ont eu un impact rapide sur la génétique des populations, sur l'analyse de la biodiversité, sur la cartographie génétique et sur les études des relations entre les populations à différents niveaux. On a mis au point de nombreuses techniques moléculaires basées sur la PCR comme la RAPD, la SSR et l'AFLP et on les utilise pour caractériser génétiquement les populations de plantes et d'animaux (Panaud et coll., 1995 ; Provan et coll., 1996 ; Buteler et coll., 1999). Récemment, on a beaucoup employé ces techniques de marquage moléculaire pour caractériser et évaluer le profil ADN de différentes populations de vers à soie (Nagaraju et Nagaraju, 1995 ; Reddy et coll., 1999a ; Tan et coll., 2001 et Chatterjee et Mohandas, 2003). En tenant compte de ces études PCR, on a employé la technique ISSR pour étudier le profil ADN de quatorze souches différentes de ver à soie. Ces marqueurs ADN seraient utiles pour obtenir des estimations fiables de la divergence génétique pour la sélection des parents, lors de la mise au point d'hybrides supérieurs du ver à soie. On pourrait aussi utiliser les marqueurs ADN obtenus et leur association avec les caractères du rendement dans la sélection assistée par marqueurs.

Les répétitions de séquence simple (SSRs) abondantes dans les génomes eucaryotiques, sont des séquences d'ADN répétées en tandem avec une longueur de répétition de motifs courts (1 à 5 paires de base). On se réfère aux amorces ancrées répétées qui amplifient les zones entre les SSR comme à des répétitions de séquences intersimples (Tsumura et coll., 1996). Les ISSR sont utiles pour détecter le polymorphisme génétique et on les utilise pour réaliser l'empreinte d'individus étroitement apparentés (Zietkiewicz et coll., 1994). Les marqueurs ISSR impliquent l'amplification par PCR de l'ADN en utilisant une amorce simple composée d'une séquence microsatellite ancrée aux extrémités 3' ou 5' par 2 à 4 nucléotides arbitraires (Fang et Rosse, 1997).

MATERIELS ET METHODES

Matériel de base / Souches de ver à soie :

On a réalisé l'expérience au *Seri-Biotech Research Laboratory*, du *Central Silk Board*, à Bangalore en Inde. Sur quatorze génotypes de ver à soie (Tableau I), on recueille onze souches sans diapause, c'est-à-dire C₁₀₈, Gonkomorie, Haulak, Jam21, J122, Sanish-P, M7, M42, KA, NB₁₈ et P₅ auprès du Département de Sériciculture de la *S. K. University of Agricultural Sciences and Technology*, de Mirgund, dans le Cachemire, en Inde. On obtient les trois autres souches sans diapause, c'est-à-dire *C. nichii*, GNP et Sarupat auprès du *Seri-Biotech Research Laboratory*, de Bangalore en Inde. On élève les larves de ces génotypes de vers à soie et ensuite, on les utilise pour l'extraction de l'ADN.

Isolement de l'ADN :

On dissèque des larves de ver à soie de 3 jours du 5^{ème} âge et on extrait leur glande séricigène. On broie leur glande séricigène dans de l'azote liquide en utilisant un piston et un mortier. On ajoute à cette poudre un tampon d'extraction (2 PK – 100mM Tris HCL (pH 8,0) 50mM NaCl ; 50mM EDTA et 1 % SDS) et on transfère les échantillons dans des tubes Oakridge de 50 ml. On ajoute de la protéinase K (100 µg / ml) et on incube les échantillons à 37° C dans un bain marie pendant 3 à 4 heures en agitant occasionnellement. Après l'incubation, on ajoute un volume égal de phénol saturé dans chaque tube et après avoir doucement remué les échantillons, on les centrifuge à 8000 tpm pendant 10 à 15 minutes à température ambiante. On recueille le surnageant ADN dans des tubes Oakridge propres passés à l'autoclave et on ajoute un volume égal de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (24 : 24 : 1) et on répète le processus d'isolement de l'ADN. On recueille à nouveau le surnageant et on ajoute un volume égal de chloroforme et on répète le processus d'isolement de l'ADN. Après le traitement au chloroforme, on recueille le surnageant dans un tube en verre passé à

l'autoclave et on ajoute 1 /10^{ème} de volume d'acétate de sodium 3M (pH : 5,2) et deux volumes d'alcool froid bidistillé et on laisse précipiter. On recueille le culot d'ADN, on le lave dans de l'alcool à 70 %, on le sèche à température ambiante et on le dissout dans du TE (10mM Tris HCL ; 1 mM EDTA : pH 8,0).

Traitement RNAase :

Une quantité considérable d'ARN est souvent précipitée pendant le processus d'isolement. L'ARN peut provoquer des lectures faussement élevées pendant la quantification de l'ADN. Pour surmonter le problème provoqué par l'ARN contaminant, on traite les échantillons avec de l'ARNase. On ajoute de l'ARNase (100 µg / ml) et on incube les échantillons d'ADN pendant une heure à 37° C. On procède au processus d'isolement de l'ADN deux fois, d'abord avec du PCI et plus tard avec du chloroforme comme cela a été fait précédemment. On fait précipiter l'ADN, on le lave avec de l'alcool à 70 % et on le sèche à température ambiante. On dissout l'ADN sec dans du TE (pH : 8,0) et on le stocke à -20° C. On quantifie l'ADN génomique sur des gels d'agarose à 0,8 % et on les dilue à une concentration uniforme (10 ng / µl) pour les études PCR.

Amplification de l'ADN :

On procède à l'amplification de l'ADN génomique (réaction en chaîne de la polymérase) dans un volume de réaction de 25 µl contenant 5 µl (50 ng) d'ADN ; 5 µl de 10x formamide ; 2,5 µl 10x tampon (25 mM) ; 1,5 µl de MgCl₂ (25mM) ; 2,5 µl de dNTP ; 4 µl d'amorce ISSR (10mM) ; 0,3 µl d'ADN Taq (Genex) et 4,2 µl de ddH₂O (eau déionisée). On prépare le mélange de réaction PCR (20 µl) en un lot et on l'ajoute à chaque échantillon. On procède à l'amplification PCR dans un thermocycleur (MJ Research PTC-2000). On procède à la réaction dans les conditions suivantes : on fait suivre une étape de dénaturation initiale de 2 min à 94° C par 35 cycles de dénaturation de 30 s à 94° C, une fusion pendant 30 s à 50° C et une extension pendant 2 min à 72° C. On termine l'amplification en 10 min. à 72° C pour permettre l'extension complète des produits PCR.

On analyse les produits PCR sur des gels d'agarose à 1,5 % dans un tampon 1 × TBE (89 mM Tris, 89 mM d'acide borique et 2mM EDTA). Sur un volume de réaction de 25 µl, on charge 12,5 µl pour l'électrophorèse. On charge avec les produits amplifiés 2 µl d'ADN (1Kb) sur chaque côté du gel. On détecte les produits amplifiés par une coloration avec du bromure d'éthidium. On procède à l'électrophorèse pendant 2 heures à 40-60 volts. Les gels sont photographiés avec une unité UVP, UK. On utilise les photographies pour l'analyse.

Amorces utilisées :

Les amorces utilisées proviennent du Kit d'Amorces no. 9 du Laboratoire de Biotechnologie de l'Université de British Columbia. On utilise un ensemble de vingt amorces pour l'étude, mais seulement onze amorces ont amplifié des produits PCR utilisables. Les renseignements sur les amorces sont présentés dans le Tableau III.

Analyse des données :

On évalue la présence (1) et l'absence (0) de produits amplifiés chez chaque génotype de ver à soie. On ne tient pas compte des bandes légères, instables et faibles pour l'analyse. On analyse les données en utilisant le logiciel SPSS / PC + 10. On utilise le système pour évaluer la signification des différentes variables de rendement pour les souches de ver à soie utilisées. On procède à l'analyse de régression multiple (MRA) en utilisant le modèle par étapes de sélection des variables pour l'équation de régression. Les procédures testées sont l'analyse de liaison moyenne pour la construction d'un dendrogramme. On calcule les distances génétiques pour chaque paire de génotypes.

RESULTATS

Les quatorze génotypes de ver à soie sélectionnés pour l'étude comprennent onze souches de vers à soie bivoltines à rendement élevé et trois souches de vers à soie polyvoltines à faible rendement. Ces souches de vers à soie ont des origines géographiques différentes. Pour s'assurer de l'utilité de l'ISSR – PCR pour évaluer la diversité génétique des différents génotypes de ver à soie, on utilise vingt amorces ISSR, mais seulement onze amorces amplifient des produits PCR évaluables. L'amplification ISSR des quatorze souches de vers à soie avec les onze amorces donne un ensemble de 101 bandes dont 93 (92 %) sont polymorphiques (Tableau IV). La plupart des amorces donnent plus de dix fragments polymorphiques avec des schémas polymorphiques fiables et reproductibles. Le nombre et la taille des produits amplifiés varient en fonction du génotype de ver à soie (figs. 1 et 2). Les produits amplifiés varient en taille de 1,1 à 2,0 kb à 0,5 - 3 kb. Toutes les amorces révèlent des polymorphismes parmi les quatorze souches de vers à soie.

On procède au regroupement hiérarchique sur la base des marqueurs ADN générés par onze amorces et on réalise un dendrogramme (fig. 3). On sépare les quatorze génotypes de ver à soie en deux groupes principaux. Le groupe A comprend trois génotypes polyvoltins, GNP, Sarupat et *C. Nichi*. Le groupe B comprend toutes les lignées bivoltines sauf KA, qui forme un groupe séparé. Le groupe B est à nouveau subdivisé en quatre sous-groupes, c'est à dire B1, B2, B3 et B4. Le sous-groupe B-1 comprend Haulak, M7 et M42 ; le sous-groupe B2 comprend Gonkomonrie, Sanish P, C108 et Jam21 ; le sous-groupe B-3 est constitué seulement d'une souche c'est-à-dire, P5 et le sous-groupe B-4 comprend J122 et NB18. Le groupe C comprend seulement KA.

Lorsqu'on estime la distance génétique entre les différents génotypes de ver à soie (Tableau V), on observe que C108 occupe une position unique parce qu'il sert de lien entre différents groupes. GNP et Sarupat sont les génotypes les plus étroitement apparentés avec un coefficient de distance de 10, suivis par Haulak et M7 avec un coefficient de distance de 21. On observe la distance la plus grande de 42,9 entre C108 et KA, de sorte que ces deux génotypes sont les plus éloignés

Association entre les marqueurs ISSR et les paramètres de rendement :

L'analyse de regroupement d'après les marqueurs ISSR permet d'évaluer la ressemblance ou la dissimilitude génétiques entre les souches de vers à soie. Cependant, cela n'apporte pas d'informations sur le rôle possible des marqueurs ADN individuels pour déterminer l'expression des composantes du rendement. Dans ce contexte, l'analyse de régression multiple (MRA) est très utile. On procède donc à l'analyse de régression multiple par étapes de tous les marqueurs ISSR obtenus en utilisant onze amorces pour quatorze souches de ver à soie, pour s'assurer de l'association possible des marqueurs ADN avec différents composantes du rendement. Les résultats de cette analyse sont présentés dans le Tableau VI. Le tableau montre les différents marqueurs ADN identifiés pendant les étapes consécutives et le changement consécutif de l'estimation R^2 pour chacun des neuf autres paramètres considérés. La sélection en série des variables est présentée jusqu'au stade de changement significatif des valeurs F. Il est évident d'après le tableau que le nombre de bandes sélectionnées varie de un, dans le cas de l'état du rendement et de la diapause jusqu'à douze dans le cas du poids larvaire. Sur 101 marqueurs ISSR soumis à la MRA, on sélectionne un ensemble de 60 marqueurs pour leur association significative avec neuf paramètres.

Il est intéressant de noter que certains des marqueurs sont sélectionnés pour plus d'un caractère, alors que certains sont sélectionnés pour seulement un paramètre de rendement. Par exemple, les marqueurs 807,12 et 881,9 sont sélectionnés respectivement pour le rendement en nombre et le code d'origine. Ces deux marqueurs ne sont pas sélectionnés pour un autre caractère. Cependant, le marqueur ADN 807,13 est sélectionné à la première étape pour le rendement en poids, le poids du cocon, le nombre d'œufs, le poids de la larve, le poids de la coque, l'état du rendement et la diapause. Ce marqueur semble être le plus important puisqu'il est sélectionné pour sept des neuf paramètres dans la première étape de la sélection MRA. Un autre fragment 810,11 semble aussi être important,

puisque'il est sélectionné pendant la deuxième étape pour le rendement en poids et pendant la 3^{ème} étape pour le poids de la larve. D'après ces résultats, il est évident que l'analyse réalisée identifie les marqueurs ISSR par rapport à leur association significative avec neuf paramètres de rendement et avec d'autres paramètres pris en compte pour l'étude actuelle.

DISCUSSION

Des estimations fiables de la diversité génétique à l'intérieur et entre les génotypes de ver à soie sont essentielles pour le maintien des souches génétiques et pour la sélection des parents pour la mise au point d'hybrides supérieurs (Nagaraju et Singh, 1997). On a étudié la diversité génétique entre les populations d'animaux et de plantes au moyen de techniques conventionnelles, mais, récemment, on a aussi employé plusieurs techniques d'empreintes ADN pour étudier la similarité génétique entre différentes populations. Les marqueurs moléculaires basés sur la génétique jouent maintenant un rôle de plus en plus important pour l'analyse de la diversité génétique entre les populations de plantes et d'animaux (Reddy et coll., 1999a).

Les ISSR basées sur les PCR sont utiles pour détecter le polymorphisme génétique et on les a utilisées pour réaliser l'empreinte d'individus étroitement apparentés (Sizetkiewicz et coll., 1994). On a aussi utilisé les marqueurs ISSR pour identifier les cultivars de plantes étroitement apparentées (Akagi et coll., 1997 ; Fang et Roose, 1997). Mais, il n'y a que quelques études qui ont été réalisées avec le ver à soie (Reddy et coll., 1999a et 1999b ; Chatterjee et Mohandas, 2003). Cependant, compte tenu de la fiabilité de l'ISSR basée sur la PCR, on a utilisé cette technique pour s'assurer de la diversité génétique chez quatorze souches de ver à soie. On a aussi étudié l'association des marqueurs ADN avec les caractères de rendement en utilisant l'analyse de régression multiple.

Le dendrogramme obtenu par l'analyse UPGMA, d'après les données ISSR, donne une image de la similitude entre les quatorze souches de ver à soie. On divise les quatorze souches en deux groupes, l'un comprenant les souches à diapause et l'autre les souches sans diapause. Les trois souches polyvoltines, c'est-à-dire GNP, Sarupat et *C. nichi* forment un groupe séparé génétiquement assez distinct des souches bivoltines. Ces trois génotypes ont une origine géographique différente : GNP ayant une origine chinoise, Sarupat une origine indienne et *C. nichi* une origine japonaise. Le profil ADN révèle leur proche similitude évidemment du fait de leur nature sans diapause. GNP et Sarupat semblent être plus proches l'un de l'autre et *C. nichi* un peu plus distant des deux. Les résultats sont conformes aux résultats obtenus par Reddy et coll., (1999). Les souches bivoltines sauf KA forment un groupe principal (B). Cependant, ce groupe se subdivise en plusieurs groupes : le sous-groupe B1 qui comprend Haulak, M7 et M42 ; B-2 qui comprend Gonkomorie, Sanish P, C108 et Jam21. P5 forme le sous-groupe B-3, tandis que J122 et NB18 forment le sous-groupe B-4. L'analyse basée sur les ISSR reflète l'origine géographique et les relations morphologiques des souches utilisées dans l'étude, par exemple, M7 et M42 sont rassemblés dans le sous-groupe B-1 avec Haulak. M7 et M42 sont connues en tant que races Mirgund et sont similaires à plusieurs égards phénotypiques et pourraient avoir un ancêtre commun. Haulak vient de Chine et M7 et M42 proviennent du Cachemire. Ces trois races ont des larves unies et filent des cocons ovales blancs. Gonkomorie et Sanish-P ont des larves unies qui filent des cocons blancs et allongés légèrement resserrés. C108 a des larves unies tandis que Jam21 a des larves marquées, mais elles filent toutes les deux des cocons ovales. C108 et Jam21 sont légèrement distants de Gonkomorie et Sanish-P. J122 et NB18 forment le sous-groupe B-4, ce qui indique leur similitude. J122 est une race japonaise aux larves unies qui filent de longs cocons charpentés. NB18 a été mis au point à partir d'hybrides japonais. Cette race ressemble à J122 pour les caractères de la larve et du cocon. P5 forme le groupe B-3 et KA un groupe séparé.

Les estimations des distances génétiques à l'intérieur et entre les groupes montrent une variabilité génétique considérable entre les génotypes de ver à soie. Les souches les plus proches sont respectivement GNP et Sarupat parmi les souches sans diapause et Haulak et M7 parmi les races avec diapause. Les races les plus distantes sont C108 et KA. C108 a une position unique puisque'il a été lié

à de nombreuses autres races à différentes étapes du regroupement. Cette étude représente une étape dans l'utilisation de locus ISSR qui apportent un système de marqueurs pour la caractérisation du génome du ver à soie. En conclusion, les marqueurs ISSR offrent un bon potentiel pour différencier des variétés de ver à soie étroitement apparentées. Cependant, il est nécessaire d'étudier plus en détail les amorces ISSR et d'étudier la base moléculaire de la différence entre les différentes souches de ver à soie.

Seuls quelques chercheurs ont essayé la séparation des produits PCR sur un gel d'agarose coloré avec du bromure d'éthidium, comme cela a été fait dans cette étude (Akagi et coll., 1996 ; Tsumura et coll., 1996). Cet article confirme que cette méthode est adaptée pour générer des profils de marqueurs très polymorphiques avec des ressources génétiques variées chez une espèce d'insectes particulière. Dans cette étude, la variabilité importante du nombre moyen de marqueurs obtenus avec des amorces dinucléotides, confirme les observations antérieures qui ont été faites chez les plantes (Akagi et coll., 1996 ; Nagaoka et Ogiwara, 1997).

On a étudié l'association entre les marqueurs ADN et les caractères phénotypiques spécifiques chez différentes populations d'animaux et de plantes en utilisant les techniques RFLP et RAPD. Des études ont été réalisées sur l'analyse en masse de ségrégants de F₂, F₃, ou sur la descendance de croisements de retour pour identifier les gènes de la résistance à la maladie (Michalmore et coll., 1999). Michalmore a aussi observé l'association de plusieurs marqueurs avec le poids du cocon et avec le poids de la coque chez le ver à soie. On a employé l'analyse de régression pour déterminer l'association entre les locus des marqueurs génétiques et les caractères morpho-biochimiques chez plusieurs systèmes animaux y compris chez les humains (Wilson et coll., 1999 ; Yonash et coll., 1999).

Chatterjee et Mohandas (2003) ont aussi signalé l'association des marqueurs ISSR avec les paramètres de rendement chez le ver à soie, en utilisant l'analyse de régression multiple. On a testé un modèle de régression multifactorielle, avec les marqueurs ISSR obtenus dans cette étude. Le nombre de marqueurs qui présentent une contribution significative par rapport aux caractères impliqués dans le rendement, varie de un dans le cas de l'état du rendement et de la diapause à douze dans le cas du poids de la larve. Cela montre que cette approche semble efficace pour évaluer les marqueurs appropriés. Par exemple, certains marqueurs (807,13) sont spécifiques aux souches sans diapause. Ces marqueurs sont très probablement associés à un rendement faible et à une forte résistance aux maladies. On peut utiliser ces marqueurs dans les programmes de sélection assistée par les marqueurs (MAS) pour l'amélioration des lignées de ver à soie. Cela nécessite, bien sur, de plus amples recherches sur la génération et la sélection des marqueurs en utilisant des techniques moléculaires.

DEVELOPMENT OF POLYVOLTINE BREEDS OF THE MULBERRY SILKWORM, *BOMBYX MORI* L. WITH ANDROGENIC ORIGIN

RAVINDRA SINGH*, R. NIRUPAMA, D. GANGOPADHYAY & C. K. KAMBLE

Central Sericultural Research & Training Institute, Mysore - 570 008, India

*This study was carried out to develop bisexual polyvoltine breeds of the silkworm, *Bombyx mori* L. with androgenic origin. The breeds were developed by crossing F₂ males derived from a polyvoltine hybrid BL₆₈ × BL₆₉ with a polyvoltine race 'Nistari' and the eggs were exposed at 38 °C for 200 minutes. The larvae hatched out from these eggs expressed paternal characters. Five polyvoltine breeding lines were developed by repeated backcrosses with androgenic males for several generations. Two polyvoltine × bivoltine hybrids AGL₃ × CSR₂ and AGL₅ × CSR₂ were found promising. This method will be useful to shorten the breeding cycle and to produce homozygous silkworm breeds which are of utmost importance in silkworm breeding.*

Keywords: Androgenic development, *Bombyx mori* L., polyvoltine breeds and hybrids.

INTRODUCTION

In the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L., androgenic development has been induced by means of several agents such as ultraviolet light (Strunnikov, 1983), gamma rays (Xu *et al.*, 1988, 1997), CO₂ gas and dry ice (Tazima and Onuma, 1967; Li *et al.*, 1988), low temperature (Sugai *et al.*, 1987) and high temperature (Ravindra Singh *et al.*, 1991). Among various methods used, high temperature has been proved to be a powerful agent for the induction of androgenic development in the silkworm (Nirupama and Ravindra Singh, 2007). The possibility of developing superior breeds of silkworm through application of androgenesis has been explored (Strunnikov *et al.*, 1982; Malinova *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1997; Nacheva *et al.*, 1999). Androgenesis in the silkworm has been reviewed by several workers (Astaurov, 1957; Strunnikov, 1975; Chowdhury, 1989; Ravindra Singh *et al.*, 2001). The present study was undertaken to develop polyvoltine silkworm breeds utilizing androgenic techniques.

MATERIALS AND METHODS

Induction of androgenic development in the eggs of the silkworm was carried out as per Strunnikov (1983). Nistari, an indigenous polyvoltine race which produces marked larvae and golden yellow spindle shaped cocoons and two evolved polyvoltine silkworm breeds BL₆₈ and BL₆₉ which produce plain larvae and greenish yellow oval cocoons were utilized for the production of androgenic individuals. F₂ males of the polyvoltine BL₆₈ × BL₆₉ were crossed with Nistari females. Moths were allowed to mate for 3 h at 25 °C and after depairing, females were kept at 5 °C for 48 h to synchronize the age of the eggs. Oviposition was carried out in dark condition for 50 - 60 min. Then the eggs were subjected to hot air at 38 °C for 200 min. and transferred to 15 °C for 72 h. At the trace of appearance of serosal colour, eggs were incubated at 25 °C and 75 % relative humidity till hatching. The androgenic development of the eggs was identified with the appearance of reddish-brown / dark pigmentation in the serosa cells. Schematic representation of normal zygotic and androgenic

* Regional Sericultural Research Station, Rowrah - 785 002, Inde.

development in the silkworm is depicted in Fig. 1 and the salient features of the polyvoltine breeds and hybrids are given in Table I.

Development and evaluation of bisexual polyvoltine lines:

Five polyvoltine silkworm breeds *i. e.*, DNP₃, ND₇, BL₆₈, NP₁ and DNP₅ short listed on the basis of multiple traits evaluation index method (Mano *et al.*, 1993) were utilized as initial resource materials to raise the base population. Five bisexual polyvoltine breeding lines *viz.*, AGL₁, AGL₂, AGL₃, AGL₄ and AGL₅ were developed by a series of backcrosses with androgenic males. Out of five polyvoltine breeding lines, two lines AGL₃ and AGL₅ were found promising. The breeding plan for the development of AGL₅ has been depicted in Fig. 2. Two promising polyvoltine × bivoltine hybrids *i.e.*, AGL₃ × CSR₂ and AGL₅ × CSR₂ were short-listed and evaluated. Performance of the hybrids was compared with the ruling hybrid PM × CSR₂ in the laboratory.

RESULTS

Performance of AGL₅:

Generation-wise performance of the androgenic polyvoltine line AGL₅ for 13 characters namely, fecundity, hatching percentage, total larval span, pupation rate, cocoon yield / 10,000 larvae by weight, cocoon weight, cocoon shell weight, cocoon shell percentage, filament length, filament size, reelability, raw silk percentage and neatness has been presented in Table II. Maximum fecundity (562) was observed at F₆ followed by 549 and 545 at F₅ and F₂ respectively. Hatching was maximum (97.57 %) at F₁ followed by F₉ (96.94 %) and F₆ (96.39 %). Pupation rate was maximum at F₄ (97.60 %) followed by F₂ (96.66 %) and F₁₀ (95.33 %). Cocoon yield / 10,000 larvae by weight was found maximum during F₄ (15.080 kg) followed by F₂ (14.763 kg) and F₆ (13.088 kg). Maximum cocoon weight, cocoon shell weight and cocoon shell percentage of 1.533 g and 0.292 g and 19.07 % were recorded during F₄. Filament length ranged from 555 (F₈) to 774 m (F₄). Maximum reelability (84 %) was observed during F₁ and F₈. Raw silk percentage was observed maximum (14.3 %) at F₄ and it ranged from 12.4 to 14.3 %. Maximum neatness of 90 p was noticed during F₄, F₆ and F₇, F₈, F₉ and F₁₀. The line was stabilized as the CV % ranged below the level of 10 % for almost all the characters except cocoon yield / 10,000 larvae by weight.

Evaluation of promising hybrids in the laboratory:

Two promising polyvoltine × bivoltine hybrids *i. e.*, AGL₃ × CSR₂ and AGL₅ × CSR₂ were short-listed and evaluated along with control PM × CSR₂ in the laboratory (Table III). AGL₅ × CSR₂ revealed its superiority exhibiting higher per cent improvement for some of the important economic characters like fecundity (12.16 %), cocoon yield / 10,000 larvae by weight (21.17 %), cocoon weight (13.32 %), cocoon shell weight (26.03 %), cocoon shell percentage (11.26 %), filament length (24.78 %), reelability (5.13 %) and raw silk percentage (10.27 %) than the control.

DISCUSSIONS

Bisexual homozygous silkworm lines have been obtained through application of androgenesis (Strunnikov *et al.*, 1982; Malinova *et al.*, 1996). In this study, five polyvoltine androgenic lines were developed utilizing androgenesis and evaluated in the laboratory.

Development of polyvoltine lines by adopting repeated backcrosses with androgenic males was found suitable for transmission of homozygosity into bisexual lines. Xu *et al.* (1997) have isolated self bred lines of silkworm following irradiation of female pupae with 80 KR gamma rays, crossing female moths with normal males and exposing the eggs at 38 °C for 200 min. Bisexual lines have been developed by crossing F₂ hybrid males to Ps race used as a marker and exposing the eggs at 42 °C for 210 min. (Nacheva *et al.*, 1999).

Table I. Salient features of polyvoltine breeds and hybrids of the silkworm, *B. mori* L.Tableau I. Caractères marquants des lignées et des hybrides polyvoltins du ver à soie *B. mori* L.

Breed / Hybrid	Parentage	Method adopted	Larval Pattern	Cocoon / Cocon	
				Colour	Shape
<i>Lignée / Hybride</i>	<i>Origine</i>	<i>Méthode adoptée</i>	<i>Motif larvaire</i>	<i>Couleur</i>	<i>Forme</i>
Nistari	-	-	Marked bluish white <i>Blanc bleuté avec des marques</i>	Golden yellow <i>Jaune doré</i>	Spindle <i>Cintré</i>
BL68	-	-	Plain bluish white <i>Blanc bleuté uni</i>	Greenish yellow <i>Jaune vert</i>	Oval <i>Ovale</i>
BL69	-	-	Plain bluish white <i>Blanc bleuté uni</i>	Greenish yellow <i>Jaune vert</i>	Oval <i>Ovale</i>
AGL3	BL68 backcrossed with androgenic males <i>Croisements de retour de BL68 avec des mâles androgènes</i>	Application of androgenesis coupled with conventional breeding <i>Application de l'androgénèse associée avec le lignage conventionnel</i>	Plain bluish white <i>Blanc bleuté uni</i>	Greenish yellow <i>Jaune vert</i>	Oval <i>Ovale</i>
AGL5	DNP5 backcrossed with androgenic males <i>Croisements de retour de DNP5 avec des mâles androgènes</i>	Application of androgenesis coupled with conventional breeding <i>Application de l'androgénèse associée avec le lignage conventionnel</i>	Plain bluish white <i>Blanc bleuté uni</i>	Greenish yellow <i>Jaune vert</i>	Oval <i>Ovale</i>
AGL3 × CSR2	-	Conventional hybridization <i>Hybridation conventionnelle</i>	Plain bluish white <i>Blanc bleuté uni</i>	Light greenish yellow <i>Jaune vert clair</i>	Oval <i>Ovale</i>
AGL5 × CSR2	-	Conventional hybridization <i>Hybridation conventionnelle</i>	Plain bluish white <i>Blanc bleuté uni</i>	Plain bluish white <i>Blanc bleuté uni</i>	Oval <i>Ovale</i>
PM × CSR2 (Control / <i>Témoin</i>)	-	Conventional hybridization <i>Hybridation conventionnelle</i>	Plain bluish white <i>Blanc bleuté uni</i>	Light greenish yellow <i>Jaune vert clair</i>	Oval <i>Ovale</i>

Table II. Performance of androgenic polyvoltine line AGL₅.Tableau II. Performance de la lignée polyvoltine androgène AGL₅.

Generation	Fecundity (no.)	Hatching (%)	Total larval span (h)	Pupation rate (%)	Cocoon yield / 10,000 larvae by wt. (kg)	Cocoon wt (g)	Cocoon shell wt. (g)	Cocoon shell (%)	Filament length (m)	Filament size (d)	Reel ability (%)	Raw silk (%)	Neatness (p)
	<i>Fécondité (nbre)</i>	<i>Éclosion (%)</i>	<i>Durée larvaire totale (h)</i>	<i>Taux de nymphe (%)</i>	<i>Rendement en cocons / 10 000 larves en poids (kg)</i>	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Poids de la coque soyeuse (g)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>	<i>Longueur du filament (m)</i>	<i>Titre du filament (d)</i>	<i>Dévidabilité (%)</i>	<i>(%) de soie grège</i>	<i>Netteté (p)</i>
F ₁	515	97.57	482	94.66	11.566	1.261	0.233	18.45	626	2.50	84	13.4	89
F ₂	545	96.12	504	96.66	14.763	1.531	0.270	17.65	675	2.77	81	13.5	89
F ₃	537	95.62	504	94.99	12.783	1.345	0.230	17.10	642	2.55	80	12.4	89
F ₄	537	94.08	504	97.60	15.080	1.533	0.292	19.07	774	2.70	80	14.3	90
F ₅	549	94.24	504	92.55	11.693	1.248	0.228	18.26	603	2.32	78	12.9	89
F ₆	562	96.39	504	91.88	13.088	1.424	0.254	17.86	692	2.44	76	12.7	90
F ₇	529	94.91	504	93.89	12.506	1.333	0.242	18.17	631	2.56	78	13.5	90
F ₈	516	95.66	504	92.50	11.111	1.271	0.225	17.70	555	2.27	84	12.9	90
F ₉	495	96.94	506	91.00	11.433	1.286	0.233	18.13	616	2.37	77	13.6	90
F ₁₀	504	94.22	504	95.33	11.533	1.162	0.218	18.76	643	2.41	79	13.5	90
Mean / <i>Moyenne</i>	529	95.58	502	94.11	12.556	1.339	0.243	18.12	646	2.49	80	13.3	90
SD	21.13	1.21	7.06	2.13	1.40	0.12	0.02	0.57	58.71	0.16	2.71	0.55	0.52
CV%	4.00	1.26	1.41	2.27	11.17	9.14	9.52	3.16	9.09	6.45	3.40	4.13	0.58

Table III. Performance of promising polyvoltine $\times$ bivoltine hybrids in the laboratory.Tableau III. Performance en laboratoire des hybrides polyvoltin $\times$ bivoltin prometteurs.

Hybrids	Fecundity (no)	Hatching (%)	Pupation rate (%)	Cocoon yield/10,000 larvae by wt. (kg)	Cocoon wt. (g)	Cocoon shell wt (g)	Cocoon shell (%)	Filament length (m)	Reelability (%)	Raw silk (%)	Neatness (p)
Hybrides	Fécondité (nbre)	Éclosion (%)	Taux de nympheose (%)	Rendement en cocons / 10 000 larves en poids (kg)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque soyeuse (g)	Richesse soyeuse (%)	Longueur du filament (m)	Dévidabilité (%)	Soie grège (%)	Netteté (p)
AGL ₃ $\times$ CSR ₂	493 (9.07)	96.28 (1.27)	96.04 (2.54)	18.662 (21.14)	1.916 (11.92)	0.391 (24.13)	20.40 (10.93)	1010 (25.77)	82 (5.13)	15.87 (11.68)	92 (2.22)
AGL ₅ $\times$ CSR ₂	507 (12.16)	96.26 (1.25)	96.90 (3.45)	18.666 (21.17)	1.940 (13.32)	0.397 (26.03)	20.46 (11.26)	1002 (24.78)	82 (5.13)	15.67 (10.27)	92 (2.22)
PM $\times$ CSR ₂ (Control / Témoin)	452	95.07	93.66	15.405	1.712	0.315	18.39	803	78	14.21	90

Values in parentheses indicate per cent improvement over control / Les valeurs entre parenthèses indiquent l'amélioration en pourcentage par rapport au témoin.

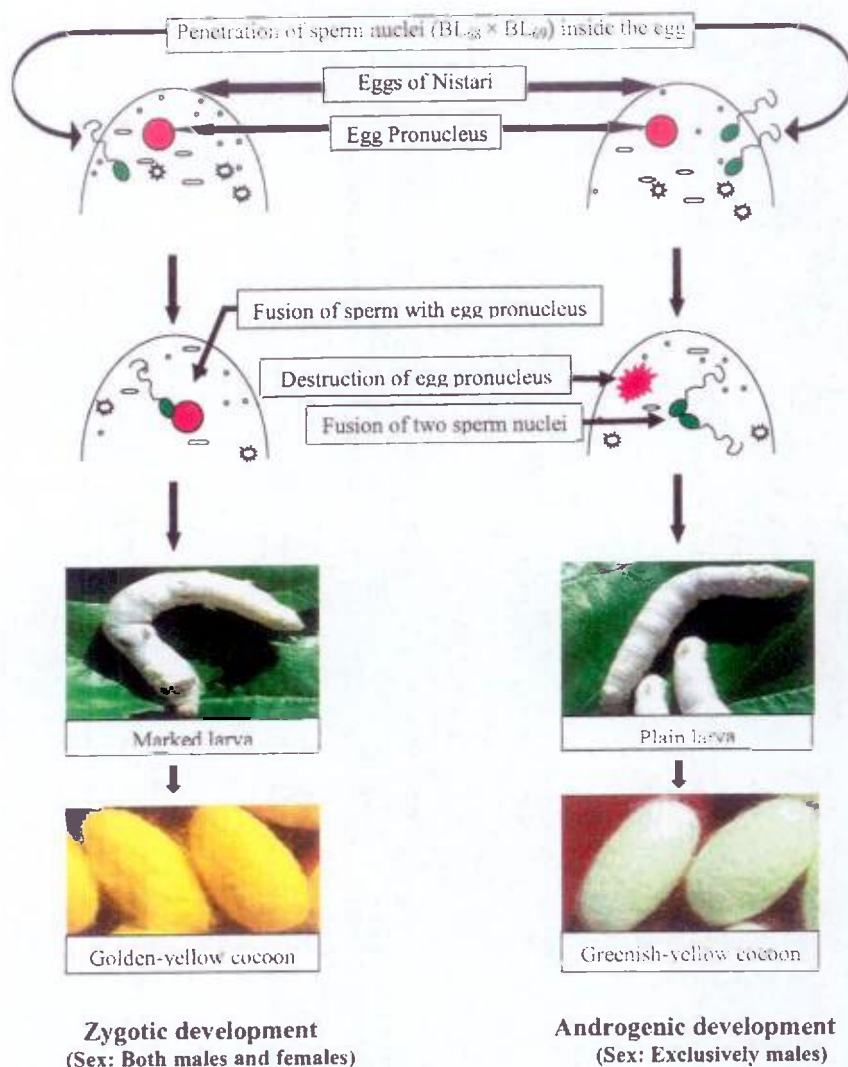


Fig. 1. Diagrammatic representation of normal zygotic and androgenic development in the silkworm, *B. mori* L.

Fig. 1. Diagramme du développement zygotique normal et androgène chez le ver à soie, B. mori L.

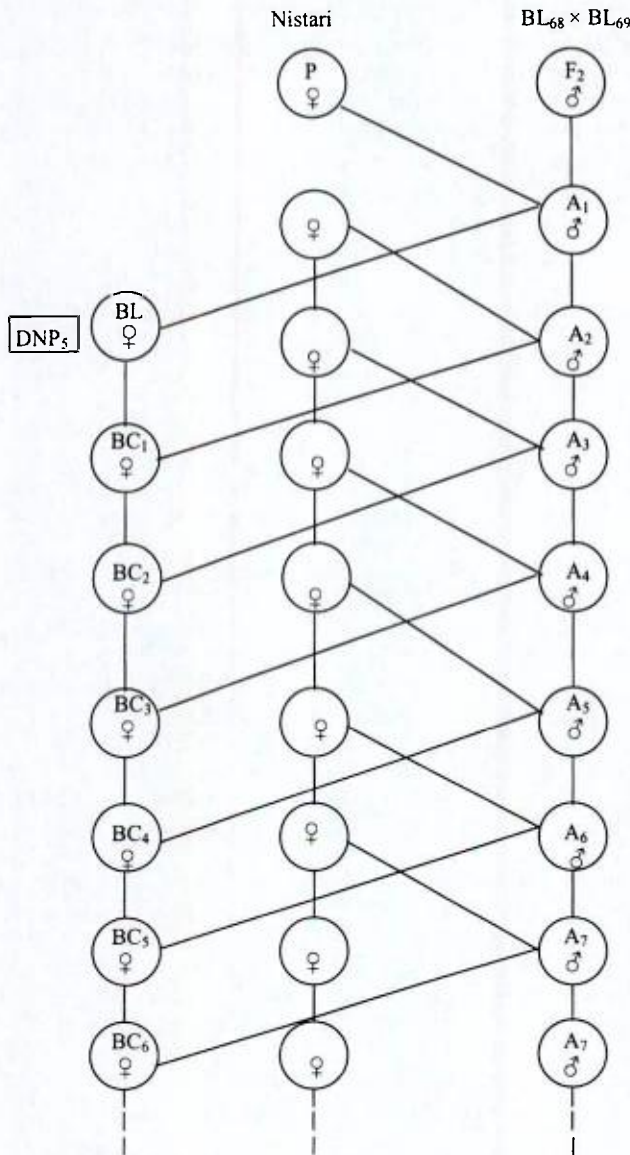


Fig. 2. Breeding plan for the development of multivoltine breed AGLs.

BL - Short listed multivoltine breeding line; **P** - Golden yellow polyvoltine breed as a genetic marker; **A** - Androgenic male; **BC** - Backcrosses.

Fig. 2. Plan de lignage pour la mise au point de la lignée polyvoltine AGLs.

BL - Lignée polyvoltine sélectionnée ; **P** - Lignée polyvoltine jaune doré comme marqueur génétique ; **A** - Mâle androgène ; **BC** - Croisements de retour.

In the present study, two hybrids namely, AGL₃ × CSR₂ and AGL₅ × CSR₂ were selected and further evaluated. Laboratory performance showed the superiority of AGL₅ × CSR₂ over the control PM × CSR₂. Strunnikov *et al.* (1982) have obtained genetically identical copies of homozygous males which were utilized for the development of bisexual lines through repeated backcrosses. Androgenesis in silkworm provides an opportunity in shortening the breeding process. The main advantage of androgenesis is the development of bisexual homozygous lines which are of immense use in silkworm breeding in order to obtain maximum hybrid vigour. Further studies are needed to know the level of homozygosity of the bisexual lines through DNA fingerprinting.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are thankful to the Department of Science and Technology, New Delhi for financial assistance.

REFERENCES

- ASTAUROV B. L. (1957) High temperature as a tool for controlling development and sex determination: A review of studies in artificial parthenogenesis, androgenesis and elimination of embryonic diapause in the silkworm, *Bombyx mori* L. Proc. Zool. Soc. Calcutta, Mookerjee Memoir., 1, 29-56.
- CHOWDHURY S. N. (1989) Parthenogenesis, gynogenesis and androgenesis in silkworm, *Bombyx mori*: A review. Indian J. Seric., 28 (2), 284-292.
- LI W. Q., ABE S. & SAKAGUCHI B. (1988) Induction of androgenesis, gynogenesis and mosaic by treatment with CO₂ gas derived from dry ice. J. Seric. Sci. Japan, 57(1), 43-48.
- MALINOVA K., NACHEVA, J. & PETKOV, N. (1996) Application of androgenesis in silkworm (*Bombyx mori*) breeding. Selskostopanska- Nouka (Bulgaria) Agric. Sci., 34 (4), 34-36.
- MANO Y., NIRMAL KUMAR S., BASAVARAJA, H. K., MAL REDDY, N. & DATTA, R. K. (1993) A new method to select promising silkworm breeds / combinations. Indian Silk, 31, 53.
- NACHEVA Y., PETKOV N., TZENOV P., MALINOVA K. & GENSU C. (1999) Breeding of bisexual lines of the silkworm, *Bombyx mori* L. with androgenetic origin. Bull. Ind. Acad. Seric., 3 (1), 36-41.
- NIRUPAMA R. & RAVINDRA SINGH (2007) Androgenetic development in F₁ hybrids of the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. Uttar Pradesh J. Zool., 27 (2), 247-250.
- RAVINDRA SINGH, RAO D. R., KARIAPPA B. K. & JAYASWAL K. P. (2001) Androgenesis in mulberry silkworm, *Bombyx mori* L.: A review, Int. J. Indust. Entomol., 3 (2), 109-112.
- RAVINDRA SINGH, VIJAYARAGHAVAN K., RAOP. R. M., SENGUPTA K. & PREMALATHA V. (1991) Androgenetic development in the eggs of mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 30 (2), 93-96.
- STRUNNIKOV V. A. (1975) Sex control in silkworms. Nature, 255, 111-113.
- STRUNNIKOV V. A. (1983) Control of silkworm reproduction, development and sex. pp. 1-280, Mir Publishers, Moscow.
- STRUNNIKOV V. A., LEZHENKO S. S. & STEPANOVA N. L. (1982) Genetical identical copies of the mulberry silkworm. Theor. Appl. Genet., 63, 307-315.
- SUGAI E. YOKOYAMA T. & MINO T. (1987) Death of haploid androgenetic eggs in the silkworm, *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Japan, 56 (5), 385-389.
- TAZIMA Y. & ONUMA A. (1967) Experimental induction of androgenesis, gynogenesis and polyploidy in *Bombyx mori* by treatment with CO₂ gas. J. Seric. Sci. Japan, 36 (4), 286-292.
- XU A. Y., LI M. W., FANG A., FEI M. H. & HUANG J. T. (1997) Isolation of self bred line of *Bombyx mori* L. by means of dispermic androgenesis. Sericologia, 37 (2), 199-204.
- XU A., FANG A., & HUN J. T. (1988) Studies on chromosome engineering and its application in *Bombyx mori*. III. Induction of androgenetic silkworm. Acta Sericologica Sinica, 14 (2), 93-96.

MISE AU POINT DE LIGNÉES POLYVOLTINES DU VER À SOIE MURIER, *BOMBYX MORI* L. AVEC UNE ORIGINE ANDROGENE

RAVINDRA SINGH*, R. NIRUPAMA, D. GANGOPADHYAY & C. K. KAMBLE

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

Cette étude a été réalisée pour mettre au point des lignées polyvoltines bisexuelles du ver à soie Bombyx mori L avec une origine androgène. On met au point les lignées en croisant les mâles F2 obtenus à partir d'un hybride polyvotin BL₆₈ × BL₆₉ avec une race polyvoltine « Nistari » et on expose les œufs à 38° C pendant 200 minutes. Les larves qui éclosent à partir de ces œufs expriment les caractères paternels. On met au point cinq lignées polyvoltines par des croisements de retour répétés avec des mâles androgènes pendant plusieurs générations. Deux hybrides polyvotin × bivoltin AGL₃ × CSR₂ et AGL₅ × CSR₂ s'avèrent prometteurs. Cette méthode s'avère utile pour raccourcir le cycle de lignage et pour produire des lignées de vers à soie homozygotes, qui sont d'une importance primordiale dans le lignage du ver à soie.

INTRODUCTION

Chez le ver à soie mûrier, *Bombyx mori* L., on a induit le développement androgène au moyen de plusieurs agents tels que la lumière ultraviolette (Strunnikov, 1983), les rayons gamma (Xu et coll., 1988, 1997), le CO₂ ou la carboglace (Tazima et Onuma, 1967 ; Li et coll., 1988), une température basse (Sugai et coll., 1987) et une température élevée (Ravindra Singh et coll., 1991). Parmi les diverses méthodes utilisées, la température élevée s'avère être un agent puissant pour l'induction du développement androgène chez le ver à soie (Nirupama et Ravindra Singh, 2007). On a exploré la possibilité de mettre au point des lignées de ver à soie supérieures par l'application de l'androgénèse (Strunnikov et coll., 1982 ; Malinova et coll., 1996 ; Xu et coll., 1997 ; Nacheva et coll., 1999). Plusieurs chercheurs ont étudié l'androgénèse chez le ver à soie (Astaurov, 1957 ; Strunnikov, 1975 ; Chowdhury, 1989 ; Ravindra Singh et coll., 2001). On a entrepris cette étude pour mettre au point des lignées de ver à soie polyvoltines en utilisant l'androgénèse.

MATERIELS ET METHODES

On a procédé à l'induction du développement androgène chez les œufs de ver à soie d'après la méthode de Strunnikov (1983). On utilise Nistari, une race polyvoltine indigène qui produit des larves marquées et des cocons jaunes cintrés et deux lignées de vers à soie polyvoltins BL₆₈ et BL₆₉, qui produisent des larves unies et des cocons ovales d'un jaune verdâtre pour la production d'individus androgènes. On croise les mâles F2 du croisement polyvotin BL₆₈ × BL₆₉ avec les femelles Nistari. On laisse les papillons s'accoupler pendant 3 h à 25° C et après les avoir désaccouplés, on conserve les femelles à 5° C pendant 48 h pour synchroniser l'âge des œufs. On procède à la ponte dans l'obscurité pendant 50 à 60 min. Puis, on soumet les œufs à l'air chaud à 38° C pendant 200 min. et on les transfère à 15° C pendant 72 h. A l'apparition de la coloration de la séreuse, on incube les œufs à 25° C, avec une humidité relative de 75 % jusqu'à l'éclosion. On identifie le développement

* Regional Sericultural Research Station, Rowrah - 785 002, Inde.

androgène des œufs avec l'apparition d'une pigmentation brique / foncée des cellules de la séreuse. La représentation schématique du développement zygotique normal et androgène du ver à soie est présentée dans la Fig. 1 et les caractères principaux des lignées polyvoltines et des hybrides sont présentés dans le Tableau I.

Mise au point et évaluation de lignées polyvoltines bisexuelles :

On utilise cinq lignées de vers à soie polyvoltines, c'est-à-dire DNP₃, ND₇, BL₆₈, NP₁ et DNP₅, sélectionnées sur la base de la méthode indiciaire d'évaluation à caractères multiples (Mano et coll., 1993), comme matériaux initiaux de ressource pour élever la population de base. On met au pont cinq lignées polyvoltines bisexuelles c'est-à-dire AGL₁, AGL₂, AGL₃, AGL₄ et AGL₅ par une série de croisements de retour avec des mâles androgènes. Sur cinq lignées polyvoltines, deux lignées AGL₃ et AGL₅ s'avèrent prometteuses. La figure 2 présente le plan de lignage pour la mise au point d'AGL₅. On sélectionne deux hybrides polyvoltin × bivoltin prometteurs, c'est-à-dire AGL₃ × CSR₂ et AGL₅ × CSR₂ et on les évalue. On compare la performance des hybrides avec l'hybride courant PM × CSR₂ en laboratoire.

RESULTATS

Performance d'AGL₅ :

La performance de la lignée polyvoltine androgène AGL₅ en fonction des générations pour 13 caractères à savoir, la fécondité, le pourcentage d'éclosion, la durée larvaire totale, le taux de nymphose, le rendement en cocons / 10 000 larves en poids, le poids du cocon, le poids de la coque soyeuse, la richesse soyeuse, la longueur du filament, le titre du filament, la dévidabilité, le pourcentage de soie grège et la netteté est présentée dans le Tableau II. On observe la fécondité maximum (562) en F₆, suivie par 549 et 545 respectivement en F₅ et F₂. L'éclosion est maximum en F₁ (97,57 %), suivie par F₉ (96,94 %) et F₆ (96,39 %). Le taux de nymphose est maximum en F₄ (97,60 %), suivi par F₂ (96,66 %) et F₁₀ (95,33 %). Le rendement en cocons / 10 000 larves en poids s'avère maximum en F₄ (15,080 kg), suivi par F₂ (14,763 kg) et F₆ (13,088 kg). On enregistre le poids du cocon, de la coque soyeuse et la richesse soyeuse maximums de 1,533 g et 0,292 g et 19,07 % en F₄. La longueur du filament est comprise entre 555 (F₈) et 774 m (F₄). On observe une dévidabilité maximum (84 %) en F₁ et F₈. On observe le pourcentage de soie grège maximum (14,3 %) en F₄ et il est compris entre 12,4 et 14,3 %. On remarque la netteté maximum de 90p en F₄, F₆ et F₇, F₈, F₉ et F₁₀. On stabilise la lignée car le % CV se situe en dessous de 10 % pour presque tous les caractères à l'exception du rendement en cocons / 10 000 larves en poids.

Evaluation des hybrides prometteurs en laboratoire :

On sélectionne deux hybrides prometteurs polyvoltin × bivoltin c'est-à-dire AGL₃ × CSR₂ et AGL₅ × CSR₂ et on les évalue en laboratoire avec le témoin PM × CSR₂ (Tableau III). AGL₅ × CSR₂ révèle sa supériorité, en présentant un pourcentage d'amélioration pour certains caractères économiques importants comme la fécondité (12,16 %), le rendement en cocons / 10 000 larves en poids (21,17 %), le poids du cocon (13,32 %), le poids de la coque soyeuse (26,03 %), la richesse soyeuse (11,26 %), la longueur du filament (24,78 %), la dévidabilité (5,13 %) et le pourcentage de soie grège (10,27 %).

DISCUSSION

On a obtenu des lignées de ver à soie homozygotes bisexuelles par l'application de l'androgénese (Strunnikov et coll., 1982 ; Malinova et coll., 1996). Dans cette étude, nous avons mis au point cinq lignées androgènes polyvoltines en utilisant l'androgénese et nous les avons évaluées en laboratoire.

On a constaté que la mise au point de lignées polyvoltines en adoptant des croisements de retour répétés avec des mâles androgènes est adaptée pour la transmission de l'homozygotie chez les lignées bisexuelles. Xu et coll., (1997) ont isolé des lignées de ver à soie autolignées après l'irradiation de nymphes femelles avec des rayons gamma 80 KR, en croisant les papillons femelles avec des mâles normaux et en exposant les œufs à 38° C pendant 200 min. Des lignées bisexuelles ont été obtenues en croisant des mâles hybrides F2 à la race Ps comme marqueur et en exposant les œufs à 42° C pendant 210 min. (Nacheva et coll., 1999).

Dans cette étude, on a sélectionné deux hybrides à savoir, $AGL_3 \times CSR_2$ et $AGL_5 \times CSR_2$ et on les a évalués. La performance en laboratoire montre la supériorité d' $AGL_5 \times CSR_2$ par rapport au témoin $PM \times CSR_2$. Strunnikov et coll., (1982) ont obtenu des copies génétiquement identiques de mâles homozygotes, qui ont été utilisées pour la mise au point de lignées bisexuelles par des croisements répétés. L'androgénèse chez le ver à soie présente un potentiel pour raccourcir le processus de lignage. Le principal avantage qu'apporte l'androgénèse est la mise au point de lignées homozygotes bisexuelles, qui sont très utiles dans le lignage du ver à soie pour obtenir un maximum de vigueur hybride. Des études supplémentaires sont nécessaires pour connaître le niveau d'homozygotie des lignées bisexuelles par les empreintes ADN.

PROTEOMIC PROFILING OF TESTIS PROTEINS FROM THE SILKWORM, *BOMBYX MORI*

KOHI YAMAMOTO ¹*, PINGBO ZHANG ¹, YUTAKA BANNO ¹, & H. FUJII ¹

¹ Laboratories of Insect Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan.

Testis of Bombyx mori is an organ specialized for the reproduction of male silkworms. In this study, we report on analysis of the testis proteins of silkworms and the identification of many of those proteins by use of a two-dimensional electrophoresis (2-DE). We detected approximately 400 protein spots by use of 2-DE, of which 40 spots were excised and characterized by an in-gel digestion followed by peptide mass mapping. All of them were tentatively identified. These were then categorized into groups by their cell structure, metabolism and defense. This was the first proteomic analysis of silkworm testis, and our data will provide new insights into testis function in silkworms.

Keywords: *Bombyx mori*, electrophoresis, proteomics, silkworm, testis.

INTRODUCTION

The silkworm, *Bombyx mori*, is an agriculturally important insect for its silk production. More than 450 silkworm mutants have been reported according to their egg-shape, skin color at larval stage and cocoon-shape (<http://kaiko.kyushu-u.ac.jp/index.html>). Thus, the genetic resources for *B. mori* make it possible to be a model animal for lepidopteran insects. After the draft sequencing of the *B. mori* genome was completed (Mita *et al.*, 2004; Xia *et al.*, 2004), the next challenge was to extract biological information by a systematic expression and functional analysis of the genes. Previously, we reported a successful methodology for the proteomics of *B. mori* silk glands (Zhang *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2005), skeleton muscles (Zhang *et al.*, 2007), and hemolymphs (Wang *et al.*, 2004).

Testis of *B. mori* is an important tissue for the reproduction of male silkworms. Recently, an artificial fertilization technique has been applied in the silkworm for the frozen storage of silkworm genetic resources without rearing (Takemura *et al.*, 2006). A proteomics analysis study on fifth instar testis or any other stages of the life cycle of *B. mori* have not been examined so far. Proteomics is a prominent technology that has been widely applied to address biological questions. For better understanding of the physiological function of *B. mori* testis, we designed the experiment to explore the use of 2-DE for separating testis proteins followed by peptide mass mapping (PMM) analysis in order to construct a profile and database of relevant proteins.

MATERIALS AND METHODS

Silkworm and testis sample:

The *B. mori* larvae (p50 strain) were maintained at the Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University (Fukuoka, Japan) and reared on fresh mulberry leaves at 25 °C.

* Corresponding author: Kohji Yamamoto, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan. E-mail: yamamok@agr.kyushu-u.ac.jp. Fax: +81-92-624-1011

On day 3 of the 5th instar, the testes were dissected at 4 °C in 0.75 % NaCl. The resultant testes were washed in the same solution, blotted on a filter paper, rapidly frozen in liquid nitrogen, and stored at – 80 °C until used. Frozen tissues were ground in with liquid N₂ by mortar and pestle, and homogenized with a buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH8.0), 3 mM EDTA, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 0.5 mM pepstatin, 0.5 mM leupeptin, 0.02 mM chymostatin, 0.05 mM diisopropyl fluorophosphate, 8 M urea, 2 M thiourea, 4 % (w/v) 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylanmonio]-1-propanesulfate, 0.03 M dithioerythritol, and 2 % (v/v) pH 3-10 Pharmalyte (Amersham Biosciences). After being sonicated several times for 20 s (Elma Ultrasonic, Germany), the supernatant was obtained by centrifugation at 15,000 × g for 15 min. Protein concentration in the fraction was measured by the Bio-Rad protein assay kit using bovine serum albumin as a standard.

2-DE:

The 2-DE experiments were performed for the most part as described previously (Zhang *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2007). A portion of 200 µg of extracted polypeptides for every sample was loaded onto an IPG strip (Amersham Pharmacia Biotech), and then an IEF was carried out with an Ettan IPGphor IEF system (Amersham Pharmacia Biotech) at 50 V for 12 h, 500 V for 1 h, 1000 V for 1 h, 4000 V for 1 h, 6000 V for 1 h, and 8000 V for 10 h (a total of 90 000 V·h). The strips were equilibrated for 15 min in a 50mM Tris-HCl buffer, pH 8.8, containing 6 M urea, 2% SDS, 30% glycerol, and 1% DTT. This step was repeated using the same buffer containing 4% iodoacetamide in place of 1% DTT. Then, the strips were subjected to the second-dimensional gel electrophoresis under denaturing conditions (SDS-PAGE) by transferring them onto 15% polyacrylamide gels with 0.27% SDS overlaid with 5% stacking gels. The electrophoresis was performed in a vertical slab gel apparatus (Eido, Japan) at 20mA per gel overnight at 4 °C. After the SDS-PAGE, the polypeptides were visualized using a modified silver stained method (Shevchenko *et al.* 1996).

MALDI-TOF/MS and PMM analysis:

The resulting 2-DE protein patterns were photographed and assigned their apparent MW and pI values using the PDQuest program (BioRad Laboratories, Hercules, CA) after the silver staining detailed above. The spots of interest were excised from the SDS-PAGE gel and were done in-gel digestion using the previously reported method (Zhang *et al.* 2007). Briefly, the excised gel was destained, rinsed with water and incubated in 100% acetonitrile for 5 min. In-gel digestion was carried out by incubation with trypsin overnight at 37 °C. The resulting peptides were extracted with a solution containing 60% acetonitrile and 1% trifluoroacetic acid (TFA). Aliquots (1 µl) from the in-gel digestion were mixed with 1 µl of 10 mg/ml cyano-4-hydroxycinnamic acid (35% acetonitrile and 0.1% TFA). The measurements were calibrated externally and internally with a peptide mixture containing angiotensin I, angiotensin II, adrenocorticotrophic hormone, and peptide fragments arising from autoproteolysis of trypsin. All analyses were performed using a PerSeptive Biosystem MALDI-TOF Voyager-DE RPO Biospectrometry workstation (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA). The workstation was operated in the delayed extraction (DE) and in a positive-ion linear mode with the following parameters: 20 kV acceleration voltage, 95% grid voltage, 100 ns delay time, and a 500 *m/z* low mass gate. Peaks detected by mass spectrometry were subjected to the SwissWISS-ProtROT database for searches with MS-Fit software (<http://prospector.ucsf.edu>).

RESULTS

Construction of the detection system for protein spots in the silkworm testis:

To investigate the pattern of proteins synthesized in the tissue, total proteins were prepared from the testis of silkworms and subjected to 2-DE, followed by staining with silver nitrate. Over pI and molecular mass ranges between pI 3 and 10 and between 14 and 94 kDa, respectively, we exhibited approximately 400 proteins spots by 2-DE (Fig. 1).

Table I. List of testis proteins separated by 2-DE.

Tableau I. Liste des protéines des testicules séparées par 2-DE.

Spot no.	Protein name	Functional category	Accession no.	MW/pI	Coverage (%)
No. du spot	Nom de la protéine	Catégorie fonctionnelle	No. d'entrée		Couverture (%)
1	Cellular retinoic acid binding protein <i>Protéine de liaison de l'acide rétinolique cellulaire</i>	Transport	Q2QEH2	14839/5.5	45
2	ATP-dependent RNA helicase <i>Hélicase de l'ARN dépendant de l'ATP</i>	Transport	Q5AJD0	60126/5.6	17
3	Heat shock protein <i>Protéine de choc thermique</i>	Cell defense <i>Défense des cellules</i>	Q26936	71232/5.3	12
4	Heat shock protein <i>Protéine de choc thermique</i>	Cell defense <i>Défense des cellules</i>	097146	17160/10.9	56
5	Late expression factor 8 <i>Facteur 8 d'expression tardive</i>	Transcription <i>Traduction</i>	Q283K1	26637/9.6	26
6	Small GTP-binding protein Rab1 <i>Petite protéine Rab1 liant le GTP</i>	Transport	gil1116081	22558/9.3	23
7	Ribosomal protein S4 <i>Protéine ribosomique S4</i>	Cell structure <i>Structure de la cellule</i>	GIL1129840	29603/10.8	29
8	Eukaryotic translation initiation factor <i>Facteur eukaryotique d'initiation de la traduction</i>	Translation <i>Traduction</i>	gil1129830	28006/4.7	25
9	J domain containing protein <i>Protéine contenant le domaine J</i>	Metabolism <i>Métabolisme</i>	gil1129836	19241/6.1	33
10	RNA binding motif protein 17 <i>Protéine 17 du motif de liaison de l'ARN</i>	Translation <i>Traduction</i>	gil9510290	43446/5.8	13
11	14kDa subunit splicing factor <i>Facteur d'épissage de la sous-unité 14kDa</i>	Translation <i>Traduction</i>	gil1129829	14624/9.8	26
12	Haloacid dehalogenase	Metabolism/ <i>Métabolisme</i>	gil9510275	27739/9.3	20

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

Spot no.	Protein name	Functional category	Accession no.	MW/pI	Coverage (%)
No. du spot	Nom de la protéine	Catégorie fonctionnelle	No. d'entrée		Couverture (%)
13	Histon	Cell structure <i>Structure de la cellule</i>	gil8724850	26923/4.9	20
14	Carbonic anhydrase	Metabolism / <i>Métabolisme</i>	Q1CF80	26790/6.0	29
15	Glutamate 5-kinase	Metabolism / <i>Métabolisme</i>	Q3CA28	29629/5.0	23
16	Dehydropteroate synthase	Metabolism/ <i>Métabolisme</i>	Q67J10	29969/5.6	25
17	unknown <i>inconnue</i>	unknown <i>inconnue</i>	unknown <i>inconnue</i>	unknown <i>inconnue</i>	***
18	unknown <i>inconnue</i>	unknown <i>inconnue</i>	unknown <i>inconnue</i>	unknown <i>inconnue</i>	***
19	26S proteasome regulatory protein <i>Protéine 26S régulatrice du protéasome</i>	Metabolism <i>Métabolisme</i>	gil8724864	42991/5.9	16
20	Serine / threonine protein kinase <i>Kinase de la protéine serine / thréonine</i>	Signal transduction <i>Transduction du signal</i>	Q2UZ51	37412/6.2	15
21	Annexin isoform 2 <i>Isoforme 2 de l'annexine</i>	Cell defense <i>Défense de la cellule</i>	gil8724845	36001/4.5	15
22	P35 protein <i>Protéine P35</i>	Cell structure <i>Structure de la cellule</i>	gil2749779	34845/6.2	20
23	Porphobilinogen deaminase	Metabolism <i>Métabolisme</i>	Q1YDX3	3313/7.6	12
24	Low molecular 30 kDa Lipoprotein <i>Lipoprotéine 30kDa à faible molécule</i>	Unknown <i>inconnue</i>	gil126416	30013/7.6	33
25	elf2B-alpha protein <i>Protéine elf2B</i>	Translation <i>Traduction</i>	gil1101749	33664/5.9	20
26	Hypothetical protein / <i>protéine hypothétique</i>	unknown / <i>inconnue</i>	42546007	74385/7.3	9

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

Spot no.	Protein name	Functional category	Accession no.	MW/pI	Coverage (%)
No. du spot	Nom de la protéine	Catégorie fonctionnelle	No. d'entrée		Couverture (%)
27	Cystathionine gamma-lyase <i>gamma-lyase de la cystathionine</i>	Metabolism <i>Métabolisme</i>	gil8724809	43011/6.5	17
28	Casein kinase 2 <i>Kinase 2 de la caséine</i>	Signal transduction <i>Transduction du signal</i>	gil1129832	41703/6.8	8
29	unknown <i>inconnue</i>	unknown <i>inconnue</i>	unknown <i>inconnue</i>	unknown <i>inconnue</i>	...
30	Proteasome 26S non ATPase subunit <i>Sous-unité du protéasome 26S non ATPase</i>	Metabolism <i>Métabolisme</i>	gil8724839	51791/6.1	18
31	Elongation factor Ts <i>Facteur d'allongement Ts</i>	Translation <i>Traduction</i>	gil9510262	34055/6.4	17
32	unknown / <i>inconnue</i>	unknown / <i>inconnue</i>	unknown / <i>inconnue</i>	unknown / <i>inconnue</i>	...
33	Eukaryotic translation initiation factor <i>Facteur d'initiation de la traduction eukaryotique</i>	Translation <i>Traduction</i>	gil9510287	30289/9.3	24
34	30 k protein precursor <i>Précurseur de la protéine 30k</i>	Cell structure <i>Structure de la cellule</i>	gil129845	29714/6.1	18
35	unknown / <i>inconnue</i>	unknown / <i>inconnue</i>	unknown / <i>inconnue</i>	unknown / <i>inconnue</i>	...
36	Translation elongation factor <i>Facteur d'allongement de la traduction</i>	Translation <i>Traduction</i>	Q1MRE2	32424/5.1	26
37	Transcriptional regulator <i>Régulateur transcriptionnel</i>	Transcription	Q829T5	22530/5.3	22
38	Similar to <i>D. melanogaster</i> LD08534 <i>Similaire à LD08534 de D. melanogaster</i>	unknown <i>inconnue</i>	Q6XIJ9	18719/5.7	45
39	unknown / <i>inconnue</i>	unknown / <i>inconnue</i>	unknown / <i>inconnue</i>	unknown / <i>inconnue</i>	...
40	ATP synthase	Transport	gil9510294	26100/ 9.5	26

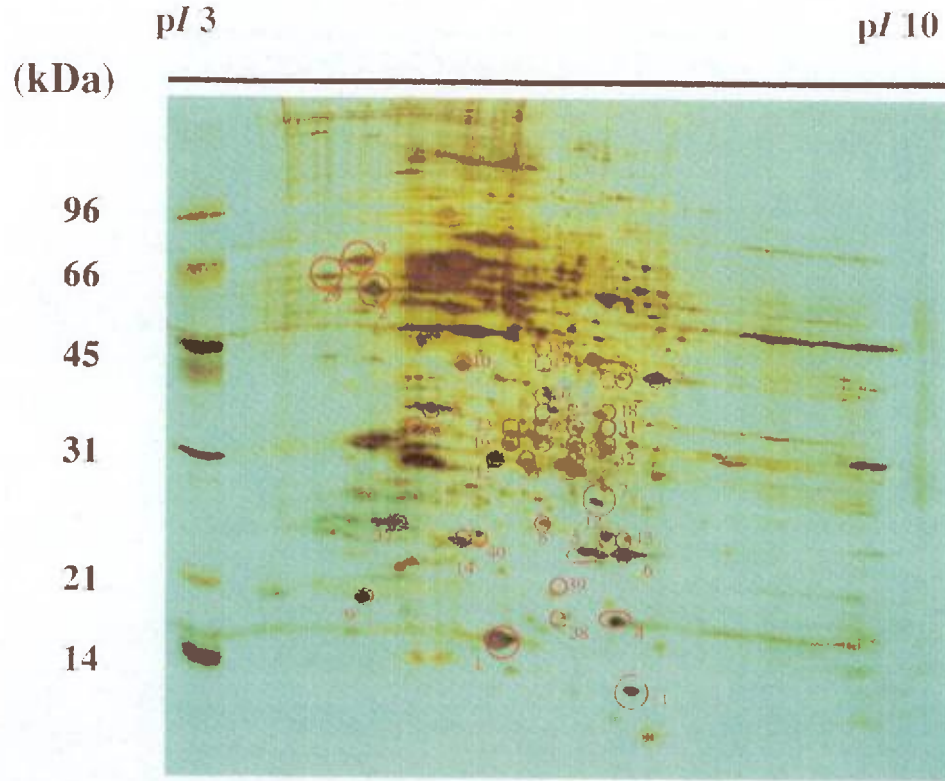


Fig. 1. 2-DE of testis proteins of a normal type of silkworm.

We exhibited approximately 400 proteins spots by 2-DE, of which 40 spots were boxed in red and characterized by in-gel digestion followed by peptide mass fingerprinting PMM. Most of the proteins were tentatively identified.

Fig. 1. 2-DE des protéines des testicules d'un type normal de ver à soie.

Nous présentons approximativement 400 taches de protéines par 2-DE, dont 40 taches sont entourées de rouge et caractérisées par une digestion sur gel suivie par une empreinte PMM de masse des peptides. On a tenté d'identifier la plupart des protéines.

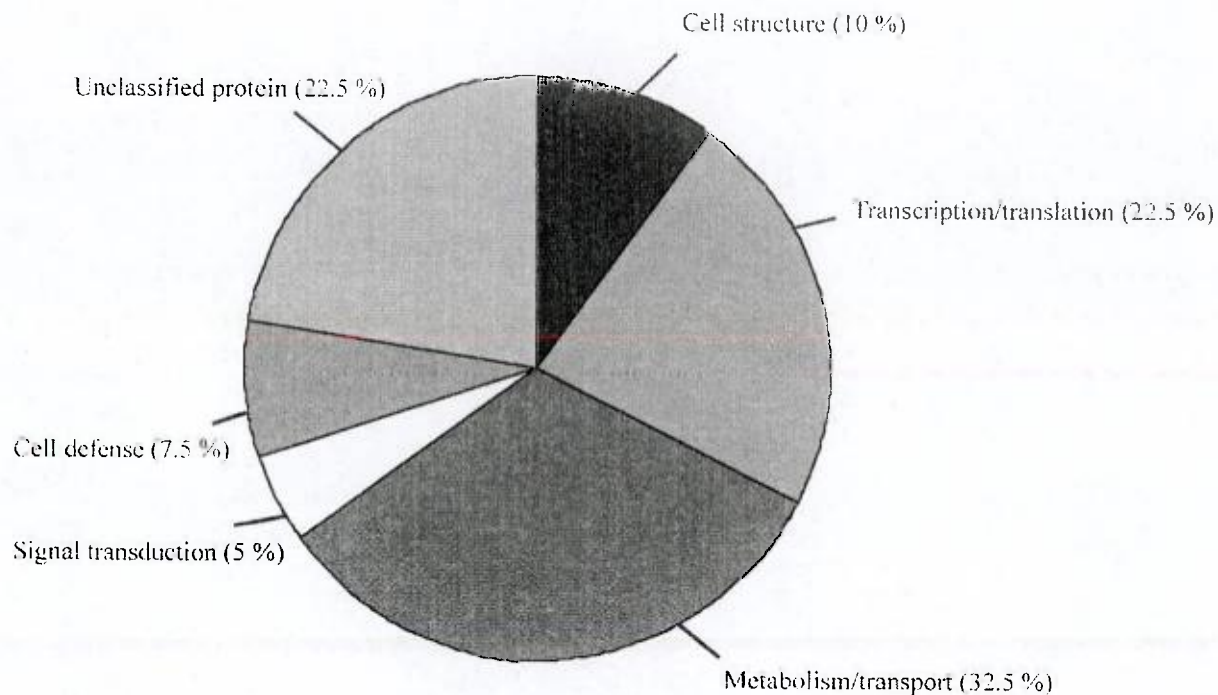


Fig. 2. Testis proteins representing functional categories.

The pie chart shows the distribution of these proteins into their functional classes by percentage. A total of 40 proteins were identified and divided into several groups, based on the known and /or postulated functions of the registered proteins.

Fig. 2. Protéines des testicules représentant des catégories fonctionnelles.

Le camembert montre la distribution de ces protéines dans leurs classes fonctionnelles en pourcentage. On identifie un ensemble de 40 protéines et on les divise en plusieurs groupes, d'après les fonctions connues et /ou supposées des protéines enregistrées.

A high-resolution 2-D gel reference map was also established. Among the testis proteins expressed in the p50 strain, forty spots of these polypeptides were excised from the gels and subjected to in-gel digestion with trypsin, mass spectroscopic analysis, and PMM analysis.

PMM and functional representation:

We picked up spots in the pH range from 4 to 8 and between approximate molecular masses of 10 to 60 kDa, which did not overlap. The peptide masses of those spots were searched against the Swiss-Prot database and in-house database, and are listed in Table 1. The identified 40 non-redundant proteins were classified into five functional categories (Fig. 2), out of which cell structure (10 %) and transcription/translation (22.5 %), metabolism and transport (32.5 %), cell defense (7.5 %), and signal transduction (5 %) were the most highly represented. The largest category was protein involved in metabolism and transport, and the second largest was transcription and translation. These proteins are needed for the development and homeostasis of silkworm testis in the fifth instar larvae, and because silkworm spermatocyte is divided actively during the fifth larval instar, hypertrophy of the silkworm testis was observed. The unclassified proteins in the testis accounted for almost 22.5 % of the total identified proteins. These proteins were previously not identified in the testis of *B. mori*. These proteins are expressed as unknown and hypothetical proteins in Table 1. In addition, low molecular 30 kDa lipoprotein was identified in the silkworm, but the physiological role remains unclear. Thus, this protein was grouped into the unclassified protein.

DISCUSSION

In this study, we investigated proteins synthesized in larval testis by a proteomic approach using 2-DE, and MALDI-TOF/MS. The analysis presented here is a preliminary study and was an initial step towards a systematic proteomic analysis of silkworm testis. *B. mori*, belonging to Lepidoptera, the second most numerous orders of insects that include many species important for agriculture and forestry, is a good model organism for studying insect physiology and biochemistry. Thus, advances in *B. mori* research will not only facilitate the development of new strategies for pest control but also help in the elucidation of insect biology. This investigation represents a systematic proteomics study of testis proteins expressed during the fifth instar larvae stage of *B. mori* using widely used complementary approaches with 2-D gel-based proteomics coupled with TOF-MS. Proteins belonging to five functional categories were identified and we found, novel proteins in the silkworm testis. Proteins involved in cell structure, transcription and translation, transport and metabolism, cell defense, and signal transduction were the most highly represented. These identified proteins with known functional proteins correlate well with the fifth instar larvae stage and physiology. The 2-DE protein pattern of the testis tissue would be useful as a standard for further comparative 2-DE analyses. Although this study reports the existence of several novel proteins in the testis, these proteins could be identified after annotation of the silkworm genome is determined. Further identification of testis proteins by 2-DE and PMM analysis is underway in our laboratory. Application of this proteomics approach to other stages of the silkworm testis will help to better understand both how these proteins are expressed during the development of *B. mori* and further knowledge on artificial fertilization.

ACKNOWLEDGEMENTS

The current work was partially supported by the Kyushu University Interdisciplinary Programs in Education and Projects in Research Development. This research was also supported in part by KAKENHI (19780042).

REFERENCES

- SHEVCHENKO A., WILM M., VORM O., & MANN M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850-858.
- TAKEMURA Y., SAHARA K., MOCHIDA Y., OHNUMA A., (2006) Apyrene sperm from the triploid donors restore fecundity of cryopreserved semen in *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 52, 1021-1026.
- MITAK, KASAHARA M., SASAKI S., NAGAYASU Y., YAMADAT., KANAMORI H., NAMIKI N., KITAGAWA M., YAMASHITA H., YASUKOCHI Y., KADONO-OKUDA K., YAMAMOTO K., AJIMURA M, RAVIKUMAR G, SHIMOMURA M, NAGAMURA Y, SHIN-I T., ABE H., SHIMADA T., MORISHITA S. & SASAKI T. (2004) The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Res.* 29, 27-35.
- WANG Y., ZHANG P., FUJII H., BANNO Y., YAMAMOTO K., ASO Y. (2004) Proteomic studies of lipopolysaccharide-induced polypeptides in the silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 1821-1823.
- XIA Q., ZHOU Z., LU C, CHENG D., *et al.* (2004) A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science.* 10, 1937-40.
- ZHANG P. ASO Y. JIKUYA H. KUSAKABE T. LEE JM. KAWAGUCHI Y. YAMAMOTO K. BANNO Y. FUJII H. (2007) Proteomic profiling of the silkworm skeletal muscle proteins during larval-pupal metamorphosis. *J. Research Proteome.* 6, 2295-2303.
- ZHANG P., ASO Y., YAMAMOTO K., BANNO Y., WANG Y., TSUCHIDA K., KAWAGUCHI Y. & FUJII H. (2006) Proteome analysis of silk gland proteins from the silkworm, *Bombyx mori*. *Proteomics.* 6 (8), 2586-99.
- ZHANG P., YAMAMOTO K., ASO Y., BANNO Y., SAKANO D., WANG Y., & FUJII H. (2005) Proteomic studies of isoforms of the P25 component of *Bombyx mori* fibroin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 2086-2093.

PROFIL PROTEOMIQUE DES TESTICULES DU VER A SOIE, *BOMBYX MORI*

KOHI YAMAMOTO^{1*}, PINGBO ZHANG¹, YUTAKA BANNO¹ & H. FUJII¹

1. Laboratories of Insect Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakoza, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japon.

*Les testicules de **Bombyx mori** sont des organes spécialisés dans la reproduction des vers à soie mâles. Cette étude présente l'analyse des protéines des testicules des vers à soie et l'identification d'un grand nombre de ces protéines par l'utilisation d'une électrophorèse à deux dimensions (2-DE). Nous avons détecté approximativement 400 spots de protéines en utilisant la 2-DE, dont 40 ont été excisés et caractérisés par une digestion sur gel, suivie d'une cartographie des peptides. Nous avons tenté de les identifier. On les a ensuite classés dans des catégories : structure cellulaire, métabolisme et défenses. Il s'agit de la première analyse protéomique pour les testicules du ver à soie et nos données apportent un nouvel aperçu sur la fonction des testicules chez le ver à soie.*

INTRODUCTION

Le ver à soie, *Bombyx mori* est un insecte important sur le plan agricole pour sa production de soie. On a signalé plus de 450 mutants de ver à soie, selon la forme de leur œuf, la couleur de leur peau au stade larvaire et la forme de leur cocon (<http://kaiko.kyushu-u.ac.jp/index.html>). Grâce à ces ressources génétiques, *B. mori* peut être un animal modèle pour les insectes lépidoptères. Après avoir réalisé le séquençage du génome de *B. mori* (Mita et coll., 2004 ; Xia et coll., 2004), le défi suivant consistait à extraire des informations biologiques, par l'expression systématique et l'analyse fonctionnelle des gènes. Auparavant, nous avons présenté une méthodologie pour l'analyse protéomique des glandes séricigènes (Zhang et coll., 2006 ; Zhang et coll., 2005), des muscles du squelette (Zhang et coll., 2006 ; Zhang et coll., 2007) et de l'hémolymphe de *B. mori* (Wang et coll., 2004).

Les testicules de *B. mori* sont un tissu important pour la reproduction des vers à soie mâles. Récemment, on a eu recours à une technique de fécondation artificielle pour des ressources génétiques stockées au congélateur sans élevage (Takemura et coll., 2006). Aucune étude n'a été réalisée, jusqu'à présent, sur l'analyse protéomique des testicules du 5^{ème} âge ou pendant d'autres stades du cycle de vie de *B. mori*. L'analyse protéomique est une technologie importante que l'on a beaucoup utilisée pour s'attaquer à des problèmes biologiques. Pour une meilleure compréhension de la fonction physiologique des testicules, nous avons conçu une expérience en utilisant l'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) pour séparer les protéines des testicules, suivie par l'analyse de la cartographie des peptides en masse (PMM), afin de construire un profil et une base de données des protéines concernées.

* Auteur auquel adresser la correspondance : Kohji Yamamoto, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1, Hakoza, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japon. E-mail : yamamok@agr.kyushu-u.ac.jp. Fax : + 81-92-624-1011

MATERIELS ET METHODES

Echantillon de ver à soie et de testicule :

On maintient les larves de *B. mori* (souche p50) à l'Institut des Ressources Génétiques de la Faculté d'Agriculture de l'Université de Kyushu (Fukuoka, Japon) et on les élève sur des feuilles de mûrier fraîches à 25° C. Le 3^{ème} jour du 5^{ème} âge, on dissèque les testicules à 4° C dans du NaCl à 0,75 %. On lave les testicules obtenus dans la même solution, on les sèche sur un papier filtre, on les congèle rapidement dans de l'azote liquide et on les stocke à -80° C jusqu'à l'utilisation. On broie les tissus congelés dans l'azote liquide avec un piston et un mortier et on les homogénéise avec un tampon contenant 20mM de Tris-HCl (pH 8,0°), 3 mM EDTA, 1 mM de fluorure de phénylméthanesulfonyl, 0,5 mM de pepstatine, 0,5 mM de leupeptine, 0,02 mM de chymostatine, 0,05 mM de fluorophosphate de diisopropyl, 8 M d'urée, 2 M de thiourée, 4 % (w/v) 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylamonio]-1-sulfate de propane, 0,03 M de dithioérythritol et 2 % (v/v) pH 3-10 de Pharmalyte (Amersham Biosciences). Après l'avoir traité aux ultrasons plusieurs fois pendant 20 s (Elma Ultrasonic, Allemagne), on obtient le surnageant par centrifugation à 15 000 × g pendant 15 min. On mesure la concentration en protéines dans la fraction avec le kit de dosage des protéines Bio-Rad, en utilisant de la serum-albumine bovine comme étalon.

2-DE :

On réalise les expériences 2-DE en grande partie d'après les descriptions antérieures (Zhang et coll., 2006 ; Zhang et coll., 2007). On charge une part de 200 µg de polypeptides extraits de chaque échantillon sur une bande IPG (Amersham Pharmacia Biotech) et on procède à une séparation par point isoélectrique (IEF) avec un système IEF Ettan IPGphor (Amersham Pharmacia Biotech) à 50 V pendant 12 heures, 500 V pendant 1 h, 1000 V pendant 1 heure, 4000 V pendant 1 h, 6000 V pendant 1 h et 8000 V pendant 10 h (un ensemble de 90 000 V-h). On équilibre les bandes pendant 15 min dans un tampon 50mM Tris-HCl, au pH de 8,8, contenant 6 M d'urée, 2 % de SDS, 30 % de glycérol et 1 % de DDT. On répète cette étape en utilisant le même tampon, contenant 4 % d'iodoacétamide à la place de 1 % de DTT. Puis, on soumet les bandes à l'électrophorèse en deuxième dimension dans des conditions de dénaturation (SDS-PAGE) en les transférant sur des gels de polyacrylamide à 15 % avec 0,27 % de SDS, recouverts d'un gel de concentration à 5 %. On procède à l'électrophorèse dans un appareil à gels verticaux (Eido, Japon) à 20mA par gel pendant la nuit à 4° C. Après la SDS-PAGE, on visualise les polypeptides en utilisant une méthode modifiée de coloration à l'argent (Shevchenko et coll., 1996).

MALDI-TOF/MS et analyse PMM :

On photographie les protéines provenant de la 2-DE et on leur attribue leur masse moléculaire (MW) apparente et leurs valeurs de point isoélectrique (pI) en utilisant le programme PDQuest (Laboratoires BioRad, Hercules, CA), après la coloration à l'argent décrite ci-dessus. On excise les taches intéressantes du gel SDS-PAGE et on procède à une digestion sur gel en utilisant la méthode décrite précédemment (Zhang et coll., 2007). Brièvement, on décolore le gel excisé, on le rince à l'eau et on l'incube dans 100 % d'acétonitrile pendant 5 min. On procède à la digestion sur gel par l'incubation avec de la trypsine pendant la nuit à 37° C. On extrait les peptides obtenus avec une solution contenant 60 % d'acétonitrile et 1 % d'acide trifluoracétique (TFA). Les aliquotes (1 µl) de la digestion sur gel sont mélangées avec 1 µl de 10 mg / ml d'acide cyano-4-hydroxycinnamique (35 % d'acétonitrile et 0,1 % TFA). On calibre les mesures de manière externe et interne avec un mélange de peptide contenant de l'angiotensine I, de l'angiotensine II, de l'hormone adrénocorticotrope et les fragments de peptide provenant de l'autoprotéolyse de la trypsine. On réalise toutes les analyses en utilisant un poste de travail de Biospectrométrie PerSeptive Biosystem MALDI-TOF Voyager-DE RPO (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA). On fait fonctionner le poste de travail avec une extraction retardée (DE) et en mode linéaire des ions positifs avec les

paramètres suivants : voltage d'accélération 20kV, 95 % de voltage de réseau, 100 ns de temps de retard, et une vitesse de masse faible de 500 m/z. Les pics détectés par spectrométrie de masse sont soumis à la base de données SwissWISS-ProtROT pour des recherches avec le logiciel MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu>).

RESULTATS

Construction d'un système de détection des spots de protéines des testicules du ver à soie :

Pour étudier la structure des protéines synthétisées dans le tissu, on prépare l'ensemble des protéines à partir des testicules du ver à soie et on les soumet à la 2-DE, suivie par une coloration avec du nitrate d'argent. Pour les pI et masses moléculaires compris entre respectivement pI 3 et 10 et 14 et 94 kDa, nous détectons approximativement 400 spots de protéines avec la 2-DE (Fig. 1).

On a aussi établi une carte de référence du gel 2-D à haute résolution. Parmi les protéines du testicule qui s'expriment dans la souche p50, on excise 40 taches de ces polypeptides sur les gels et on les soumet à une digestion sur gel avec de la trypsine, à une analyse spectroscopique de masse et à une analyse PMM.

PMM et représentation fonctionnelle :

Nous avons pris les taches dans la fourchette de pH entre 4 et 8 et pour des masses moléculaires approximativement entre 10 à 60 kDa, qui ne se chevauchent pas. Nous cherchons les masses des peptides de ces taches dans la base de données Swiss-Prot et dans notre propre base de données et elles apparaissent dans le Tableau I. On classe les 40 protéines identifiées non redondantes dans cinq catégories fonctionnelles (Fig. 2.), dont la structure des cellules (10 %), la transcription / la traduction (22,5 %), le métabolisme et le transport (32,5 %), la défense des cellules (7,5 %) et la transduction du signal (5 %) sont les plus représentées. La catégorie la plus importante est celles des protéines impliquées dans le métabolisme et le transport et la deuxième catégorie la plus importante est celle de la transcription et de la traduction. Ces protéines sont nécessaires au développement et à l'homéostasie des testicules du ver à soie chez les larves du 5^{ème} âge et parce que le spermatocyte du ver à soie se divise activement pendant le 5^{ème} âge larvaire où on observe une hypertrophie du testicule du ver à soie. Les protéines non classifiées des testicules représentent environ 22,5 % de l'ensemble des protéines identifiées. Ces protéines n'avaient pas été identifiées auparavant dans le testicule de *B. mori*. Ces protéines s'expriment comme des protéines inconnues et hypothétiques dans le Tableau I. De plus, on identifie une lipoprotéine 30 kDa de faible masse moléculaire chez le ver à soie, mais dont le rôle physiologique demeure incertain. On a donc classé cette protéine dans le groupe des protéines non classifiées.

DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons étudié les protéines synthétisées dans le testicule larvaire par une approche protéomique en utilisant la 2-DE et le MALDI-TOF /MS. L'analyse présentée ici est une étude préliminaire et représente une étape initiale vers une analyse protéomique systémique du testicule du ver à soie *B. mori*, qui appartient aux Lépidoptères, le deuxième ordre le plus important des insectes, qui comprend de nombreuses espèces importantes pour l'agriculture et la sylviculture et qui est un organisme modèle adéquat pour étudier la physiologie et la biochimie de l'insecte. Les avancées de la recherche sur *B. mori* permettront donc, non seulement de faciliter la mise au point de nouvelles stratégies de lutte contre les parasites, mais permettront aussi d'éclaircir la biologie des insectes. Cette recherche représente une étude protéomique systématique des protéines des testicules, qui s'expriment pendant l'étape du 5^{ème} âge chez les larves de *B. mori*, par des approches complémentaires très utilisées, telles que l'analyse protéomique sur gel associée à la TOF-MS. Nous avons identifié les protéines appartenant à cinq catégories fonctionnelles et nous avons trouvé de

nouvelles protéines dans le testicule du ver à soie. Les protéines les plus représentées sont celles impliquées dans la structure de la cellule, la transcription et la traduction, le transport et le métabolisme, la défense des cellules et la transduction du signal. Ces protéines identifiées avec les protéines fonctionnelles connues sont bien corrélées avec l'étape et la physiologie du 5^{ème} âge chez les larves. La structure 2-DE des protéines des tissus des testicules serait utile comme étalon pour des analyses 2-DE comparatives ultérieures. Bien que cette étude rapporte l'existence de plusieurs protéines nouvelles dans le testicule, ces protéines pourront être identifiées après avoir déterminé l'annotation du génome du ver à soie. L'identification ultérieure des protéines du testicule par l'analyse 2-DE et PMM est en cours dans notre laboratoire. L'application de cette approche protéomique à d'autres stades chez le testicule du ver à a soie permettra de mieux comprendre comment ces protéines s'expriment pendant le développement de *B. mori* et apportera des connaissances supplémentaires sur la fécondation artificielle.

THE MOUTHPART SENSILLAE IN THE LARVAE OF TASAR SILKWORM, *ANTHERAEA MYLITTA* D. (LEPIDOPTERA : SATURNIIDAE)

S. M. WAZALWAR & A. M. KHURAD

Centre for Sericulture and Biological Pest Management Research (CSBR), RTM Nagpur University, Ambavihar, Nagpur – 440022, India. E-Mail: amkhurad@yahoo.co.in

*The scanning electron microscopic (SEM) studies revealed that **Antheraea mylitta**, possesses various types of sensillae on the mouthparts. The labrum contains about 8-10 trichoid sensillae on the peripheral margins. A few pointed spines like sensillae are present on lateral side of labrum. Between the membranous folds of the arms of labrum several pointed hair-like sensillae (microtrichia) are present. Long trichoid sensillae on lateral side of mandibles and some campaniform sensillae at the base of the teeth are located. The maxillary palp possesses 8-10 long pointed or bifurcated sensillae and the tip of the palp bears three styloconic, seven basiconic sensillae and one digitiform sensillum. On the lower side of stipes a large group of pointed short microtrichia is located. The labial palps bear two trichoid sensillae. Several long trichoid sensillae are located on the lateral margins of the labium. A large group of microtrichia with pointed and blunt tips and overlapping each other without socket is present on the ventral side of mentum.*

Keywords: Sensilla, Tasar silkworm, Styloconic sensilla, Basiconic sensilla.

INTRODUCTION

Host acceptance in phytophagous insects is solely governed by the feeding habits of the insects. Lepidopterous larvae in particular often display striking food preferences, which are due to presence of a small set of chemoreceptors (Schoonhoven and van Loon, 2002). Such an approach of food preference requires detailed knowledge about the receptors present on the mouthparts of the insects.

Various types of sensillae found on the mouthparts of lepidopteran larvae, differ widely between phytophagous and carnivorous insects (Akai, 1976; Chapman, 1982). In large number of insects, the chemosensillae have been found on the galea, maxillary palp and inner surface of the labrum (Dethier, 1937; Ishikawa, 1965; Schoonhoven and Dethier, 1966; Schoonhoven, 1972; Ma, 1972, 1976; Wieczorek, 1976; De Boer *et al.*, 1977; Albert, 1980; Asaoka and Akai, 1991; Wazalwar and Tembhare, 1999). The sensillae present at the tip of the maxillary palps are shown to be sensitive to olfactory stimuli (Schoonhoven and Dethier, 1966; Roessingh *et al.*, 2007). The gustatory sensillae styloconica present on the galea are important in host acceptance behaviour (Schoonhoven and van Loon, 2002; Roessingh *et al.*, 2007). The other sensillae difficult to study are the sensillae of epipharyngeal organ located on the inner side of labrum, sensillae present on antenna and maxillary palp, therefore they are not well described. Except recordings from maxillary nerve of the silkworm by Hirao *et al.* (1976) and work on gustatory receptors in the maxillary palp of *Choristoneura fumiferana* (Albert, 2003), no substantial electrophysiological data on maxillary palps of Lepidoptera are available on feeding behaviour, which indicates that the taste sensillae present on galea of the palps show significant influence on feeding of the insects (Hanson and Dethier, 1973; Glendinning *et al.*, 1978; De Boer, 2006). Mouthpart sensillae of various orders have been reported earlier, Plecoptera (Kapoor, 1989), Orthoptera (Liu and Leo, 1960; Thomas, 1966), Isoptera (Richards, 1951).

The detail description of the sensillae present on mouthparts of different insects have been described in, *Aeschna interrupta lineata* (Pritchard, 1965), *Libellula depressa* and *L. quadrimaculata* (Petryszak, 1977) and *Coenagrion puella* and *Ischnura elegans* (Bassemir and Hansen, 1980).

Recently, progress has been made in our understanding of speciation in herbivorous insects with mathematical models, which demonstrates that adaptive speciation driven by selection on, ecological and theoretical ground is plausible (Kondrashov and Kondrashov, 1999; Dieckmann and Doebeli, 1999; Roessingh *et al.*, 2007).

Although the sensillae present on the mouthparts in some species of insects have been reported, very little work has been pursued on the mouthpart sensillae of the mulberry and tasar silkworms. This paper describes the morphology, types and distribution of the sensillae on the mouthparts of larvae to generate information on the sensory basis of feeding behavior in the tasar silkworm, *Antheraea mylitta*.

MATERIAL AND METHODS

The rearing of *A. mylitta* was carried out on the host plant, *Terminalia tomentosa* planted at the Centre for Sericulture and Biological Pest Management Research (CSBR), RTM Nagpur University. The late fifth instar larvae were used for dissecting the mouthparts for light and scanning electron microscopic (SEM) studies.

Light microscopy:

The mouthparts were separated gently under the stereoscopic microscope, washed thoroughly in distilled water, boiled in 10% KOH solution for 15 minutes, again washed in distilled water to remove KOH, dehydrated in the alcohol series, cleared in clove oil overnight and observed under stereoscopic binocular microscope.

SEM Studies:

Mouthparts were cleaned, boiled in 10% KOH, washed in distilled water, dehydrated in ethanol, transferred to cold acetone, dried at room temperature and mounted on stub with the help of adhesive. The mounted mouthparts were coated with gold palladium alloy in a Poloron Automatic Unit and observed under JEOL JXA-840 at Jawaharlal Nehru Aluminum Research Development and Design Centre, Nagpur (India).

RESULTS

Light and scanning electron microscopic observations revealed various types of sensillae on the mouthparts of the fifth instar larvae of *A. mylitta*. The type, structure and distribution of sensillae on various mouthparts (Table I) are described here under;

Labral sensillae:

Labrum of the larva is a horseshoe shaped stubby sclerite. The arms are slightly grooved in the middle region, this groove continues in the lower middle portion of the labrum. About 8-10 trichoid sensillae (LbT) admeasuring about $237.5 \pm 15.83 \mu\text{m}$ in length on the peripheral margin. Between the membranous folds of the arms, several small pointed hair-like sensillae (LrM) measuring about $14.08 \pm 0.12 \mu\text{m}$ long are present (Figs. 1, 2). A few small, pointed spine like sensillae (SP) are also observed on the lateral side of pointed hairs of the arms (Fig. 3).

Table I. Heterogenous sensillae on the mouthparts of the larva of *Antheraea mylitta***Tableau I. Sensilles hétérogènes sur les parties buccales des larves d'*Antheraea mylitta*.**

S. No	Type of sensilla	Size (μm)	Location
No. de série	Type de sensille	Taille (μm)	Localisation
1.	Trichoid sensilla / Sensille trichoïde		
	LrT	237.49 ± 15.83	Labrum / Labre
	MdT	422.18 ± 13.26	Mandible / Mandibule
	LbT	8.005 ± 0.259	Labium
	MxT	2.04 ± 0.292	Maxillae / Maxilles
2.	Microtrichia / Microtriche		
	LrM	14.08 ± 0.127	Labrum / Labre
	LbM	0.181 ± 0.007	Labium
	MxM	7.208 ± 0.070	Maxillae / Maxilles
3.	Basiconic sensillae (BS) Sensille basiconique (BS)	6.521 ± 0.221	Maxillae / Maxilles
4.	Styloconic sensillae (SS) Sensille styloconique (SS)	59.15 ± 0.622	Maxillae / Maxilles
5.	Digitiform sensilla (DS) Sensille digitiforme (DS)	9.33 ± 0.33	Maxillae / Maxilles

LrT- Labral trichoid sensilla / Sensille trichoïde labrale.

MdT- Mandibular trichoid sensilla / Sensille trichoïde mandibulaire.

LbT- Labial trichoid Sensilla / Sensille trichoïde labiale.

MxT- Maxillary trichoid sensilla / Sensille trichoïde maxillaire.

LrM- Labral microtrichia / Microtriche labrale.

LbM- Labial microtrichia / Microtriche labiale.

MxM- Maxillary microtrichia / Microtriche maxillaire.

Mandibular sensillae:

The mandibles are unsegmented, strongly sclerotized, triangular in structure. On the lateral side, long trichoid sensillae (MdT) are distributed which measured about $422.18 \pm 13.267 \mu\text{m}$ in length (Fig. 4). Each mandible possesses six blunt molar teeth with cusps at the apical region (Fig.5). Some spherical campaniform sensillae are also present at the base of the teeth (Fig. 6).

Fig. 1. Scanning photomicrograph of labrum of *Antheraea mylitta* showing marginal trichoid (LrT) sensillae.

Fig. 1. Photomicrographie à balayage d'un labre d'*Antheraea mylitta* présentant des sensilles trichoïdes marginales (LrT).

Fig. 2. Scanning photomicrograph of arm of labrum of *Antheraea mylitta* showing microtrichia (LrM).

Fig. 2. Photomicrographie d'un bras d'un labre d'*Antheraea mylitta* présentant des microtriches (LrM).

Fig. 3. Scanning photomicrograph of labrum of *Antheraea mylitta* showing small pointed (SP) sensillae.

Fig. 3. Photomicrographie à balayage d'un labre d'*Antheraea mylitta* présentant de petites sensilles pointues (SP).

Fig. 4. Scanning photomicrograph of lateral side of mandible of *Antheraea mylitta* showing trichoid sensillae (MdT).

Fig. 4. Photomicrographie à balayage d'un côté latéral d'une mandibule d'*Antheraea mylitta* présentant des sensilles trichoïdes (MdT).

Fig. 5. Scanning photomicrograph of mandible of *Antheraea mylitta* showing cusps (arrow) on teeth.

Fig. 5. Photomicrographie à balayage d'une mandibule d'*Antheraea mylitta* présentant des cuspidés (flèche) sur les dents.

Fig. 6. Scanning photomicrograph of mandible of *Antheraea mylitta* with scattered campaniform sensillae (arrow) at the base of teeth.

Fig. 6. Photomicrographie à balayage d'une mandibule d'*Antheraea mylitta* avec des sensilles campaniformes dispersées (flèche) à la base des dents.

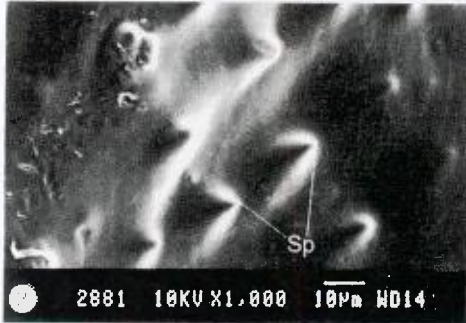
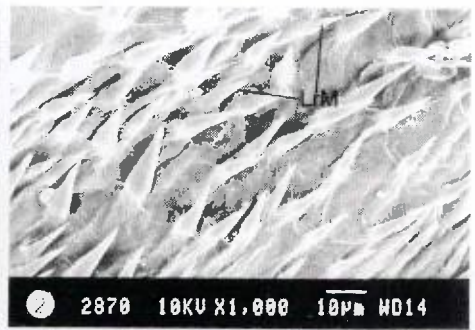
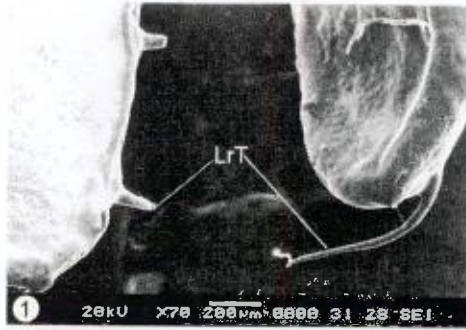


Fig. 7. Scanning photomicrograph of labial palp of *Antheraea mylitta* with long and short (arrow) trichoid sensillae.

Fig. 7. Photomicrographie à balayage de la palpe labiale d'*Antheraea mylitta* avec des sensilles trichoïdes longues et courtes (flèches).

Fig. 8. Scanning photomicrograph of labium of *Antheraea mylitta* showing magnified view of microtrichia, blunt (Bt) and pointed (Pt).

Fig. 8. Photomicrographie à balayage d'un labium d'*Antheraea mylitta* présentant un agrandissement des microtriches épointées (Bt) et pointues (Pt).

Fig. 9. Scanning photomicrograph of lateral side of labium of *Antheraea mylitta* with labial trichoid sensillae (LbT).

Fig. 9. Photomicrographie à balayage d'un côté latéral d'un labium d'*Antheraea mylitta* avec des sensilles trichoïdes labiales (LbT).

Fig. 10. Scanning photomicrograph of maxilla of *Antheraea mylitta* showing trichoid (MxT) and styloconic (SS) sensillae.

Fig. 10. Photomicrographie à balayage d'une maxille d'*Antheraea mylitta* présentant des sensilles trichoides (MxT) et styloconiques (SS).

Fig. 11. Scanning photomicrograph of maxilla of *Antheraea mylitta* showing a single styloconic sensillum (SS), magnified view of basiconic sensillae (BS) and a digitiform (DS) sensillum.

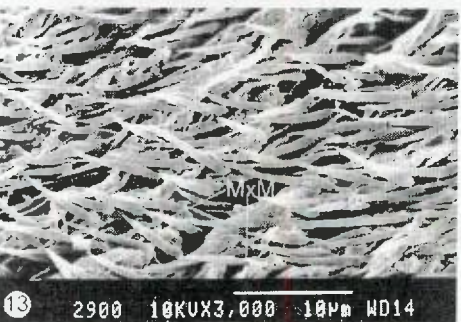
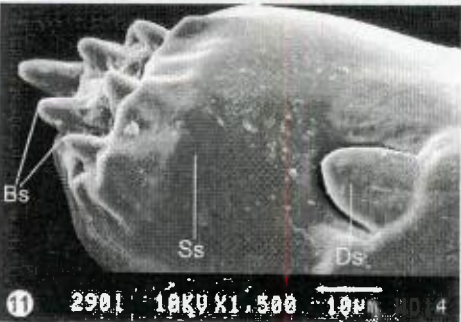
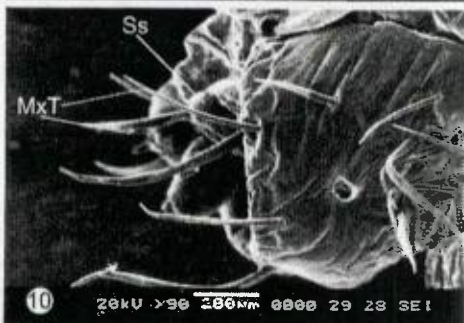
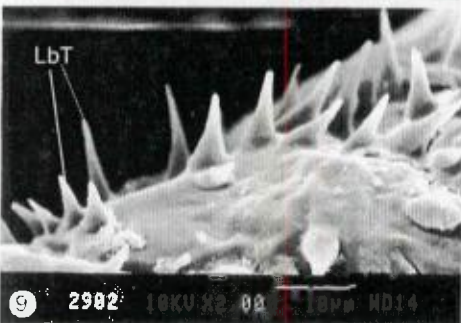
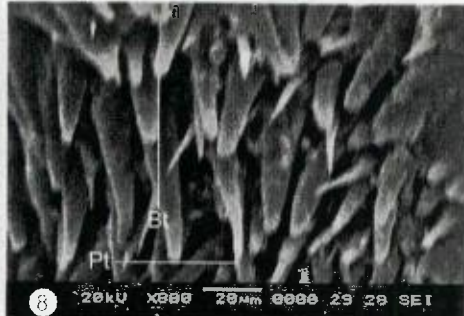
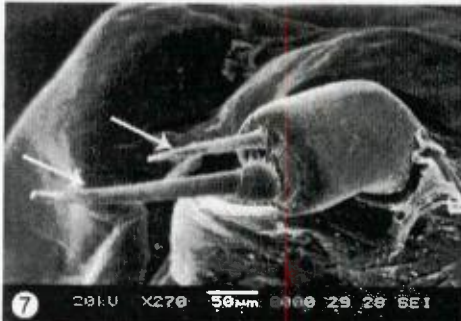
Fig. 11. Photomicrographie à balayage d'une maxille d'*Antheraea mylitta* présentant une sensille styloconique (SS), agrandissement des sensilles basiconiques (BS) et d'une sensille digitiforme (DS).

Fig. 12. The front magnified view of basiconic sensillae (arrow).

Fig. 12. Agrandissement de face des sensilles basiconiques (flèche).

Fig. 13. Scanning photomicrograph of maxilla of *Antheraea mylitta* showing microtrichia (MxM) found in the lower region of stipes.

Fig. 13. Photomicrographie à balayage d'une maxille d'*Antheraea mylitta* présentant des microtriches (MxM) dans la zone inférieure des stipes.



Labial sensillae:

The labium is a squarish structure attached laterally with the maxillae and consists of prementum, mentum and labial palps. The labial palps are stout each bearing two trichoid sensillae. One of the trichoid sensillae is long and measured about $0.12\ \mu\text{m}$ in length and possesses bulbous base, while other one is short without bulbous base and measured about $0.076\ \mu\text{m}$ in length (Fig. 7). A large group of microtrichia is observed on the ventral side of the mentum. The microtrichia (LbM) are without socket and they overlap each other (Fig. 8). They are of two types with pointed and blunt tips, present on the ventral margin measuring about $0.181 \pm 0.007\ \mu\text{m}$ in length. Trichoid sensillae located on the lateral margins (LbT) of the labium are long and measured about $8.005 \pm 0.259\ \mu\text{m}$ in length (Fig. 9).

Maxillary sensillae:

Each maxilla is a fused structure composed of maxillary palp, stipes and cardo. The cardo is short, whereas stipes is large and rectangular in shape. The broad palp possesses 8-10 trichoid sensillae (MxT) (Fig. 10). Three styloconic sensillae (SS) admeasuring $59.15 \pm 0.622\ \mu\text{m}$ are present on each palp with seven prominent basiconic sensillae (BS) at the tip and one digitiform sensillum (DS) in the centre of the body (Fig. 11). The basiconic sensillae are seven, six are found in a circle with one in the center (Fig. 12). The length of basiconic sensillae and digitiform sensillum is about $6.521 \pm 0.221\ \mu\text{m}$ and $9.33 \pm 0.33\ \mu\text{m}$, respectively.

Long trichoid sensillae measuring about $2.04 \pm 0.292\ \mu\text{m}$ are with or without basal cuticular ring found laterally on the stipes. On the lower side, a large group of pointed and short microtrichia (MxM), measuring about $7.208 \pm 0.070\ \mu\text{m}$ long is observed (Fig. 13).

DISCUSSION

The ultrastructural studies on types of sensillae reveal that different types of sensillae are present on the mouthparts of the fifth instar larvae of *A. mylitta*. Styloconic sensillae are present on the maxillae, whereas microtrichia are distributed on the labrum, labium and maxillae. Ishikawa (1965) described that in *Bombyx mori* the lateral peg is innervated by four and the medial peg by five chemosensory neurons, while the mechanosensory neurons are absent. A detailed description of the ultrastructure of these sensillae is available in larva of only one lepidopteran species, *Pieris brassicae* (Ma, 1972). They differ in their fine structure and the chemosensory neurons remain unbranched. Schoonhoven and Dethier (1966) noted that division of the chemosensory dendrites innervating these sensillae might occur in the distal portions of the outer dendritic segments.

It was earlier thought that all the sensillae on the mouthparts are mechanoreceptors, including chemoreceptors in *Aeshna spp.* (Zawarzin, 1912; Pritchard, 1965) and later considered as the campaniform sensillae and pressure receptors (Chapman, 1982).

The sensory receptors present on the mouthparts of lepidopteran larvae are known to respond to olfactory and gustatory stimuli produced by the host plant (Hanson and Dethier, 1973; Staedler, 1976, 1980, 1984; Ave, 1981; Visser, 1983; Wieczorek and Wolff, 1989; Asaoka and Shibuya, 1995). The larvae of *A. mylitta* have seven apical basiconic sensillae on the maxillary palp. Ultrastructural and electrophysiological studies showed that these apical basiconic sensillae have multiple innervations and seem to respond to gustatory, mechanical and olfactory stimuli (Ma, 1972; Wieczorek, 1976; Albert, 1980).

The position and morphology of the digitiform sensillum of *A. mylitta* resemble to those on the maxillary palp of other lepidopteran larvae (Rees and Carlson, 1974; Albert, 1980; Devitt and Smith, 1982). Albert (1980) and Devitt and Smith (1982) described that the digitiform sensillum of *C. fumiferana* (Tatrididae) and *Euxoa messoria* is mostly appeared to be the mechanoreceptor.

The sensillae styloconica present on the maxillae in *A. mylitta* might be gustatory as in other lepidopteran larvae responding to sugars, amino acids, salts and secondary plant substances (Dethier and Kuch, 1971; Wieczorek, 1976; Albert, 1980; Ave, 1981).

The uniporous epipharyngeal sensillae are the characteristic feature of the chemosensory systems in many lepidopteran larvae (Ma, 1972, 1976; De Boer *et al.*, 1977; Albert, 1980; Asaoka and Shibuya, 1995). Such sensillae are not present in *A. mylitta*. A cluster of microtrichia has been described on the inner side of labrum of the gryllid, *Acheta domestica* (Rohr, 1982) and similar type of cluster of microtrichia is also present on the maxillae and labium of *A. mylitta*. Trichoid sensillae are found on all the mouthparts in *A. mylitta*. However they differ structurally in having basal ring. At some places trichoid sensillae also show branching at the tip.

In the wall of the distal segment of maxilla a digitiform sensillum is found in *A. mylitta*, which is normally innervated by a single neuron (Schoonhoven and Dethier, 1966; Albert, 1980; Devitt and Smith, 1982). In case of *E. messoria* and *Helicoverpa armigera* this sensillum appears to possess a laminated outer segment, which is having dendrites, associated with cold receptors (Altner and Loftus, 1985) as well as with CO₂ receptors (Chu- Wang *et al.*, 1975; Mc Iver and Siemicki, 1984; Bogner *et al.*, 1986). In *A. mylitta* this type of digital sensillum present on the distal segment of maxilla may have similar function. The apical basiconic sensillae of *A. mylitta* are similar in their morphology to those observed on *H. virescens* but the number of basiconic sensillae in *A. mylitta* is seven while in *H. virescens* it is eight.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are thankful to Prof. D.B.Tembhare, Ex. Head Department of Zoology RTM Nagpur University, Nagpur for critical reviewing the manuscript. We thank Dr. M. M. Rai and Dr. M. K. Rathod of the Centre for Sericulture and Biological Pest Management Research (CSBR), RTM Nagpur University, Nagpur, India, for their valuable suggestions. The work reported in this paper is supported by DST, New Delhi to S. M. Wazalwar, Project No.SR/WOS-A/LS-154/2004).

REFERENCES

- AKAI H. (1976) Surface structures of Insects. Tokyo University Press.
- ASAOKA K., AKAI H. (1991) Morphology of the larval taste organs of *Antheraea yamamai* and their spike responses to stimulation with certain sugars and alkaloids. *Wild Silkmoths* 89-90, 35-42.
- ASAOKA K., SHIBUYA T. (1995) Morphological and electrophysiological characteristics of the epipharyngeal sensilla of the silkworm, *Bombyx mori*. *Entomologia experimentalis et Applicata* 77, 167-76.
- ALBERT P. J. (1980) Morphology and innervation of mouthpart sensilla in larvae of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (Lepidoptera: Tortricidae). *Can. J. Zool.* 58, 842-851.
- ALBERT P.J. (2003) Electrophysiological responses to sucrose from a gustatory sensillum on the larval maxilla of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Insect Physiol.* 49, 733-738.
- ALTNER H., LOFTUS R., (1985) Ultrastructure and function of insect thermo- and hygroreceptors. *Ann. Rev. Entomol.* 30, 273-295.
- AVE D. A. (1981) Induction of changes in the gustatory response by individual secondary plant compounds on the larvae of *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae). Ph.D. dissertation, Dept. of Entomology, Mississippi State University, U. S. A.
- BASSEMIR U., HANSEN K. (1980) Single pore sensilla of damselfly larvae: representatives of phylogenetically odd contact chemoreceptors? *Cell Tiss. Res.* 207, 307-320.
- BOGNER F., BOPPRE M., ERNST K. D., BOECKH J. (1986) CO₂ sensitive receptors on the labial palps of *Rhodog* spp. (Lepidoptera: Arctiidae). *Physiology, fine structure and central projections.* *J. Comp. Physiol. A* 158: 741-749.

- CHAPMAN R. F. (1982) Chemoreception: The significance of receptor numbers. *Adv. Insect Physiol.* 16, 247- 356.
- CHU-WANG, I-WU, AXTELL R. C., KLINE D. L. (1975) Antennal and palpal sensilla of the sand fly *Culicoides furens*(Poey). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 4, 131-149.
- DE BOER G., DETHIER V. G., SCHOONHOVEN L. M. (1977) Chemoreceptors in the preoral cavity of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* and their possible function in feeding behavior. *Entomol. Exper. Appl.* 21, 287-298.
- DE BOER G. (2006) The role of the antennae and maxillary palps in mediating food preference by larvae of tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Entomol. Exper. Appl.* 119, 29-38.
- DETHIER V. G. (1937) Gustation and olfaction in lepidopterous larvae. *Biol. Bull. (Woods Hole)* 72, 7-23.
- DETHIER V. G., KUCH J. H. (1971) Electrophysiological studies of gustation in lepidopterous larvae. 1. Comparative sensitivity to sugars, amino acids and glycosides. *Z. Vgl. Physiol.* 72, 343-363.
- DEVITT B. D., SMITH J. J. B. (1982) Morphology and fine structure of mouthpart sensilla in the dark-sided cutworm, *Euxoa messoria* (Harris) (Lepidoptera: Noctuidae). *Inter. J. Insect Morphol. Embryol.* 11, 255-270.
- DIECKMANN U., DOEBELI M. (1999) On the origin of species by sympatric speciation. *Nature* 400, 354- 357.
- GLENDINNING J. I., VALCIC S., TIMMERMAN B.N. (1998) Maxillary palps can mediate taste rejection of plant allelochemicals by caterpillars. *J. Comp. Physiol. A* 183, 35-43.
- HANSON F. E., DETHIER V. G. (1973) Role of gustation and olfaction in food plant discrimination in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.* 19, 1019-1034.
- HIRAO T., YAMAOKA K., ARAI N. (1976) Studies in mechanism of feeding in the silkworm, *Bombyx mori* L. II. Control of mandibular biting by olfactory information through maxillary sensilla basiconica. *Bull. Sericult. Exp. Stat.* 26, 385-410.
- ISHIKAWA S. (1965) Maxillary chemoreceptors in the silkworm. In T. Hayashi (ed.) *Proc. Int. Symp. Olfaction and Taste II*. Pergamon Press, Oxford. pp. 761-777.
- KAPOOR N. N. (1989) Distribution and innervation of sensilla on the mouthparts of the carnivorous stonefly nymph, *Paragnetina media* (walkar) (Plecoptera: Perlidae). *Can. J. Zool.* 67 (4), 831-838.
- KONDRASHOV A. S., KONDRASHOV F.A. (1999) Interactions among quantitative traits in the course of sympatric speciation. *Nature.* 400, 351-354.
- LIU Y. S., LEO P. L. (1960) Histological studies on the sense organs and the appendages on the oriental migratory locust, *Locusta migratoria*. *Meyen Acta Entomol Sin.* 10, 243-272.
- MA W. C. (1972) Dynamics of feeding responses in *Pieris brassicae* Linn. as a function of chemosensory input: A behavioural, ultrastructural and electrophysiological study. *Meded Landbouwhogeschool Wageningen.* 72 (11), 1-162.
- MA W. C. (1976) Mouthparts and receptors involved in feeding behaviour and sugar reception in the African armyworm, *Spodoptera exempta* (Lepidoptera: Noctuidae). *Symposium on Biology, Hungry.* 16, 139-151.
- MC IVER S. B., SIEMICKI R. (1984) Fine structure of pegs on the maxillary palps of adult *Toxorhynchites brevipalpis* Theobald (Diptera: Culicidae). *Inter. J. Insect Morphol. Embryol.* 13, 11-20.
- PETRYSZAK A. (1977) The sense organs of the mouthparts in *Libellula depressa* L. and *Libellula quadrimaculata* L. (Odonata). *Acta Biol. Cracov. Zool.* 20, 80-100.
- PRITCHARD G. (1965) Sense organs in the labium of *Aeshna interrupta* Lineata Walker (Odonata: Anisoptera). *Can. J. Zool.* 43, 333-336.
- REES J. C., CARLSON S. D. (1974) Scanning electron microscopy of final-instar larval mouthparts of the black cutworm, *Agrotis ipsilon*. *Ann. Ent. Soc. America.* 67, 301-308.
- RICHARDS A. G. (1951) *The integument of Arthropods.* University of Minnesota Press, Minneapolis.

- ROESSINGH P., XU S., MENKEN B. J. (2007) Olfactory receptors on the maxillary palps of small ermine larvae: evolutionary history of benzaldehyde sensitivity. *J. Com. Physiol. A* 193(6), 635-647.
- ROHR W. (1982) Bau und Verteilung der Sensillum auf der innenseite des Clypeolabrum von *Acheta domesticus* L. (Insecta: Ensifera) wahrend der postembryonalen Entwicklung. *Braunschwiger Naturkd Schr.* 1, 513-531.
- SCHOONHOVEN L. M. (1972) Plant recognition by lepidopterous larvae, In H. F. van EMDEN (ed.) *Insect/ Plant Relationships. Symp. R. Entomol. Soc. Lond.*, No. 6., London. pp. 87-99.
- SCHOONHOVEN L. M., DETHIER V. G. (1966) Sensory aspects of host-plant discrimination by lepidopterous larvae. *Arch. Neerl. Zoology* 16, 497-530.
- SCHOONHOVEN L. M., VAN LOON J. J. A. (2002) An inventory of taste in caterpillars: each species its own key. *Acta. Zool. Acad Sci. Hung.* 48 (Suppl 1), 215-263.
- STAEDLER E. (1976) Sensory aspects of insect plant interaction. *Proc. 15th Inter. Cong. Entomol.* pp. 228-248.
- STAEDLER E. (1980) Chemoreception in arthropods: sensory physiology and ecological chemistry. In: Gilles, R. (Ed.) *Animals and Environmental Fitness*. Pergamon Press, Oxford pp. 223-224.
- STAEDLER E. (1984) Contact chemoreception. In: Bell, W. J. and Carde, R. T. (Eds.) *Chemical Ecology of Insects*. Sinauer Associates Inc., Sunderland Mass. U.S.A. pp. 3-35.
- THOMAS J. C. (1966) The sense organs on the mouthparts of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *J. Zoology Lond.* 148, 420-448.
- VISSER J. H. (1983) Differential sensory perception of plant compounds by insects. In: Hedin, P. A. (Ed.) *Plant Resistance to Insects*. ACS Symposium Series No. 208 American Chemical Society, Washington D C. pp. 215-230.
- WAZALWAR S. M., TEMBHARE D. B. (1999) Mouthpart sensilla in the dragonfly, *Brachythemis contaminata* (F.) (Anisoptera : Libellulidae). *Odonatologica* 28(3), 257-271.
- WIECZOREK H. (1976) The glycoside receptor of the larvae of *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Comp. Physiol.* 106: 153-76.
- WIECZOREK H., WOLFF G. (1989) The labellar sugar receptor of *Drosophila*. *J. Comp. Physiol.* A. 164, 825-827.
- ZAWARZIN A. (1912) Histologische studien iiber Insekten. II Das sensibele Nervensystem der Aeschnalarven. *Z. Wiss Zoology Abstract A.* 100, 245-286.

SENSILLES DE L'APPAREIL BUCCAL CHEZ LES LARVES DU VER A SOIE TASAR, *ANTHERAEA MYLITTA* D. (LEPIDOPTERES : SATURNIIDAE)

S. M. WAZALWAR & A. M. KHURAD

Centre for Sericultural and Biological Pest Management Research (CSBR), RTM Nagpur,
University, Ambavihar, Nagpur – 440022, Inde. Email: amkhurad@yahoo.co.in

*Les études de microscopie électronique à balayage (SEM) révèlent qu'*Antheraea mylitta* possède différents types de sensilles sur l'appareil buccal. Le labre contient environ 8 à 10 sensilles trichoides sur les bords périphériques. Quelques sensilles pointues comme des épines sont présentes sur le côté latéral du labre. Entre les plis membranaires des bras du labre, quelques sensilles comme des poils (microtriches) sont présentes. De longues sensilles trichoides sont situées sur le côté latéral des mandibules et des sensilles campaniformes sont situées à la base des dentelures. Le palpe maxillaire possède 8 à 10 longues sensilles pointues ou à deux branches et l'extrémité du palpe comporte trois sensilles styloconiques, sept sensilles basiconiques et une sensille digitiforme. Sur le côté inférieur des stipes, se situe un grand groupe de petites microtriches pointues. Le palpe labial comporte deux sensilles trichoides. Plusieurs longues sensilles trichoides sont situées sur les bords latéraux du labium. Un grand groupe de microtriches avec des extrémités pointues et époutées qui se chevauchent, sans cavité, est présent sur le côté ventral du mentum.*

INTRODUCTION

L'acceptation de l'hôte chez les insectes phytophages est uniquement gouvernée par les habitudes alimentaires des insectes. Les larves de lépidoptères, en particulier, font preuve de préférences alimentaires frappantes, qui sont dues à la présence d'un petit assortiment de chimiorécepteurs (Schoonhoven et van Loon, 2002). Une telle approche des préférences alimentaires nécessite des connaissances détaillées sur les récepteurs présents sur les pièces buccales des insectes.

Les différents types de sensilles que l'on trouve sur les pièces buccales des larves de lépidoptères diffèrent beaucoup entre les insectes phytophages et carnivores (Akai, 1976 ; Chapman, 1982). Chez un grand nombre d'insectes, on a trouvé des chimiosensilles sur la galea, sur le palpe maxillaire et sur la surface interne du labre (Dethier, 1937 ; Ishikawa, 1965 ; Schoonhoven et Dethier, 1966 ; Schoonhoven, 1972 ; Ma, 1972, 1976 ; Wieczorek, 1976 ; De Boer et coll., 1977 ; Albert, 1980 ; Asaoka et Akai, 1991 ; Wazalwar et Tembhare, 1999). On a montré que les sensilles présentes à l'extrémité des palpes maxillaires sont sensibles aux stimuli olfactifs (Schoonhoven et Dethier, 1966 ; Roessingh et coll., 2007). Les sensilles styloconiques gustatives présentes sur la galea sont importantes pour le comportement d'acceptation de l'hôte (Schoonhoven et Van Loon, 2002 ; Roessingh et coll., 2007). Les autres sensilles difficiles à étudier sont les sensilles de l'organe épipharyngien situé sur le côté intérieur du labre et les sensilles situées sur les antennes et sur le palpe maxillaire, elles ne sont donc pas bien décrites. A l'exception des rapports sur le nerf maxillaire du ver à soie publiés par Hirao et coll., (1976) et du travail sur les récepteurs gustatifs dans le palpe maxillaire de *Choristoneura fumiferana*, on ne dispose pas de données électro-physiologiques importantes sur le rôle des palpes maxillaires des Lépidoptères sur le comportement alimentaire, ce qui indique que les sensilles du goût présentes sur la galea des palpes influencent considérablement l'alimentation des insectes (Hanson et Dethier, 1973 ; Glendinning et coll., 1978 ; De Boer, 2006). Des rapports ont déjà été publiés sur les sensilles de l'appareil buccal de différents ordres, les

Plécoptères (Kapoor, 1989), les Orthoptères (Liu et Leo, 1960 ; Thomas, 1966), les Isoptères (Richards, 1951). On a décrit de manière détaillée les sensilles présentes sur les parties buccales de différents insectes chez *Aeschna interrupta lineata* (Pritchard, 1965), *Libellula depressa* et *L. quadrimaculata* (Petryszak, 1977) et *Coenagrion puella* et *Ischnura elegans* (Bassemir et Hansen, 1980).

Récemment, des progrès ont été faits dans la compréhension de la formation des espèces chez les insectes herbivores avec des modèles mathématiques, qui montrent qu'une formation adaptative des espèces, mue par la sélection pour des raisons écologiques et théoriques est plausible (Kondrashov et Kondrashov, 1999 ; Dieckmann et Doebeli, 1999 ; Roessingh et coll., 2007).

Bien que des rapports aient été publiés sur les sensilles présentes sur les pièces buccales chez certaines espèces d'insectes, très peu d'études ont été entreprises sur les sensilles de l'appareil buccal chez les vers à soie mûrier et tasar. Cet article décrit la morphologie, les types et la distribution des sensilles sur les parties buccales des larves pour obtenir des informations sur la base sensorielle du comportement alimentaire chez le ver à soie tasar, *Antheraea mylitta*.

MATERIELS ET METHODES

On a procédé à l'élevage d'*A. mylitta* sur la plante hôte, *Terminalia tomentosa* plantée au Centre for Sericulture and Biological Pest Management Research (CSBR), de l'Université RTM de Nagpur. On utilise des larves du 5^{ème} âge pour disséquer l'appareil buccal pour les études de microscopie électronique à balayage (SEM) et optique.

Microscopie optique :

On sépare doucement les pièces buccales sous un microscope stéréoscopique, on les lave soigneusement dans de l'eau distillée, on les fait bouillir dans une solution de KOH à 10 % pendant 15 minutes, on les lave à nouveau dans de l'eau distillée pour enlever la potasse et on les déshydrate dans des séries d'alcool, on les nettoie dans de l'essence de girofle pendant la nuit, puis on les observe sous un microscope binoculaire stéréoscopique.

Etudes SEM :

On nettoie les pièces buccales, on les fait bouillir dans du KOH à 10 %, on les lave dans de l'eau distillée, on les déshydrate dans de l'éthanol, on les transfère dans de l'acétone froid, on les sèche à température ambiante et on les monte sur une tige l'aide d'un adhésif. On recouvre les pièces buccales montées avec un alliage palladium - or dans une Unité Automatique Poloron et on les observe sous un microscope JEOL JXA-840 au Centre Jawaharlal Nehru de Conception et de Recherche et Développement sur l'Aluminium à Nagpur en Inde.

RESULTATS

Les observations au microscope optique et électronique à balayage révèlent différents types de sensilles sur les pièces buccales des larves d'*A. mylitta* du 5^{ème} âge. Le type, la structure et la distribution des sensilles sur différentes pièces buccales (Tableau I) sont décrits ci-dessous.

Sensilles labrales :

Le labre de la larve est un sclérite épais en forme de fer à cheval. Les bras sont légèrement cannelés dans la zone médiane, cette cannelure continue dans la partie médiane inférieure du labre. Environ 8 à 10 sensilles trichoides (LbT) mesurant environ $237,5 \pm 15,83 \mu\text{m}$ de longueur sur le bord périphérique. Entre les plis membranaires des bras, plusieurs petites sensilles pointues comme des poils (LrM) mesurant environ $14,08 \pm 0,12 \mu\text{m}$ de long sont présentes (Figs. 1 et 2). On observe quelques petites sensilles pointues en épines (SP) sur le côté latéral des poils des bras (Fig. 3).

Sensilles mandibulaires :

Les mandibules ne sont pas segmentées, sont fortement sclérotisées et de structure triangulaire. Sur le côté latéral, sont distribuées de longues sensilles trichoides (MdT), qui mesurent environ $422,18 \pm 13,267 \mu\text{m}$ de longueur (Fig. 4). Chaque mandibule possède six dents molaires époutées avec des cuspides dans la zone apicale (Fig. 5). Certaines sensilles campaniformes sphériques sont aussi présentes à la base des dents (Fig. 6).

Sensilles labiales :

Le labium est une structure carrée attachée latéralement aux mâchoires et est constitué du prementum, du mentum et des palpes labiaux. Les palpes labiaux sont robustes et portent chacun deux sensilles trichoides. Une des sensilles trichoides est longue et mesure environ $0,12 \mu\text{m}$ de longueur et possède une base bulbeuse, tandis que l'autre est courte sans base bulbeuse et mesure environ $0,076 \mu\text{m}$ de longueur (Fig. 7). On observe un grand groupe de microtriches sur le côté ventral du mentum. Les microtriches (LbM) sont sans cavité et elles se chevauchent (Fig. 8). Il y en a deux types, avec des extrémités pointues et époutées, présentes sur le bord ventral, mesurant environ $0,181 \pm 0,007 \mu\text{m}$ de longueur. Les sensilles trichoides situées sur les bords latéraux (LbT) du labium sont longues et mesurent environ $8,005 \pm 0,259 \mu\text{m}$ de longueur (Fig. 9).

Sensilles maxillaires :

Chaque maxille est une structure fusionnelle composée d'un palpe maxillaire, de stipes et d'un cardo. Le cardo est court, tandis que le stipe est grand et de forme rectangulaire. Le palpe large possède 8 à 10 sensilles trichoides (MxT) (Fig. 10). Trois sensilles styloconiques (SS) mesurant $59,15 \pm 0,622 \mu\text{m}$ sont présentes sur chaque palpe avec sept sensilles basiconiques proéminentes (BS) à l'extrémité et une sensille digitiforme (DS) au centre du corps (Fig. 11). Il y a sept sensilles basiconiques, six en cercle et une au centre (Fig. 12). La longueur des sensilles basiconiques et de la sensille digitiforme est d'environ respectivement $6,521 \pm 0,221 \mu\text{m}$ et $9,33 \pm 0,33 \mu\text{m}$.

Les longues sensilles trichoides mesurant environ $2,04 \pm 0,292 \mu\text{m}$ se présentent avec ou sans anneau cuticulaire que l'on observe latéralement sur les stipes. Sur le côté inférieur, on observe un grand groupe de microtriches pointues et courtes (MxM), qui mesurent environ $7,208 \pm 0,070 \mu\text{m}$ de long (Fig. 13).

DISCUSSION

Les études ultrastructurales sur les types de sensilles révèlent que différents types de sensilles sont présents sur les pièces buccales des larves *A. mylitta* du 5^{ème} âge. Les sensilles styloconiques sont présentes sur les maxilles, tandis que les microtriches sont distribuées sur le labre, le labium et les maxilles. Ishikawa (1965) a rapporté que chez *Bombyx mori* l'ergot latéral est innervé par quatre neurones chimiorécepteurs et l'ergot médian par cinq neurones chimiorécepteurs, tandis que les neurones mécano-sensoriels sont absents. Une description détaillée de l'ultrastructure de ces sensilles n'est disponible que chez la larve d'une seule espèce de lépidoptères, *Pieris brassicae* (Ma, 1972). Elles diffèrent dans leur structure même et les neurones mécano-sensoriels demeurent non ramifiés. Schoonhoven et Dethier (1966) ont noté que la division des dendrites chimiorécepteurs innervant ces sensilles pourrait se produire dans les parties distales des segments dendritiques extérieurs.

Auparavant, on pensait que toutes les sensilles sur les pièces buccales étaient des mécanorécepteurs, y compris des chimiorécepteurs chez *Aeshna* spp. (Zawarzin, 1912 ; Pritchard, 1965), mais plus tard on les a considérées comme des sensilles campaniformes et des récepteurs de pression (Chapman, 1982).

On sait que les récepteurs sensoriels présents sur les pièces buccales des larves de lépidoptères répondent à des stimuli olfactifs et gustatifs produits par la plante hôte (Hanson et Dethier, 1973 ; Staedler, 1976, 1980, 1984 ; Ave, 1981 ; Visser, 1983 ; Wieczorek et Wolff, 1989 ; Asaoka et

Shibuya, 1995). Les larves *A. mylitta* ont sept sensilles basiconiques apicales sur le palpe maxillaire. Les études ultrastructurales et électro-physiologiques montrent que ces sensilles basiconiques apicales ont des innervations multiples et semblent répondre à des stimuli gustatifs, mécaniques et olfactifs (Ma, 1972 ; Wieczorek, 1976 ; Albert, 1980).

La position et la morphologie de la sensille digitiforme d'*A. mylitta* ressemblent à celles du palpe maxillaire d'autres larves lépidoptères (Rees et Carlson, 1974 ; Albert, 1980 ; Devitt et Smith, 1982). Albert (1980) et Devitt et Smith (1982) ont rapporté que la sensille digitiforme de *C. fumiferana* (Tatricidae) et d'*Euxoa messoria* semble être principalement un mécanorécepteur.

Les sensilles styloconiques présentes sur les maxilles chez *A. mylitta* pourraient être gustatives comme chez d'autres larves de lépidoptères et répondent aux sucres, aux acides aminés, aux sels et aux substances secondaires des plantes (Dethier et Kuch, 1971 ; Wieczorek, 1976 ; Albert, 1980 ; Ave, 1981).

Les sensilles épipharyngiennes à pore unique sont le trait caractéristique des systèmes chimiosensoriels chez de nombreuses larves lépidoptères (Ma, 1972, 1976 ; De Boer et coll., 1977 ; Albert, 1980 ; Asaoka et Shibuya, 1995). De telles sensilles ne sont pas présentes chez *A. mylitta*. Un groupe de microtriches a été décrit sur le côté intérieur du labre du gryllidé *Acheta domestica* (Rohr, 1982) et un type similaire de groupe de microtriches est aussi présent sur les maxilles et le labium d'*A. mylitta*. On trouve des sensilles trichoides sur toutes les pièces buccales chez *A. mylitta*. Cependant elles diffèrent sur le plan structural, car elles ont un anneau basal. A certains endroits, les sensilles trichoides présentent aussi une ramification à l'extrémité.

Dans la paroi du segment distal de la mâchoire, on trouve une sensille digitiforme chez *A. mylitta*, qui est normalement innervée par un neurone unique (Schoonhoven et Dethier, 1966 ; Albert, 1980 ; Devitt et Smith, 1982). Dans le cas d'*E. messoria* et d'*Helicoverpa armigera*, cette sensille semble posséder un segment extérieur lamellaire, qui a des dendrites, associés avec des récepteurs du froid (Altern et Loftus, 1982) ainsi que des récepteurs du CO₂ (Chu - Wang et coll., 1975 ; Mc Iver et Siemicki, 1984 ; Bogner et coll., 1986). Chez *A. mylitta*, ce type de sensille digitale présente sur le segment distal de la maxille pourrait avoir une fonction similaire. Les sensilles basiconiques apicales d'*A. mylitta* sont similaires dans leur morphologie à celles observées sur *H. virescens*, mais le nombre de sensilles basiconiques chez *A. mylitta* est de sept, tandis qu'il est de huit chez *H. virescens*.

FLUCTUATION IN THE CONCENTRATION OF 1-DEOXYNOJIRIMYCIN IN MULBERRY LEAVES WITH THE TIMING OF PRUNING OF THE BRANCHES

RITSUKO MURAKAMI, AKIO KOYAMA & HIROE YASUI

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

Previous studies showed that young mulberry leaves taken from the top of branches in August contain the highest concentration of 1-deoxynojirimycin (DNJ) among different parts of branches and harvest months. In this study, mulberry branches were pruned in March and June, and DNJ in mulberry leaves was detected and quantified across various tree parts and harvest months. When branches were pruned in March, the concentration of DNJ in leaves harvested from the top of branches in August was the highest among the harvested parts and harvest months. When branches were pruned in June, however, the concentration of DNJ in leaves harvested in August was the lowest among the tested periods and the foliar DNJ concentration from the top branches tended to be lower than that from middle branches. Our findings indicate that the timing of branch pruning affects when and which mulberry leaves contain high concentrations of DNJ.

Keywords: 1-deoxynojirimycin, mulberry.

INTRODUCTION

1-deoxynojirimycin (DNJ) is a characteristic constituent of mulberry leaves, bark, roots, and branches (Yagi *et al.*, 1976). This compound has been shown to inhibit HIV replication (Fleet *et al.*, 1988; Karpas *et al.*, 1988), and it suppresses the increase in postprandial blood glucose levels (Kimura *et al.*, 2007). Because it is feasible to use mulberry DNJ therapeutically for the oral treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus, various food products containing mulberry leaves have been made commercially available (Lee *et al.*, 1998). Therefore, methods have been established to identify (Kim *et al.*, 2003; Kimura *et al.*, 2004) and quantify DNJ. Kimura *et al.* (2007) investigated which conditions lead to high concentrations of DNJ in mulberry leaves and reported that young mulberry leaves taken from the top of the branches in summer contained the greatest amount of DNJ.

In Japan, the branches of mulberry are pruned in March or June to feed the leaves to silkworms in summer or early autumn, respectively. In the present study, mulberry branches were pruned in March and June, and the fluctuation in concentrations of DNJ in mulberry leaves was examined. Our findings indicate that the timing of branch pruning affects when and which parts contain the highest concentration of DNJ.

MATERIALS AND METHODS

Mulberry leaves:

The leaves from three mulberry cultivars (*Morus alba* L. 'Ichinose', 'Kenmochi', and 'Ôshimasô') were harvested from a field of the National Institute of Agrobiological Sciences at Tsukuba, Japan. Three trees were selected for each cultivar, and one branch was selected per tree. The largest glossy leaf and the two leaves located below that leaf (top leaves) and three leaves located within the top half of the branch (middle leaves) were harvested from each branch. The leaf samples

were separated by cultivar, top versus middle position, and month of harvest and used separately for DNJ analysis.

In 2004, branches were pruned in March and the top and middle leaves were harvested from growing branches on 22 June, 28 July, 30 August, and 22 September (Fig. 1). In 2005, the top and middle leaves were harvested on 30 May and the branches were pruned in June. Leaves were not harvested in June because the branches had not grown sufficiently leaves to harvest. The top leaves were harvested on 1 August, and the top and middle leaves were harvested on 30 August and 30 September (Fig. 2).

Weather conditions:

Average temperature, average daily solar radiation, and monthly precipitation in Tsukuba in 2004 to 2005 were recorded by an automated meteorological data acquisition system (AMEDAS) by Japan Meteorological Agency.

Chemicals:

DNJ was purchased from Wako (Osaka, Japan) and used as a reference standard in determination and quantitative experiments.

Detection of DNJ:

Extraction of DNJ was performed by a modified version of the method of Kim *et al.* (2003), as follows. The harvested leaves were frozen at -80°C and lyophilized. The leaves from the same sample were mixed and ground to powder before analysis. Ten milligrams of the powder was added to 500 μl of 0.05 M HCl and vortexed for 15 min, then centrifuged at 15000 rpm for 15 min. Ten microliters of the supernatant was added to 10 μl of 0.4 M potassium borate buffer (pH 8.5), then 20 μl of 5 mM 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl) in methanol was mixed with the solution and allowed to react at 20°C for 20 min. Ten microliters of 0.1 M glycine was added to stop the reaction, and the solution was diluted with 450 μl of 0.1% (v/v) acetic acid to stabilize the FMOC-derivatized DNJ (DNJ-FMOC). The solution was filtered through a 0.45 μm syringe-driven filter unit (Millex-LH, Millipore, Yokohama, Japan).

The high-performance liquid chromatography (HPLC) system (Toso, Tokyo, Japan) consisted of an FC-8020 online degasser, DP-8020 dual pump, AS-8020 autosampler, PD-8020 multifuorescence detector (excitation 254 nm, emission 322 nm), and PX-8020 data processor. A Prodigy 5u ODS(3) guard column (Shimadzu, Kyoto, Japan) and a Prodigy 5u ODS (3) 100A column (Shimadzu) were used for the analysis of DNJ (Fig. 3). Ten microliters of analyte was eluted with a mobile phase of methanol and 0.1% acetic acid (1:1, v/v) at 1 ml min^{-1} for 10 min. After each analysis, the column was washed with methanol for 15 min and then equilibrated with the analyzing mobile phase for 30 min. The column temperature was 40°C .

Calculation of DNJ concentrations:

DNJ-FMOC was derivatized from 0.03, 0.3, 3, 30, 300, and 3000 ppm of DNJ, and the DNJ-FMOC peak height was examined under the conditions noted in the previous section. The calibration curve for DNJ-FMOC was based on these data, and the concentration of DNJ in leaves was calculated using the curve and the detected peak height (mV) from the leaves (Fig. 4). At least three replications were performed for each analysis.

Statistical analysis:

Correlation and regression from calibration curve data were analyzed using the StatView 4.0 software (SAS Institute Inc., North Carolina, USA), and fluctuations in the concentration of DNJ were examined by means of analysis of covariance (ANOVA) and Scheffé's test using the StatView 4.0 software.

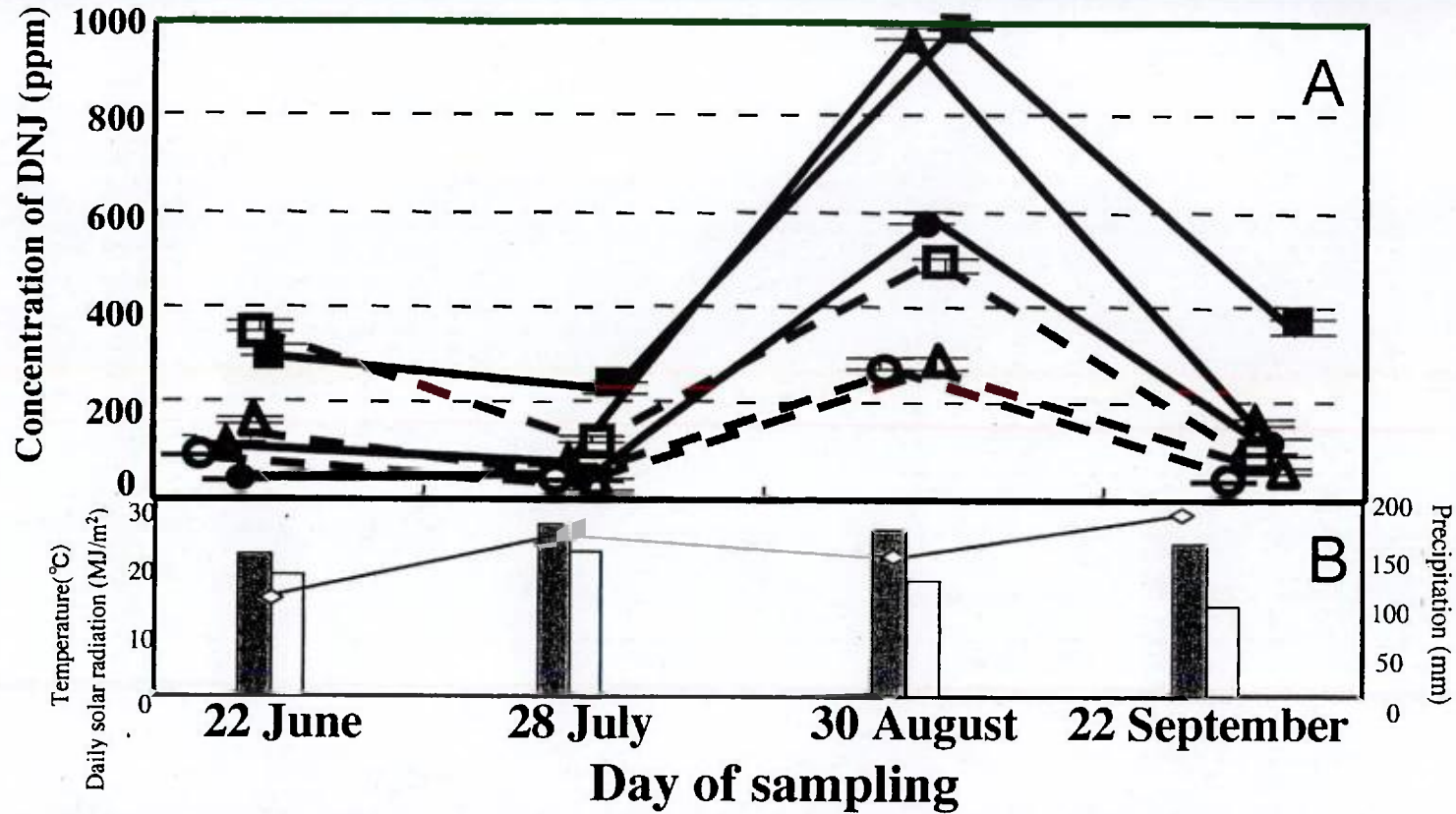


Fig. 1. (A) Fluctuation in concentration (average ppm $\pm$ standard error, five replications) of 1-deoxynojirimycin (DNJ) in mulberry leaves harvested from branches pruned in March :

black square: 'Ichinose' top leaves; **open square:** 'Ichinose' middle leaves; **black triangle:** 'Ôshimasô' top leaves; **open triangle:** 'Ôshimasô' middle leaves; **black circle:** 'Kenmochi' top leaves; **open circle:** 'Kenmochi' middle leaves. **(B) Average temperature (gray bars), average daily solar radiation (open bars), and monthly precipitation (open diamonds) at the site from June to September in 2004.**

Fig. 1. (A) Fluctuation de la concentration (moyenne ppm $\pm$ écart type, cinq répétitions) de 1-déoxynojirimycine (DNJ) dans les feuilles de mûrier récoltées sur des branches taillées en mars :

carré noir : feuilles supérieures d'Ichinose, **carré blanc :** feuilles du milieu d'Ichinose ; **triangle noir :** feuilles supérieures d'Oshimasô ; **triangle blanc :** feuilles du milieu d'Oshimasô ; **cercle noir :** feuilles supérieures de Kenmochi ; **cercle blanc :** feuilles du milieu de "Kenmochi" **(B) Température moyenne (colonnes grises), rayonnement solaire quotidien moyen (colonnes blanches) et précipitations mensuelles (diamants blancs) sur le lieu de juin à septembre en 2004.**

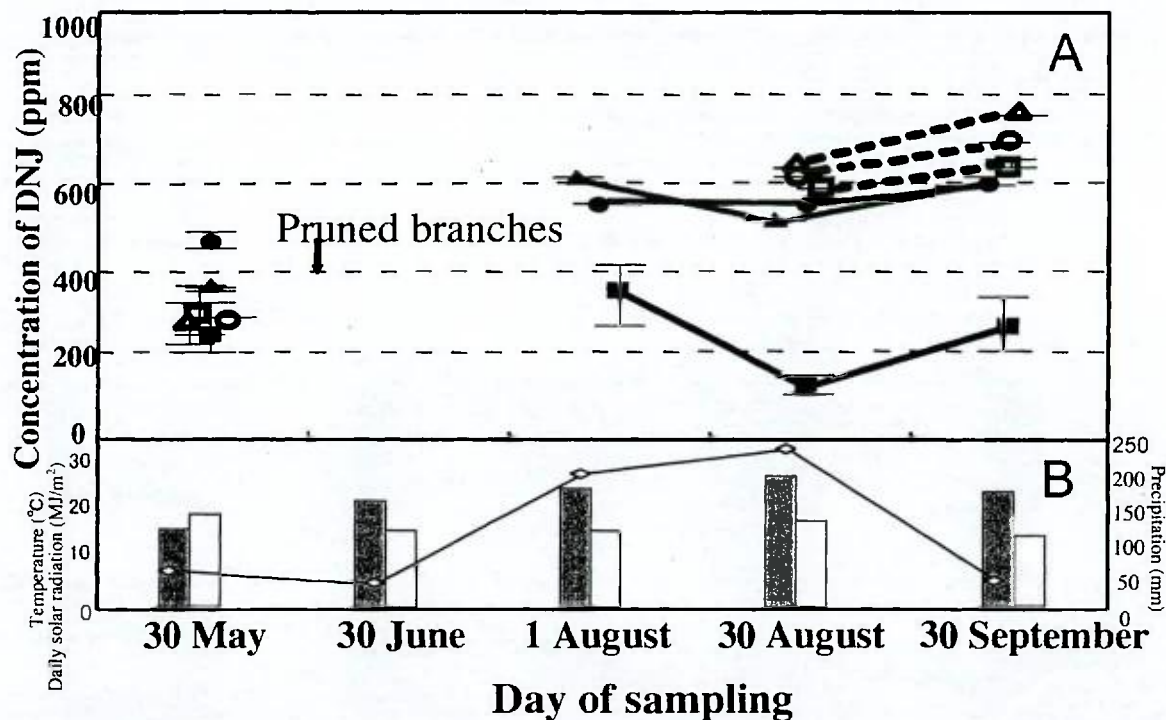


Fig. 2. (A) Fluctuation in concentration (average ppm $\pm$ standard error, four replications) of 1-deoxynojirimycin (DNJ) in mulberry leaves harvested from branches pruned in June;

black square: 'Ichinose' top leaves; **open square:** 'Ichinose' middle leaves; **black triangle:** 'Ôshimasô' top leaves; **open triangle:** 'Ôshimasô' middle leaves; **black circle:** 'Kenmochi' top leaves; **open circle:** 'Kenmochi' middle leaves. **(B)** Average temperature (gray bars), average daily solar radiation (open bars), and monthly precipitation (open diamonds) at the site from May to September in 2005.

Fig. 2. (A) Fluctuation de la concentration (ppm moyen $\pm$ écart type, quatre répétitions) de 1-déoxynojirimycine (DNJ) dans les feuilles de mûrier récoltées sur des branches taillées en juin ;

carré noir : feuilles supérieures d'Ichinose ; **carré blanc :** feuilles du milieu d'Ichinose ; **triangle noir :** feuilles supérieures d'Oshimasô ; **triangle ouvert :** feuilles du milieu d'Oshimasô ; **cercle noir :** feuilles supérieures de « Kenmochi » ; **cercle blanc :** feuilles du milieu de « Kenmochi ». **(B)** Température moyenne (colonnes grises), rayonnement solaire quotidien moyen (colonnes blanches), et précipitations mensuelles (diamants blancs) sur le lieu de mai à septembre en 2005.

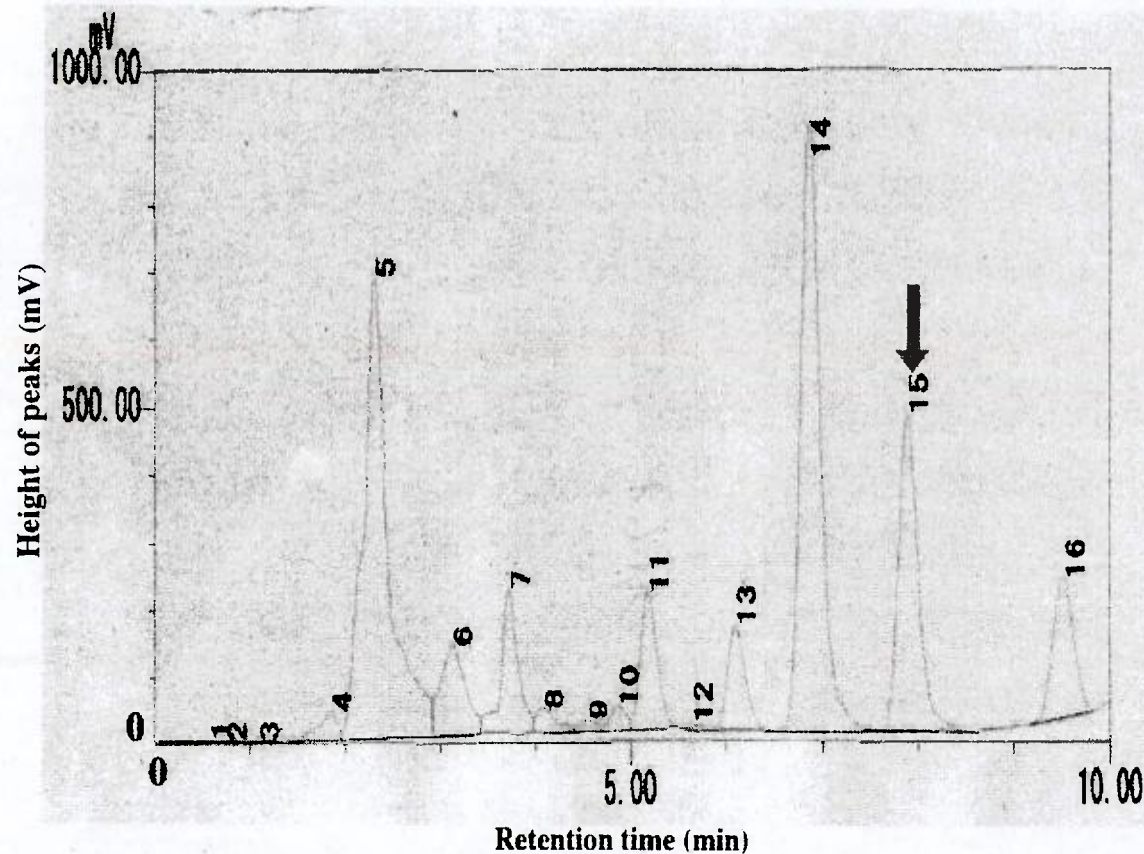


Fig. 3. High-performance liquid chromatography of peaks of substances in extract from mulberry leaves ('Ichinose' in August 2004). The arrow shows 1-deoxynojirimycin derivatized with 9-fluorenylmethyl chloroformate.

Fig. 3. Chromatographie liquide sous haute pression des pics des substances par extrait de feuilles de mûrier (Ichinose en août 2004). La flèche montre le 1-deoxynojirimycine dérivé avec le 9-fluorenylméthyl chloroformiate.

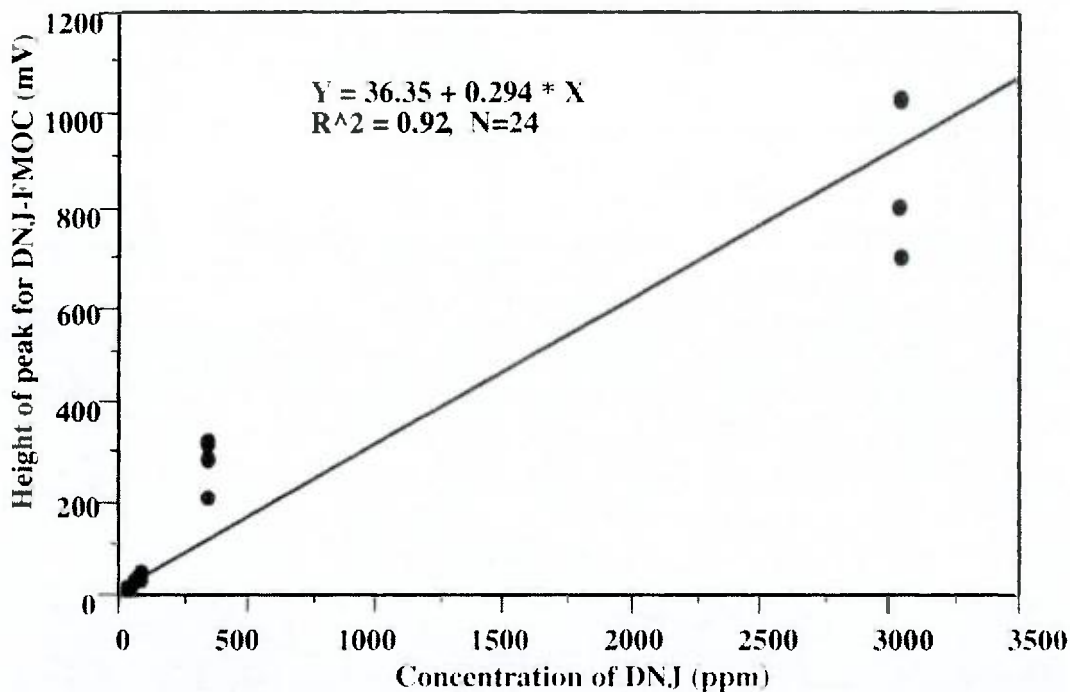


Fig. 4. Calibration curve for 1-deoxynojirimycin (DNJ) derivatized with 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC). Concentrations of 0.03, 0.3, 3, 30, 300, and 3000 ppm of DNJ were derivatized with FMOC. The height of the DNJ-FMOC peak was detected using a multifluorescence detector with high-performance liquid chromatography.

Fig. 4. Courbe d'étalonnage pour 1-déoxynojirimycine (DNJ) dérivé avec le 9-fluorénylméthyl chloroformiate (FMOC). Les concentrations de 0,03 ; 0,3 ; 3 ; 30 ; 300 et 3000 ppm de DNJ sont dérivées avec le FMOC. On détecte la hauteur du pic DNJ-FMOC en utilisant un détecteur de multifluorescence après une chromatographie liquide sous haute pression.

RESULTS

Calibration curve for DNJ-FMOC:

DNJ-FMOC was eluted at 7 to 8 min after injection of the sample (Fig. 3). When 0.03 ppm of DNJ was derivatized by FMOC and 10 μ l of the DNJ-FMOC was subjected to HPLC, no peaks were detected. However, when more than 0.03 ppm of DNJ-FMOC was subjected to HPLC, peaks of the DNJ-FMOC were detected and the height of each peak was proportional to the concentration of DNJ ($R^2 = 0.92$, $n = 24$, Fig. 4). These results suggest that quantitative analysis of DNJ is possible.

Fluctuation in foliar DNJ concentration in branches pruned in March:

In each cultivar, the concentration of DNJ was affected by the position and month of harvesting of the leaves ($p = 0.005$, ANOVA). For both the top and middle leaves from all tested cultivars, the concentrations of DNJ in August were the highest among the tested periods (Fig. 1). According to the Scheffé tests, the DNJ concentration was greater in top leaves than that in middle leaves ($p = 0.001$) and the DNJ concentration of 'Ichinose' was higher than that of 'Kenmochi' ($p = 0.004$).

Fluctuation in foliar DNJ concentration in branches pruned in June:

The concentration of DNJ was affected by the position and month of harvesting of the leaves ($p = 0.04$, ANOVA). The DNJ concentration in leaves harvested in August tended to be the lowest among the tested periods, and the DNJ concentration in top leaves was lower than that in middle leaves (Fig. 2).

DISCUSSION

Kimura *et al.* (2007) reported that young mulberry leaves taken from the top of branches contain the greatest amount of DNJ and that the concentration of DNJ in mulberry leaves harvested in August was the highest throughout the year. Conditions of the mulberry trees were not reported in their paper, but we consider that the findings of the paper might be based on mulberry trees pruned in March. Our results indicate which leaves and month of the year will produce the greatest concentration of DNJ depends on the timing of branch pruning.

In 2004, the monthly precipitation was highest in September, whereas in 2005 the monthly precipitation in September was lowest (Figs. 1, 2), but other weather conditions were similar in the two years. Based on the two years of data, it appears that DNJ increases in mulberry leaves from 4 or 5 months after branch pruning, independent of pruning timing. If the pruning timing differs from the March and June pruning reported here, leaves taken from the middle of branches may contain high concentrations of DNJ. These results show that the timing of pruning can be manipulated to produce mulberry leaves containing high concentration of DNJ.

REFERENCES

- FLEET, G. W. J., KARPAS, A., DWEK, R. A., FELLOWS, L. E., TYMS, A. S., PETURSSON, S., NAMGOONG, S. K., RAMSDEN, N. G., SMITH, P. W., SON, J. C., WILSON, F., WITTY, D. R., JACOB, G. S. & RADEMACHER, T. W. (1988) Inhibition of HIV replication by amino-sugar derivatives. *FEB* 237: 128-132.
- KARPAS, A., FLEET, G. W. J., DWEK, R. A., PETURSSON, S., NAMGOONG, S. K., RAMSDEN, N. G., JACOB, G. S. & RADEMACHER, T. W. (1988) Aminosugar derivatives as potential anti-human immunodeficiency virus agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 9229-9233.
- KIM, J-W., KIM, S-U., LEE, H., KIM, I., AHN, M. & RYU, K. (2003) Determination of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba* L. leaves by derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate followed by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1002: 93-99.

- KIMURA, T., NAKAGAWA, K., SAITO, Y., YAMAGISHI, K., SUZUKI, M., YAMAKI, K., SHINMOTO, H., & MIYAZAWA, T. (2004) Determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves using hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection. *J. Agric. Food Chem.* 52:1415-1418.
- KIMURA, T., NAKAGAWA, K., KUBOTA, H., KOJIMA, Y., GOTO, Y., YAMAGISHI, K., OITA, S., OIKAWA, S. & MIYAZAWA, T. (2007) Food-grade mulberry powder enriched with 1-deoxynojirimycin suppresses the elevation of postprandial blood glucose in humans. *J. Agric. Food Chem.* 55:5869-5874.
- LEE, H. S., CHUNG, K. S., KIM, S. Y., RYU, K. S. & LEE, W. C. (1998) Effect of several sericultural products on blood glucose lowering for Alloxan-induced hyperglycemic mice. *Korean J. Seric. Sci.* 40: 38-42.
- YAGI, M., KOUNO, T. AOYAGI, Y. & MURAI, H. (1976) The structure of moranoline, a piperidine alkaloid from *Morus* species. *Nippon Nougai Kagaku Kaishi* 50: 571-572.

FLUCTUATION DE LA CONCENTRATION EN 1-DEOXYNOJIRIMYCINE CHEZ LES FEUILLES DE MURIER SELON LA PERIODE DE TAILLE DES BRANCHES

RITSUKO MURAKAMI, AKIO KOYAMA & HIROE YASUI

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

Les études précédentes ont montré que les jeunes feuilles de mûrier prises sur les branches du haut en août contiennent la concentration la plus élevée en 1-deoxynojirimycine (DNJ), par comparaison à d'autres parties des branches et d'autres mois de récolte. Dans cette étude, on taille les branches de mûrier en mars et en juin et on détecte et on quantifie le DNJ dans les différentes parties des arbres pendant les différents mois de cueillette. Quand on taille les branches en mars, la concentration en DNJ dans les feuilles récoltées sur les branches du sommet en août est la plus élevée, par comparaison à différentes parties et à différents mois de cueillette. Cependant, quand on taille les branches en juin, la concentration en DNJ dans les feuilles cueillies en août est la plus basse par rapport aux périodes testées et la concentration des feuilles du haut en DNJ tend à être inférieure à celle des feuilles du milieu. Nos observations indiquent que la période de taille des branches a une influence sur la période et sur le type de branches de mûrier qui contiennent des concentrations élevées en DNJ.

INTRODUCTION

Le 1-deoxynojirimycine (DNJ) est un constituant caractéristique des feuilles, de l'écorce, des racines et des branches de mûrier (Yagi et coll., 1976). On a montré que ce composé inhibe la multiplication du HIV (Fleet et coll., 1988 ; Karpas et coll., 1988) et qu'il supprime l'augmentation des niveaux de glucose dans le sang après le repas (Kimura et coll., 2007). Parce qu'il est possible d'utiliser le DNJ du mûrier de manière thérapeutique pour le traitement oral des diabètes non insulino-dépendants, plusieurs produits alimentaires qui contiennent des feuilles de mûrier sont disponibles dans le commerce (Lee et coll., 1998). On a donc mis au point des méthodes pour identifier (Kim et coll., 2003 ; Kimura et coll., 2004) et quantifier le DNJ. Kimura et coll., (2007) ont étudié les conditions qui donnent des concentrations élevées de DNJ dans les feuilles de mûrier et rapporté que les jeunes feuilles de mûrier prises au sommet des branches, en été, contiennent la plus grande quantité de DNJ.

Au Japon, on taille les branches de mûrier en mars ou en juin pour nourrir les vers à soie avec les feuilles, respectivement en été ou au début de l'automne. Dans cette étude, nous avons taillé les feuilles de mûrier en mars et en juin et nous avons examiné la fluctuation des concentrations en DNJ dans les feuilles de mûrier. Nos résultats indiquent que la période de taille des branches influence la période et les parties qui contiennent la concentration la plus élevée en DNJ.

MATERIELS ET METHODES

Feuilles de mûrier :

On ramasse les feuilles de trois cultivars de mûrier (Ichinose, Kenmochi et Oshimaso de *Morus alba* L.) sur un terrain du *National Institute of Agrobiological Sciences* à Tsukuba, au Japon. On sélectionne trois arbres pour chaque cultivar, et on sélectionne une branche par arbre. On cueille sur chaque branche la feuille brillante la plus grande et les deux feuilles situées en-dessous de cette feuille

(feuilles supérieures) et trois feuilles situées sur la partie supérieure de la branche (feuilles du milieu). On sépare les échantillons de feuilles selon les cultivars, selon la position des feuilles (feuilles supérieures ou feuilles du milieu), selon le mois de cueillette et on les utilise séparément pour l'analyse en DNJ.

En 2004, on a taillé les branches en mars et cueilli les feuilles supérieures et du milieu sur les branches en cours de croissance le 22 juin, le 28 juillet, le 30 août et le 22 septembre (Fig. 1). En 2005, on a cueilli les feuilles supérieures et du milieu le 30 mai et on taille les branches en juin. On ne cueille pas les feuilles en juin, parce qu'il n'y a pas assez de feuilles qui ont poussé sur les branches pour les cueillir. On cueille les feuilles supérieures le 1^{er} août, et on cueille les feuilles supérieures et du milieu le 30 août et le 30 septembre (Fig. 2).

Conditions météorologiques :

On enregistre la température moyenne, les rayonnements solaires quotidiens moyens et les précipitations mensuelles à Tsukuba de 2004 à 2005 avec un système automatisé d'acquisition des données météorologiques (AMEDAS) de l'Agence météorologique Japonaise.

Produits chimiques :

On achète le DNJ auprès de Wako (Osaka, Japon) et on l'utilise comme étalon référence pour la détermination et pour les expériences quantitatives.

Détection du DNJ :

On procède à l'extraction du DNJ, selon une version modifiée de la méthode de Kim et coll., (2003) comme suit. On congèle les feuilles cueillies à -80°C et on les lyophilise. On mélange et on réduit en poudre les feuilles du même échantillon avant l'analyse. On ajoute dix milligrammes de la poudre à 500 μl de 0,05 M HCl et on les passe dans un mélangeur à turbulence pendant 15 min. On ajoute dix microlitres du surnageant à 10 μl de tampon de borate de potassium 0,4 M (pH 8,5), puis on mélange 20 μl de 5 mM 9-fluorénylméthyl chloroformate (FMO-CI) dans du méthanol avec la solution et on laisse réagir à 20°C pendant 20 min. On ajoute dix microlitres de 0,1 M de glycine pour arrêter la réaction et on dilue la solution avec 450 μl d'acide acétique à 0,1 % (v/v) pour stabiliser le DNJ dérivé avec le FMO (DNJ-FMO). On filtre la solution par une unité filtrante actionnée par une seringue de 0,45 μm (Millex-LH, Millipore, Yokohama, Japon).

Le système de chromatographie liquide sous haute pression (HPLC) (Toso, Tokyo, Japon) est constitué d'un dégaseur FC-8020 en ligne, d'une pompe double DP-8020, d'un auto échantillonneur AS-8020, d'un détecteur de multifluorescence PD-8020 (excitation 254 nm, émission 322 nm) d'un processeur de données PX-8020. On utilise une colonne de garde Prodigy 5u ODS (3) (Shimadzu, Kyoto, Japon) et une colonne Prodigy 5u ODS (3) (Shimadzu) à 500 Å (Shimadzu) pour l'analyse du DNJ (Fig. 3). On élue dix microlitres d'analyte avec une phase mobile de méthanol et avec de l'acide acétique à 0,1 % (1 : 1, v/v) à 1 ml min⁻¹ pendant 10 minutes. Après chaque analyse, on lave la colonne avec du méthanol pendant 15 min., puis on l'équilibre avec la phase mobile d'analyse pendant 30 min. La température de la colonne est de 40°C .

Calcul des concentrations en DNJ :

On dérive le DNJ-FMO à partir de 0,03 ; 0,3 ; 3 ; 30, 300 et 3000 ppm de DNJ et on examine la hauteur du pic de DNJ-FMO dans les conditions précisées dans la première partie. La courbe d'étalonnage pour le DNJ-FMO se base sur ces données et on calcule la concentration en DNJ dans les feuilles en utilisant la courbe et la hauteur du pic détecté (mV) pour les feuilles (Fig. 4). On procède au moins à trois répétitions pour chaque analyse.

Analyse statistique :

On analyse la corrélation et la régression, d'après les données de la courbe d'étalonnage en utilisant le logiciel StatView 4,0 (Sas Institute Inc., North Carolina, USA) et on examine les fluctuations de la concentration en DNJ au moyen de l'analyse de covariance (ANOVA) et du test de Scheffe en utilisant le logiciel Stat View 4,0.

RESULTATS

Courbe d'étalonnage pour DNJ-FMOC :

On élue le DNJ-FMOC 7 à 8 min après l'injection de l'échantillon (Fig 3). Quand on obtient 0,03 ppm de DNJ à partir du FMOC et qu'on soumet 10 μ l de DNJ-FMOC à l'HPLC, on ne détecte pas de pics. Cependant, quand on soumet plus de 0,3 ppm de DNJ-FMOC à l'HPLC, on détecte les pics de DNJ-FMOC et la hauteur de chaque pic est proportionnelle à la concentration en DNJ ($R^2 = 0,92$, $n = 24$, Fig. 4). Ces résultats suggèrent que l'analyse quantitative du DNJ est possible.

Fluctuation de la concentration foliaire en DNJ chez les branches taillées en mars :

Chez chaque cultivar, la concentration en DNJ est influencée par la position et le mois de cueillette des feuilles ($p = 0,005$, ANOVA). Chez tous les cultivars testés, pour les feuilles du haut et du milieu, les concentrations en DNJ en août sont les plus élevées parmi les périodes testées (Fig. 1). Selon les tests de Scheffé, la concentration en DNJ est plus élevée dans les feuilles supérieures que dans les feuilles du milieu ($p = 0,001$) et la concentration d'Ichinose en DNJ est plus élevée que celle de Kenmochi ($p = 0,004$).

Fluctuation de la concentration foliaire en DNJ chez les branches taillées en juin :

La concentration en DNJ est influencée par la position et le mois de cueillette des feuilles ($p = 0,04$, ANOVA). La concentration en DNJ dans les feuilles cueillies en août tend à être la plus faible, parmi les périodes testées, et la concentration en DNJ dans les feuilles du haut est plus faible que dans celles du milieu (Fig. 2).

DISCUSSION

Kimura et coll., (2007) ont rapporté que les jeunes feuilles de mûrier prises sur les branches du haut contiennent la plus grande quantité de DNJ et que la concentration dans les feuilles de mûrier cueillies en août est la plus élevée pendant toute l'année. Les conditions concernant les mûriers n'ont pas été rapportées dans leur article, mais nous considérons que les résultats de cet article pourraient se baser sur des mûriers taillés en mars. Nos résultats montrent que la période de taille des branches influence quelles feuilles et quel mois de l'année donneront la plus grande concentration en DNJ.

En 2004, les précipitations mensuelles ont été les plus élevées en septembre, tandis qu'en 2005 les précipitations mensuelles ont été les plus faibles en Septembre (Figs. 1 et 2), mais les autres conditions météorologiques sont similaires pendant les deux années. D'après les données des deux années, il apparaît que le DNJ augmente dans les feuilles de mûrier 4 à 5 mois après la taille des branches, quelle que soit la période de taille. Si la période de taille est différente des tailles de mars et juin présentées ici, les feuilles prises au milieu des branches pourraient contenir des concentrations élevées en DNJ. Ces résultats montrent qu'on peut manipuler la période de taille, pour produire des feuilles de mûrier contenant une concentration élevée en DNJ.

ECO-FRIENDLY INNOVATIVE TECHNIQUES FOR REVERTING CROP LOSSES DUE TO WEEDS, INTO GAINS, IN SERICULTURE

P. S. SINHA, RAM KUMAR, S. BECK, R. K. MISHRA, M. C. JOSHI*,
S. N. SINHADEO & M. K. SINGH

Central Tasar Research and Training Institute, Ministry of Textiles, Government of India, P.O.
Piska Nagri, Ranchi- 835303, Jharkhand, India.

Sericulture is an agro-based industry. The expenditure made on production of leaves is about 60% of cocoon production cost. Approaches in order to maximize the productivity of sericulture are generally restricted at evolving /using high yielding varieties to ameliorate package of practices. However, one sector which hardly ever gets much attention is weed control. Weed in mulberry field does much more harm than is thought. Usually losses due to weeds are estimated to be proportional to the growth of weeds. Besides the nutritional loss a number of indirect losses are associated with the weeds. Check of losses is almost as good as increasing the productivity in sericulture.

Weed control strategies differ from crop to crop. For weed control in mulberry fields, manual weeding practices have been in vogue and recently chemical control of weeds is gaining some acceptance. Manual weeding is slow, expensive, time consuming, causes root damage and panning of the soil, is inefficient and, at the same time, a lot of energies are thrown out of field and never return back to field. Chemical weed control is fast, easy and effective, but it is highly polluting and may lead to development of herbicides resistant weeds. A suitable non toxic weed control method is the need of the hour for mulberry fields. The methods available in this category, amongst others, are biological control and computer based eco-physiological prediction model. While biological control is highly specific and very expensive, computer based eco-physiological prediction model of weed control needs a lot of expertise to be adopted.

This paper brings forth two new eco friendly methods i.e. 1. Weed control by weed itself. 2. Weed control through use of urea, not only for controlling the weeds in mulberry fields but also for converting weed losses into profitable techniques. These methodologies are not only the non-toxic and eco-friendly but at the same time they put the energies taken away by the weed from sericulture fields, back into the system, in order to improve the availability of soil nutrients and to increase the production of foliage qualitatively and quantitatively, and also to bring down the expenditure of foliage production.

Keywords: Weeds, Weed control, Mulching, Chemical control, Biological control, Computer based eco-physiological prediction mode, Manual weeding, Urea.

INTRODUCTION

Sericulture is an agro-based industry with food plants and silkworms being its two major components. The expenditure made on production of leaves is about 60% of cocoon production cost.

* Present address: Regional Tasar Research Station, Ministry of Textiles, Government of India, Bhimtal, Nainital, Uttarakhand, India.

Generally in order to maximize the productivity of sericulture, different techniques are tested, from using high yielding varieties to better package of practices but one sector which hardly ever gets much attention is weed control. A major thick stand of grasses and weeds provides habitat for rabbits and rodents which indirectly harm mulberry plants.

Further weed control is not a seasonal problem and weeds germinate and grow during all the seasons of year so that weed control procedures need to be carried out regularly (Pierce, 2002). Check of losses is almost as good as increasing the productivity. Chanellization of these losses into the production of mulberry can definitely give a boost to sericulture by way of an enhanced production. This is what precisely this paper aims at.

For weed control in mulberry fields manual weeding is in vogue. Manual weeding is not only expensive and time consuming, at the same time in this method a lot of energies /nutrients are thrown out of field and never return back to field. It may also cause root damage, panning of the soil and is very slow and inefficient (Seth, 1977).

Recently chemical weed control in sericulture is also gaining some favour as it is easy, effective and fast, but it is highly polluting (Seth, 1977; Nanda, 1976). Further no single herbicide provides lasting control to all the weed species (Seth, 1977). It also entails a lot of danger and risk of contaminating nearby ditches drains and sewage system or the ground water (Rask and Kristoffersen, 2007; Allendeo, 1991). Besides it is also leading to very serious consequences like herbicide resistance as brought out by Neve (2007).

The one other method i.e. intercropping through legumes though is eco-friendly and check further weed growth (Seth, 1977), however, it is not practicable and needs advance planning. The other modern method of weed control is biological control. It is based on the principle that any organism that curtails plant growth or reproduction may be used as a biological weed control agent (Hoffaker, 1964). Successful outcome of biological weed control requires the establishment of presence of natural enemy, the build up of natural enemy population and control of target weeds (Harris, 1971). However it is highly specific and very expensive e.g. cost of investigation of a weed feeding insect for biological control has been estimated as high as ½ to 1 million (Harris, 1971)

In present age computer based eco-physiological prediction model, a complete version including self shading component is prepared which provide algorithm for inter plant competition for weed control through prediction of growth of main plant and competition i.e. weeds (Benjamin and Park, 2007). However, it needs a lot of expertise and precision to be adopted.

An efficient non toxic friendly method of weed control in mulberry fields will go a long way to bring down the expenses and ameliorate the soil nutrients, thereby increasing qualitative and quantitative leaf production and ultimately cocoon production and the profit margin.

It is in this background, the present study was undertaken. Two innovative eco-friendly techniques i.e. 1. Weed control by weed itself. 2. Weed control through use of urea were conceived and assessed. These techniques are not only for controlling the weeds in mulberry fields but also for converting weed losses into profitable methodologies. These techniques are not only non-polluting and eco-friendly but at the same time they put energies taken away by the weeds from sericulture fields, back into the system in order to better the availability of soil nutrients and to improve the production of foliage qualitatively and quantitatively, thus bringing down the expenditure of foliage production and reducing the cocoon production cost.

MATERIALS AND METHODS

The study was carried out at CRC Hehal farm of Regional Sericultural Research Station Ranchi, Jharkhand India in the existing plantation of *Morus alba* L. var K2

The two methods of weed control, conceived and employed were

- Weed control by weed itself.
- Weed control through use of urea.

1. Weed control by weed itself:

20 plots of existing plantation of *Morus alba* of 3 M × 3M size, each plot containing 9 plants, were earmarked for the study. After cessation of monsoon, in half of these plots (i.e. 10 plots), weeds were uprooted and mulched there itself as surface mulch, ensuring 10-14 cm thick cushion and was treated as treatment. In the rest 10 plots weeds were uprooted manually and thrown out of the field and this set was treated as control. Weed count per 900 sq cm was recorded at 5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 and 125 days after treatment and Efficacy percent (EP) of two methods was recorded. EP stands for percent reduction of weeds by treatment over control and was worked out by following formula

$$EP = (N_c - N_t) * 100 / N_c$$

where N_c stand for no. of weeds in control and N_t stands for no. of weeds in treatment

2. Weed control through use of urea:

20 plots of 3 M × 3M size of existing plantation of *Morus alba* were taken for the study. Aqueous solution of urea of varying concentration i.e. 10, 15, 30 and 40% was sprayed on the weeds growing in mulberry plots with control sets being sprayed with water. Each treatment was replicated four times. Observations were recorded on weed count per 900 sq cm at 5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 and 125 days of spray. The EPs of different concentrations of Urea were worked out.

RESULTS AND DISCUSSION

Data were compiled and analyzed and are presented in Fig. 1 to 3. Table I brings out the economics of different method of weed control,

1. Weed control by weed itself:

Data on weed population count on different period after treatments i.e. weed mulching are presented (Fig 1). This can be seen from the figure that weed mulching effectively controlled both the weed growth and the weed population as measured by no. of weeds/900 sq cm and this parameter was invariably low in weed mulched sets compared to sets where manual weeding was carried out. Even at 125th day average weed population was 52.2 % lower in weed mulched sets. The overall average weed count was 72.3% lower in the weed mulched sets.

This can be seen from figure that efficacy of weed control through this method increased up to 30th days and thereafter declined, however, this decline was very gradual and EP has been around 80% for more than two months and thereafter, the decline was not very steep and even after 125th days, EP was more than 50% suggesting that the technique is effective in keeping the weed in check for a considerable period of time. The check is apparently brought out through shading effect of mulch and weeds on decomposition adds to the fertility of the soil.

2. Weed control through use of urea:

Data on the efficacy of weed control through urea solution are presented in Fig 2 to 3. As evident from figures, urea solution has been very effective in containing the weed growth, however, the efficacy of weed control through urea improved with increasing concentration. The lowest concentration i.e. 10% urea solution checked the weed population initially only and later on this rather enhanced the growth of weeds i.e. enhanced both the average weed count and weed count at 125th day.

Table I. Economics of different methods of weed control.

Tableau I. Rentabilité des différentes méthodes de lutte contre les mauvaises herbes.

S.N.	Type of weed control	Material cost USD			Application cost			Total cost
		Materials	Rate (USD)	Material cost (USD)	Mandays (numbers)	Rate (USD)	Material cost (USD)	
		Coût du matériel en USD			Coût de l'application			
	Type de lutte contre les mauvaises herbes	Matériels	Taux (USD)	Coût du matériel (USD)	Journées de travail (en nombre)	Taux (USD)	Coût (USD)	Coût total
1	Weed mulching Paillage de mauvaises herbes	-	-	-	8	2.0	16.0	16.0
2	Urea spray Vaporisation d'urée	Urea 90 Kg	0.125	11.25	2	2.0	4.0	15.25
3	Manual Manuel	-	-	-	200	2.0	40.0	40.0
4	Weedicides Herbicides	2.25 lit	9.5/lit	21.4	2	2.0	4.0	25.38

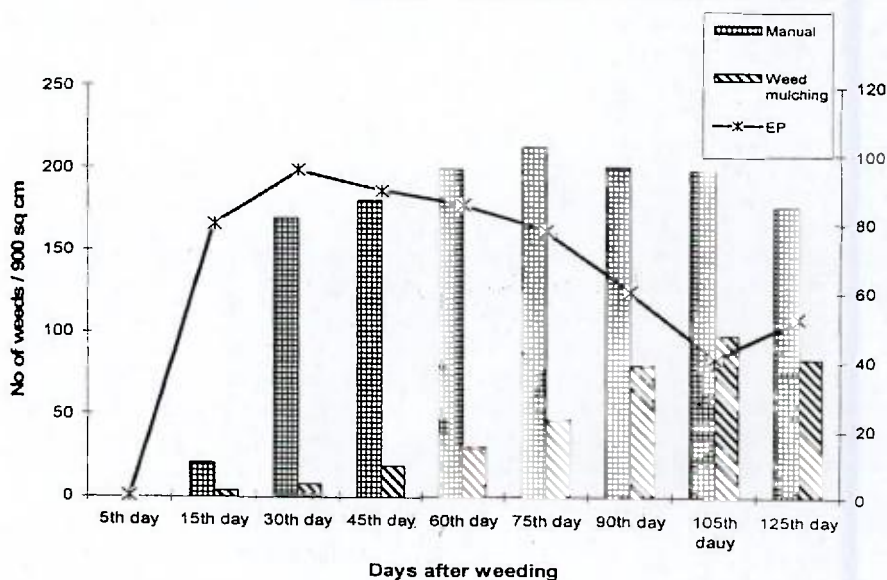


Fig. 1. Efficacy of weed mulching in weed control.

Fig. 1. Efficacité du paillage avec des mauvaises herbes dans la lutte contre les mauvaises herbes.

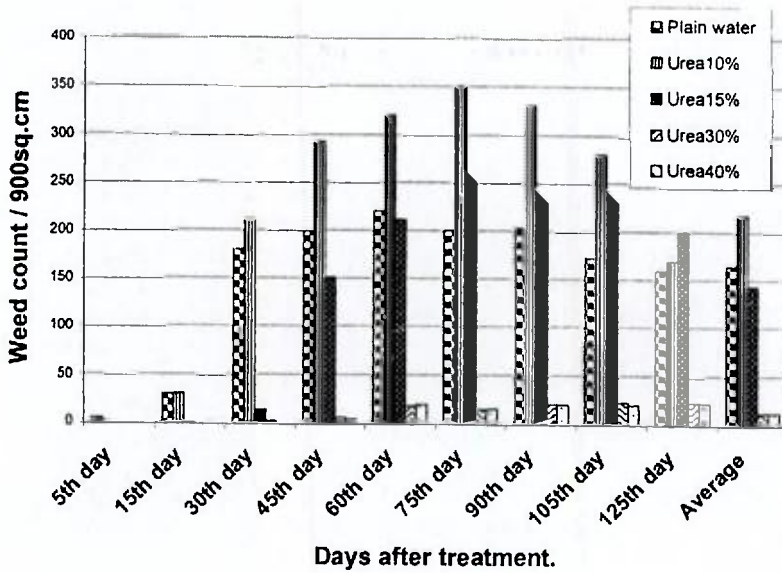


Fig. 2. Weed count at different intervals after spraying of different concentrations of urea solution.

Fig. 2. Compte en mauvaises herbes à différents intervalles après la vaporisation de différentes concentrations de solution d'urée.

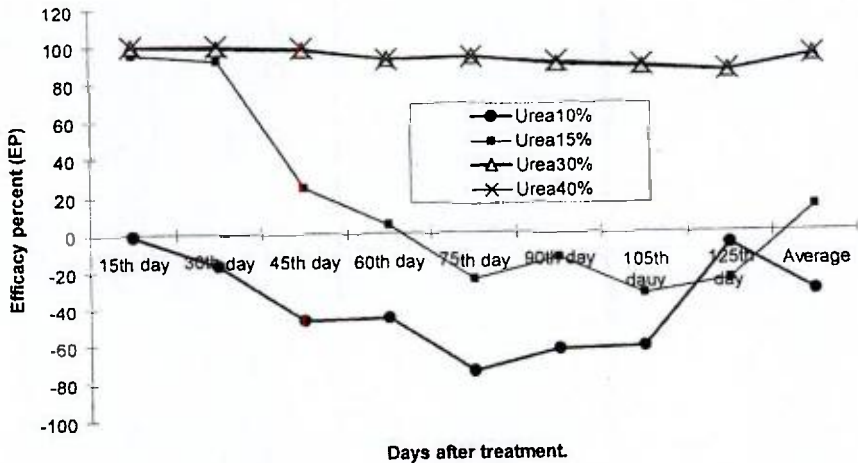


Fig. 3. Efficacy percent (EP) of various concentrations of urea in controlling weeds at various intervals.

Fig. 3. Pourcentage d'efficacité (EP) de différentes concentrations d'urée pour lutter contre les mauvaises herbes à différents intervalles.

At 15%, though the average weed count was lesser up to 60th days but after 60th days weed count was invariably higher compared to control. At 30% and 40% urea concentration weed growth was effectively checked and weed population was very low all through, thus keeping the average weed count as well as weed count at 125th day far below than their control counterparts. Data also clearly show that 10 and 15% urea solution could contain the weed growth in initial phase, i.e. 100 EP was achieved at 5th day, thereafter at 15th day, while EP came down to 95.6% with 15% urea, the 10% urea solution showed rather negative EP. On subsequent counts, EPs with 10% and 15% urea solutions showed declining trend. However 30 and 40 % urea solution could contain weed population for about four months with EP higher than 80%. This can also be seen that EP values with 30% and 40% urea solutions have been more or less at par so that 30% may be preferred.

It is to be added that while applying urea solution following cautions must be taken

⇒ Application must be done during non rainy dry day and spray should be directed on the weeds.

⇒ The dried up weeds must be collected immediately and put in a pit for decomposition. This mixture can be used as nitrogen rich compost after decomposition.

Table I depicts the economics of different methods of weed control. This is clear from the table that manual weeding is the most expensive followed by weed control through weedicides, weed mulching and urea spray; however weed mulching and urea spray methods are more or less at par cost wise. The added advantage of the two methods are that while mulching adds to the fertility of soil through organic enrichment (as the weeds on decomposition adds to the organic matter, the urea laced killed weeds definitely adds to the fertility of the soil).

While weed control through weedicides adds pollutants to the soil, the weed control through weed mulching and urea spray have added advantage of increased fertility to the soil and are eco-friendly. The foregoing clearly suggests that the two proposed techniques can well be used not only in fighting against weed menace but in order to increase the economy and eco-friendliness of sericulture.

REFERENCES

- ALLENDEO W.J. (1991) Movement of bromocil and hexazinone in municipal site. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 46:284-291
- BENJAMIN L.R. and PARK S.E. (2007) The conductance model of plant growth and competition in monoculture and species mixture; a review. *Weed Research* 47(4):284-298 Ed. Fryer J.D. and Mat Sunaka, S. Univ Tokyo Press pp 153-176.
- HARRIS P. (1971) Biological control of weeds in Canada 1959-68. Current approaches to biological control of weeds. In "Biological control programme against Insects and Weeds in Canada 1959-68". Insect Biol Control Trinidad. Tech Commun No.4 pp67-76
- HOFFAKER B. (1964) Fundamentals of biological weed control. In "Biological control of Insect pests and weeds" Ed. P. De Ach Reinhold Publ, New York. pp631-649.
- NANDA K. (1976) Integrated weed control in rice In" Integrated control of weeds Ed. Fryere J.D. and Matsunaka, S. Univ. Tokyo Press pp 17-46.
- NEVE P.(2007) Challenges for herbicide resistance, evolution and management 50 yrs after Harper, *Weed Research* 47(5):365-369.
- PIERCE G. (2002) Lawn care tips. Internet document <http://www.lawn-care-tips.com/weedscontrol.html>
- RAMANAWSKI (1977) Integrated use of herbicides for weed control in upland crops In " Integrated control of weeds". Ed. Fryere J.D. and Matsunaka, S. Univ Tokyo Press pp 47-64
- RASK, A.M. AND KRISTOFFERSEN, P. (2007) A review of non-chemical weed control on hard surfaces. *Weed Research* 47(5):370-380
- SETH, K.(1977) Integrated weed control in tropical plantation In "Integrated control of weeds" Ed. Fryere J.D. and Matsunaka, S. Univ. Tokyo Press pp 60-87.

TECHNIQUES INNOVANTES ECOLOGIQUES POUR TRANSFORMER EN GAINS LES PERTES DE RECOLTES DUES AUX MAUVAISES HERBES EN SERICICULTURE

P. S. SINHA, RAM KUMAR, S. BECK, R. K. MISHRA, M. C. JOSHI*,
S. N. SINHADEO & M. K. SINGH

Central Tasar Research & Training Institute, Ministry of Textiles, Government of India, P. O.
Piska Nagri, Ranchi – 835 303, Jharkhand, Inde.

La sériciculture est une agro-industrie. Les dépenses réalisées pour la production de feuilles représentent environ 60 % du coût de production. Les approches pour maximiser la productivité de la sériciculture sont en général limitées à la mise au point / à l'utilisation de variétés à rendement élevé pour améliorer l'ensemble des pratiques. Cependant, un secteur qui reçoit très peu d'attention est la lutte contre les mauvaises herbes. Les mauvaises herbes font beaucoup plus de mal qu'on ne le pense dans les muraies. Généralement, on estime que les pertes dues aux mauvaises herbes sont proportionnelles à la croissance des mauvaises herbes. En plus de la perte de nutriments, un certain nombre de pertes indirectes sont associées aux mauvaises herbes. En sériciculture, la maîtrise des pertes est presque aussi efficace que l'augmentation de la productivité.

Les stratégies de lutte contre les mauvaises herbes diffèrent d'une culture à l'autre. Pour la lutte contre les mauvaises herbes dans les muraies, les pratiques de désherbage manuel ont été à la mode et récemment la lutte chimique contre les mauvaises herbes est de plus en plus acceptée. Le désherbage manuel est lent, coûteux, prend du temps, abîme les racines et fatigue le sol, il est inefficace et parallèlement, il utilise beaucoup d'énergie qui ne retourne jamais sur le terrain. La lutte chimique contre les mauvaises herbes est rapide, facile et efficace, mais elle est très polluante et pourrait conduire au développement de mauvaises herbes qui résistent aux herbicides. A l'heure actuelle, on a besoin d'une méthode adaptée de lutte contre les mauvaises herbes dans les muraies. Les méthodes disponibles dans cette catégorie sont, parmi d'autres, la lutte biologique et un modèle informatique de prédiction éco-physiologique. Alors que la lutte biologique est très spécifique et très chère, le modèle informatique de prédiction éco-physiologique de lutte contre les mauvaises herbes nécessite beaucoup d'expertise pour être adopté.

Cet article présente deux nouvelles méthodes non nuisibles à l'environnement à savoir 1. la lutte contre les mauvaises herbes par les mauvaises herbes elles-mêmes et 2. la lutte contre les mauvaises herbes par l'utilisation de l'urée, non seulement pour lutter contre les mauvaises herbes dans les muraies, mais aussi pour transformer les pertes dues aux mauvaises herbes en techniques rentables. Ces méthodologies sont non seulement non toxiques et non nuisibles à l'environnement mais, en même temps, elles replacent dans le système, l'énergie prise par les mauvaises herbes aux muraies, de manière à augmenter les nutriments disponibles dans le sol et la production de feuillage qualitativement et quantitativement et également à diminuer les dépenses de production de feuillage.

* Adresse actuelle : Regional Tasar Research Station, Ministry of Textiles, Government of India, Bhimtal, Nainital, Uttarachal, Inde.

INTRODUCTION

La sériciculture est une agro-industrie et les plantes hôtes et les vers à soie en sont ses deux principaux composants. Les dépenses pour la production de feuilles représentent environ 60 % du coût de production des cocons. En général, pour maximiser la productivité de la sériciculture, on a testé différentes techniques, de l'utilisation de variétés à rendement élevé à de meilleurs systèmes de pratiques, mais l'un des secteurs qui ne reçoit presque aucune attention est la lutte contre les mauvaises herbes. Une épaisseur importante d'herbe et de mauvaises herbes fournit un habitat aux lapins et aux rongeurs, qui nuisent indirectement au mûrier.

Par ailleurs, la lutte contre les mauvaises herbes n'est pas un problème saisonnier et les mauvaises herbes germent et croissent pendant toutes les saisons de l'année, de sorte que les procédures de lutte contre les mauvaises herbes doivent être entreprises régulièrement (Pierce, 2002). La maîtrise de ces pertes est presque aussi efficace que l'augmentation de la productivité. La canalisation de ces pertes dans la production du mûrier peut sans aucun doute dynamiser la sériciculture en améliorant la production. Cet article a été réalisé dans ce but.

Pour lutter contre les mauvaises herbes dans les muraies, le désherbage manuel est à la mode. Le désherbage manuel est non seulement coûteux et prend du temps, mais parallèlement avec cette méthode, beaucoup d'énergies, de nutriments sortent du terrain et ne reviennent jamais au terrain. Il pourrait aussi abîmer les racines, appauvrir le sol et il est très lent et inefficace (Seth, 1977).

Depuis quelque temps, la lutte chimique contre les mauvaises herbes devient populaire en sériciculture, car elle est facile, efficace et rapide, mais elle est très polluante (Seth, 1977 ; Nanda, 1976). De plus, aucun herbicide unique n'apporte de lutte durable contre toutes les espèces de mauvaises herbes (Seth, 1977). Elle présente aussi beaucoup de dangers et risque de contaminer les canalisations et le système des égouts voisins ou l'eau du sol (Rask et Kristoffersen, 2007 ; Allendeo, 1991). De plus, elle entraîne aussi des conséquences graves comme la résistance aux herbicides, comme Neve (2007) l'a mis en évidence.

Une autre méthode non nuisible à l'environnement est la culture alternée de légumineuses, qui enraie la croissance supplémentaire des mauvaises herbes (Seth, 1977), cependant, elle n'est pas praticable et demande une planification à l'avance. L'autre méthode moderne de lutte contre les mauvaises herbes est la lutte biologique. Elle est basée sur le principe que, n'importe quel organisme qui restreint la croissance ou la reproduction de la plante pourrait être utilisé comme agent de lutte biologique contre les mauvaises herbes (Hoffaker, 1964). Pour lutter de manière biologique contre les mauvaises herbes avec succès, il faut s'assurer de la présence d'un ennemi naturel, accumuler la population ennemie naturelle et lutter contre les mauvaises herbes ciblées (Harris, 1971). Cependant, cette technique est très spécifique et très chère, on a estimé par exemple le coût de recherche d'un insecte se nourrissant à partir de mauvaises herbes à $\frac{1}{2}$ à 1 millions (Harris, 1971).

A l'heure actuelle, un modèle informatique de prédiction éco-physiologique a été mis au point, la version complète fournit un algorithme pour la concurrence entre les plantes pour lutter contre les mauvaises herbes par la prédiction de la croissance de la plante principale et de la concurrence, c'est-à-dire les mauvaises herbes (Benjamin et Park, 2007). Cependant, il requiert beaucoup d'expertise et de précision pour l'adopter.

Une méthode de lutte écologique efficace contre les mauvaises herbes permettrait de réduire considérablement les dépenses et d'améliorer les nutriments du sol, ce qui augmenterait la production qualitative et quantitative de feuilles et finalement la production de cocons et la marge de profits.

C'est dans ce contexte, que cette étude a été entreprise. Nous avons conçu et évalué deux méthodes innovantes et écologiques, c'est-à-dire 1. la lutte contre les mauvaises herbes par les mauvaises herbes elles-mêmes 2. la lutte contre les mauvaises herbes par l'utilisation de l'urée. Ces techniques permettent, non seulement de lutter contre les mauvaises herbes dans les muraies, mais aussi de convertir les pertes dues aux mauvaises herbes en méthodologies rentables. Ces techniques sont non seulement non polluantes et non nuisibles à l'environnement mais, en même temps, elles

remettent les énergies prises aux muraies par les mauvaises herbes dans le système, de manière à améliorer la disponibilité en nutriments dans le sol et à améliorer la production de feuillage, de manière qualitative et quantitative, ce qui diminue donc les dépenses de production de feuillage et le coût de production des cocons.

MATERIELS ET METHODES

L'étude a été réalisée dans la ferme CRC Hehal de la *Regional Sericultural Research Station* de Ranchi, dans le Jharkhand, en Inde dans la plantation existante de la var. K2 de *Morus alba* L.

Les deux méthodes de lutte contre les mauvaises herbes conçues et employées sont :

- La lutte contre les mauvaises herbes par les mauvaises herbes elles-mêmes.
- La lutte contre les mauvaises herbes par l'utilisation de l'urée.

1. La lutte contre les mauvaises herbes par les mauvaises herbes elles-mêmes :

Pour l'étude, on prend 20 parcelles de la plantation existante de *Morus alba* de 3 m × 3 m, contenant chacune 9 plants. Après l'arrêt de la mousson, on déracine les mauvaises herbes dans la moitié des parcelles (c'est-à-dire 10 parcelles), et on s'en sert comme paillage de surface, en s'assurant d'avoir un coussin de 10 à 14 cm d'épaisseur, que l'on considère comme un traitement. Pour les dix parcelles restantes, on déracine les mauvaises herbes manuellement et on les jette dans le champ et on traite ce lot comme témoin. On enregistre le compte en mauvaises herbes pour 900 cm², 5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 et 125 jours après le traitement et on enregistre le pourcentage d'efficacité (EP) des deux méthodes. L'EP représente le pourcentage de diminution des mauvaises herbes avec le traitement, par rapport au témoin et on le calcule en suivant la formule :

$$EP = (Nc - nt) * 100 / Nc$$

où Nc représente le nombre de mauvaises herbes chez le témoin et Nt représente le nombre de mauvaises herbes chez le traitement.

2. Lutte contre les mauvaises herbes par l'utilisation de l'urée :

Pour l'étude, on prend 20 parcelles de 3 m × 3 m de la plantation de *Morus alba*. On vaporise une solution aqueuse d'urée à des concentrations variées, c'est-à-dire 10, 15, 30 et 40 % sur les mauvaises herbes poussant dans les parcelles et on vaporise les lots témoins avec de l'eau. On répète chaque traitement quatre fois. On enregistre les observations sur le compte en mauvaises herbes pour 900 cm², 5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 et 125 jours après la vaporisation. On calcule l'EP des différentes concentrations d'urée.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données sont présentées dans les Figs. 1 à 3. Le Tableau I présente la rentabilité des différentes méthodes de lutte contre les mauvaises herbes.

1. Lutte contre les mauvaises herbes par les mauvaises herbes elles mêmes :

Les données sur le compte de la population en mauvaises herbes pendant différentes périodes, après les traitements, c'est-à-dire après le paillage avec des mauvaises herbes sont présentées (Fig. 1). D'après la figure, on peut voir que le paillage avec des mauvaises herbes permet de lutter à la fois contre la croissance des mauvaises herbes et contre la population de mauvaises herbes, comme on peut le mesurer d'après le nombre de mauvaises herbes / 900 cm² et ce paramètre est invariablement faible pour les lots paillés avec des mauvaises herbes, par comparaison aux lots où on procède au désherbage manuel. Même au 125^{ème} jour, la population moyenne en mauvaises herbes est 52,2 % plus faible, chez les lots paillés avec des mauvaises herbes. Le compte global moyen en mauvaises herbes est 72,3 % plus faible chez les lots paillés avec des mauvaises herbes.

D'après la figure, on peut voir que l'efficacité de la lutte contre les mauvaises herbes par cette méthode augmente jusqu'au 30^{ème} jour, puis elle baisse. Cependant, ce déclin est très progressif et l'EP est autour de 80 % pendant plus de deux mois ; ensuite, le déclin n'est pas très abrupt et même au bout de 125 jours, l'EP est de plus de 50 %, ce qui suggère que la technique est efficace pour maîtriser les mauvaises herbes pendant une période considérable. L'ombre apportée par le paillage permet apparemment d'enrayer les mauvaises herbes et les mauvaises herbes en décomposition fertilisent le sol.

2. Lutte contre les mauvaises herbes par l'utilisation de l'urée :

Les données sur l'efficacité de la lutte contre les mauvaises herbes avec une solution d'urée sont présentées dans les Figs. 2 à 3. Comme le montre les figures, la solution d'urée est très efficace pour contenir la croissance des mauvaises herbes, cependant, l'efficacité de la lutte contre les mauvaises herbes avec l'urée s'améliore avec l'augmentation de la concentration. La concentration la plus faible, c'est-à-dire une solution d'urée à 10 % freine la population de mauvaises herbes seulement au début et plus tard elle accroît plutôt la croissance des mauvaises herbes, c'est-à-dire à la fois le compte moyen en mauvaises herbes et le compte en mauvaises herbes au 125^{ème} jour.

A 15 %, bien que le compte en mauvaises herbes soit inférieur par comparaison au témoin jusqu'au 60^{ème} jour, après le 60^{ème} jour, le compte en mauvaises herbes est invariablement plus élevé. Avec une concentration en urée de 30 % et 40 %, la croissance des mauvaises herbes est enrayerée efficacement et la population de mauvaises herbes est très faible pendant toute la durée, ce qui maintient donc le compte moyen en mauvaises herbes, ainsi que le compte en mauvaises herbes au 125^{ème} jour, bien en dessous de ceux du témoin. Les données montrent aussi clairement qu'une solution d'urée à 10 et à 15 % peut contenir la croissance des mauvaises herbes au stade initial, c'est-à-dire qu'on obtient 100 % d'EP au 5^{ème} jour et par la suite, au 15^{ème} jour, tandis qu'avec 15 % d'urée l'EP descend à 95,6 %, avec la solution d'urée à 10 % l'EP est plutôt négatif. Pendant les comptes suivants, les EP avec des solutions d'urée à 10 % et à 15 % présentent une tendance à la baisse. Cependant, une solution d'urée à 30 et à 40 % peut contenir la population de mauvaises herbes pendant environ quatre mois avec un EP supérieur à 80 %. On peut aussi constater que les valeurs EP avec une des solutions d'urée à 30 et à 40 % sont plus ou moins égales entre elles, de sorte qu'il vaut mieux préférer une solution à 30 %.

Par ailleurs, lorsqu'on applique la solution d'urée, il faut prendre les précautions suivantes :

⇒ Il faut procéder à l'application lorsqu'il ne pleut pas et il faut diriger la vaporisation vers les mauvaises herbes.

⇒ Il faut récolter les mauvaises herbes sèches immédiatement et les disposer dans un trou pour qu'elles se décomposent. On peut utiliser ce mélange comme un compost riche en azote, après la décomposition.

Le Tableau I présente la rentabilité des différentes méthodes de lutte contre les mauvaises herbes. Il est clair d'après le Tableau que le désherbage manuel est le plus cher, suivi par la lutte contre les mauvaises herbes avec des désherbants, le paillage avec des mauvaises herbes et la vaporisation d'urée ; cependant, les méthodes de paillage avec des mauvaises herbes et de vaporisation d'urée sont plus ou moins égales entre elles en ce qui concerne le coût. L'avantage supplémentaire de ces deux méthodes est que le paillage améliore la fertilité du sol par un enrichissement organique (car les mauvaises herbes en décomposition ajoutent de la matière organique et les mauvaises herbes tuées par l'urée améliorent la fertilité du sol).

Alors que la lutte contre les mauvaises herbes avec des désherbants pollue le sol, la lutte contre les mauvaises herbes par le paillage et par la vaporisation d'urée présente l'avantage d'améliorer la fertilité du sol et de ne pas nuire à l'environnement. Compte tenu de tout ce qui a été précisé, les deux techniques proposées peuvent être utilisées non seulement pour combattre la menace des mauvaises herbes, mais aussi pour augmenter la rentabilité et le caractère écologique de la sériciculture.

EFFECT OF FEEDING DURATION ON SOME ECONOMICAL PARAMETERS OF THE TASAR SILKWORM *ANTHERAEA MYLITTA* DRURY

DINESH KUMAR, P. K. MISHRA, B. M. K. SINGH, S. K. SHARAN & N. SURYANARAYANA

Silkworm Physiology Laboratory, Central Tasar Research and Training Institute,
P.O. Piska-Nagri, Ranchi 835 303, India.

Outdoor rearing of tasar silkworms is directly influenced by the variation in food quality and prevailing environmental conditions, reflecting difference in larval duration and cocoon quality. Present study shows the effect of natural variation of food quality and environmental conditions experienced by the fact that a lot of larvae hatched within first four hours on larval span and cocoon quality.

The rearing results show that variation in larval span up to 4th moult was 10 days (28-37 days) and up to spinning was 16 days (48-63 days). In all the batches, 5th instar worms of the same day and time show 3-4 days variation in initiation of spinning. Male cocoons were found to spin one day earlier so much so that on first day only males spun. Female spun later and on last two days only females were observed to spin. Effect of larval duration on cocoon quality was not very conspicuous. Regression analysis in relation to single cocoon weight vs. total larval duration showed that consecutive increase in larval duration affects cocoon quality marginally.

Keywords: *Antheraea mylitta*, brushing and rearing, synchronisation, environment.

INTRODUCTION

Tropical tasar silkworm *Antheraea mylitta* is one of the most exploited wild sericigenous insect in India. It feeds on primary and secondary food plant species of *Shorea robusta* Gaertn., *Terminalia tomentosa* Bedd., *Terminalia arjuna* W&A., *Zizyphus jujuba* L. and *Lagerstroemia parviflora* Roxb. etc in nature, from where the cocoons are collected since time immemorial. Tasar silkworm has diverse habitat in the states of Jharkhand, Bihar, Chhattisgarh, West Bengal, Orissa, Madhya Pradesh and Andhra Pradesh. It is also reared outdoor on the raised plantation of *Terminalia arjuna* W. & A. and *Terminalia tomentosa* Bedd. The first crop is raised during July - August as seed crop and second crop is raised during September - November as commercial crop. Outdoor rearing does not allow uniform feed and environmental condition leading to variation in development and prolongation of larval period. Influence of rearing conditions on the larval growth, productivity of silk substances etc has been reported in silkworms (Ueda *et al.*, 1971; Pillai *et al.*, 1987). Among environmental factors, temperature is known to play a major role on growth and productivity in silkworm (Benchamin and Jolly, 1986; Shivakumar *et al.*, 1997). Information on the effect of season and rearing conditions on different parameters of rearing have also been reported in other groups of insects (Cunnington, 1985; Johansen, 1997), in other silkworms (Krishnaswami *et al.*, 1971; Mathur *et al.*, 1995) and in non-mulberry silkworms, (Choudhary, 1981; Sinha and Choudhury, 1992; Sahu, *et al.*, 1998; Situmorang, 2002). Literature is available on food intake and utilization in different instars of both mulberry (Hanifa *et al.*, 1988; Kurubayashi *et al.*, 1990; Teznov *et al.*, 1999 and non-mulberry silkworms (Poonia, 1978; Pant *et al.*, 1986; Barah *et al.*, 1989; Ojha *et al.*, 2000; Rath, 2005) in indoor

condition. Species of host plants greatly affect performance of a variety of lepidopteran larvae (Drooz, 1970; Soo Hoo and Fraenkel, 1966; Beckwith, 1976). Effect of individual host species on growth and survival of insects is also reported (Hough and Pimental, 1978; Lindroth and Hemming, 1990). However, quantification of variations in development and cocoon quality due to prevailing outdoor environmental conditions on the same day brushed tasar silkworm larvae during second (commercial) crop is lacking. In mulberry sericulture where rearing is conducted indoors, variation in larval development of same day brushed larvae is only of 2-3 days till spinning. In the present study efforts were taken to measure the variation in feeding duration and its effect on cocoon quality taking uniformly hatched larvae.

MATERIALS AND METHODS

The study was carried out at the field laboratory of Central Tasar Research & Training Institute, Ranchi, India (latitude 23.21°N, longitude 85.23°E and altitude 651 m AMSL). The second crop of tasar silkworm *A. mylitta* was raised under 12 hours 18 minutes to 11 hours 19 minutes photoperiod regimen, 15 to 30°C temperature range and 54 to 91% R.H. The worms hatched out within first four hours were mounted and reared on 15 years old *Terminalia arjuna* plants raised in 1.83 × 1.83 m spacing and maintained at 1.83 m height. Simultaneously, separate batch of healthy worms were also maintained to replace the experimental worms lost due to diseases, parasites and predators. The larvae were reared as such till IV moult. At IV moult sex wise day 0 fifth instar larvae were sorted out and reared separately in replicated form. Those larvae that started spinning on a day were kept separately for formation of cocoon. Cocoons were harvested after seventh day once larvae converted themselves into pupae. Sex-wise larval duration and cocoon quality viz., cocoon weight, pupal weight and shell weight were recorded. The meteorological data were recorded for the entire period of experimentation. The data was subjected to regression and correlation.

RESULTS AND DISCUSSION

The rearing results show that variation in larval span up to IV moult was of 10 days (28-37 days) and up to spinning was 16 days (48-63 days). The batches of worms entering 5th instar within 24 hours shows 3-4 days variation in feeding duration. Within all batches, first days spun cocoons were found to be males. It was observed that on day 48 only male cocoons were formed whereas on day 62-63 only female cocoons were formed. The cocoons spun on different days of larval feeding were analysed for cocoon weight, pupal weight, shell weight and silk ratio. (Figs. 1 & 2). Further, the regression analysis in relation to single cocoon weight vs. larval duration was worked out and it was observed from regression equation $y = 739 + 0.70x$, $r^2 = 0.174$ that the coefficient of determination is less than 20 % and unexplained variation due to unknown factors is more than 80 % (Table I). The ANOVA for regression analysis shows that regression as source of variation is non significant i.e., consecutive increase in larval duration affected cocoon weight marginally (Table I). However, it can be seen from (Figs. 1 & 2) that variation in cocoon weight, pupal weight, shell weight and silk ratio % was low in early part of spinning and high in later part of spinning.

The extended larval period of 48-63 days may be attributed to the effect of changes in temperature, humidity and feed quality due to chance effect which is more in outdoor condition. The delay in larval duration occurs due to low nutrient levels (Sreedhara *et al.*, 1991) in *Bombyx mori* and in such cases, insects manage to accumulate required quantity of nutrient by extending the feeding period and limiting nutrients in the body in order to maintain the critical level of growth (Slansky and Feeny, 1971). Further, low biomass accumulation due to decreased food assimilation and conversion into body mass has been reported (Shivakumar, 1995; Shivakumar *et al.*, 1997). Benchamin and Jolly, (1986) and Situmorang (2002) have reported that variation in the larval span causes variation in the cocoon parameters.

Table I. Regression analysis of single cocoon weight vs larval duration and abiotic factors.**Tableau I. Analyse de régression pour le poids d'un cocon par rapport à la durée larvaire et aux facteurs abiotiques.**

Factors	Intercept (a)	Regression Coefficient			Coefficient of determination (R^2)	F-test
<i>Facteurs</i>		<i>Coefficient de régression</i>			<i>Coefficient de détermination (R^2)</i>	
		B1	B2	B3		
IV instar duration <i>Durée du 4ème âge</i>	10.471 (2.874)	0.021 (0.088)			0.007	0.058 ^{NS}
Maximum temperature <i>Température maximum</i>	21.173 (39.884)	-0.365 (1.455)			0.007	0.063 ^{NS}
Minimum temperature <i>Température minimum</i>	14.966 (19.551)	-0.223 (1.147)			0.005	0.038 [*]
Relative humidity <i>Humidité relative</i>	4.997 (93.181)	0.082 (1.234)			0.0005	0.004 ^{**}
Max. temp, min. temp. & R.H. <i>Temp. Max., temp. Min et H. R.</i>	54.229 (186.894)	-2.941 (9.874)	2.057 (7.765)	0.033 (1.419)	0.019	27.796 ^{NS}
V instar duration <i>Durée du 5ème âge</i>	4.253 (1.310)	0.299 (0.057)			0.848	27.796 ^{NS}
Maximum temperature <i>Température maximum</i>	184.038 (74.366)	-6.207 (2.669)			0.519	5.405 ^{NS}
Minimum temperature <i>Température minimum</i>	48.357 (45.612)	-2.076 (2.545)			0.117	0.665 ^{NS}
Relative humidity <i>Humidité relative</i>	61.564 (8.051)	-0.650 (0.104)			0.887	39.238 ^{NS}
Max. temp, min. temp. & R.H. <i>Temp. max., temp. min et H. R.</i>	43.925 (64.123)	0.755 (2.789)	0.025 (1.273)	-0.699 (0.221)	0.889	8.077 ^{NS}
Total duration <i>Durée totale</i>	7.390 (45.612)	0.070 (0.048)			0.174	2.109 ^{NS}
Maximum temperature <i>Température maximum</i>	50.063 (28.558)	-1.471 (1.080)			0.156	1.855 ^N

**** Significant at 1% / Significatif au seuil de 1 %. * Significant at 5% / Significatif au seuil de 5 %. NS - Non significant / Non significatif.** Parentheses values indicate standard error / Les valeurs entre parenthèses indiquent l'écart type.

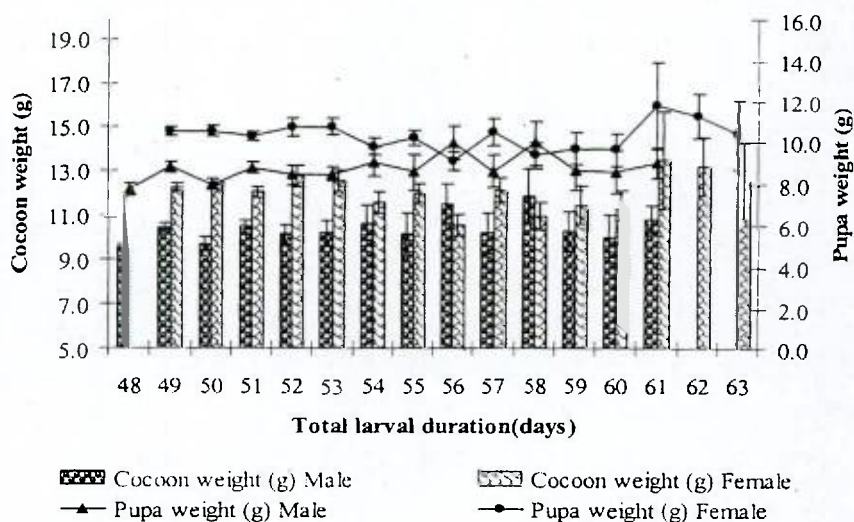


Fig. 1. Effect of total feeding duration on cocoon and pupal weight in *A. mylitta* during second crop.

Fig. 1. Effet de la durée totale d'alimentation sur le poids du cocon et sur le poids nymphal chez A. mylitta pendant la deuxième récolte.

Cocoon weight / Poids du cocon. Pupa weight / Poids de la nymphe.

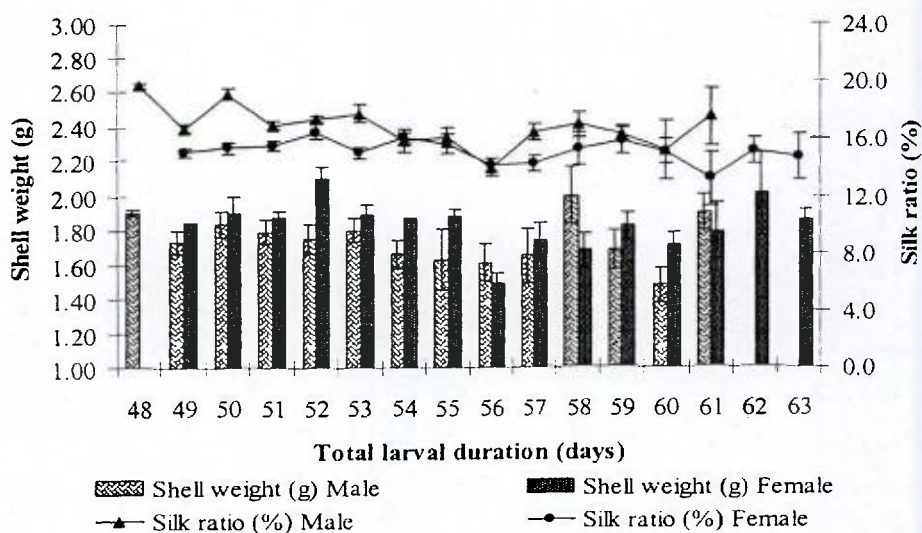


Fig. 2. Effect of total feeding duration on cocoon shell weight and silk ratio in *A. mylitta* during second crop.

Fig. 2. Effet de la durée totale d'alimentation sur le poids de la coque soyeuse et sur la richesse soyeuse chez A. mylitta pendant la deuxième récolte.

Shell weight / Poids de la coque. Silk ratio / Richesse soyeuse.

Variation in the suitability and abundance of food, fluctuation in temperature, humidity and other factors also prevents insects from attaining their physiological potential life history performance (Slansky and Scriber, 1985). In the present study also variation in the larval duration and cocoon quality has been observed even if the worms were brushed on the same day within four hours.

CONCLUSION

It can be concluded that outdoor rearing of tasar silkworms creates inequality in development with regard to larval duration and cocoon quality. Up to 4th instar the variation in larval duration is of 10 days and up to spinning it is 16 days. Male cocoons were found to spin earlier so much so that on first day only male spun. Female spin later and on last two days only females were observed to spin. Effect of larval duration on cocoon quality is not very conspicuous. However, early spun cocoons show low variation than later spun cocoons. The study suggest for further investigation to ascertain suitable brushing dates having least variation in larval period which can be an economic advantage by saving on manpower and foliage consumption.

ACKNOWLEDGEMENT

Authors are thankful to Sri Suresh Rai, Scientists C (Statistics) for statistical analysis of data

REFERENCES

- BARAH A. GOSWAMI M. C. AND SAMSON M. V. (1989). Consumption and utilisation of food in different instars of Muga silkworm *Antheraea assama* Westwood. Proc. Indian acad. Sci. 98(2):99-103.
- BECKWITH R. C. (1976). Influence of host foliage on the douglas-fir tussock moth. Environ Entomol. 64:1032-1034.
- BENCHAMIN K.V. AND JOLLY M.S. (1986). Principles of silkworm rearing, Proc. of seminar on problems and prospects of sericulture, S. Mahalingam (Ed.) Vellore, India pp 63-108,
- CHOUDHURY S. N. (1981). Muga Silk Industry, Directorate of Sericulture and Weaving, Government of Assam, pp 71-73.
- CUNNINGTON A. M. (1985). Factors affection oviposition and fecundity in the grain mite, *Acarus siro* (Acarina: Acaridae) especially temperature and humidity. Exp. App. Acaro, 4: 327-344.
- DROOZ A. T. (1970). The elm span worm (Lepidoptera: Geometridae) how several natural diets affect its biology. Ann. Entomol. Soc. Amer. 63:391-397.
- HANIFA M. A., THOMAS M., PUNITH M. AND ARUNACHALAM M. (1988). Effect of larval nutrition on survival, growth and reproduction in the silkworm *Bombyx mori* L. Sericologia. 28 (4):563-575.
- HOUGH J. A. AND PIMENTAI D. (1978). Influence of host foliage on development, survival and fecundity of gypsy moth. Environ. Entomol. 7:97-102.
- JOHANSEN N. B. (1997). Influence of temperature on development, fecundity and survival of the cabbage moth *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) in relation to the improvement of forecasting and control methods. J. Appl. Entomol. 121: 81-88.
- KRISHNASWAMI S., SRIHARAN T. P. AND AHASEN A. M. (1971). Ecological studies on silkworm rearing to prevent crop losses in adverse seasons in West Bengal. Indian J. Seri. 10: 72-76
- KURUBAYASHI S., SUDA Y. AND KOUSAKA T. (1990). Studies on the food utilization efficiency in the silkworm *Bombyx mori* L. reared on mulberry leaves. Bull. Nat. Inst. Seric. Ento. Sci. 1:81-102.
- LINDROTH R. L. AND HEMMING J. C. (1990). Response of the gypsy moth to aspen phenolic glycosides. Biochem. System Ecology. 15:685-690.

- MATHUR S. K., PRAMANIK D. R., SEN S.K. AND SUBBA RAO (1995). Effect of seasonal temperature and humidity on ovulation, fecundity and retention of eggs in silkworm *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) Rec. Zool. Soc. India. 95: 57-64.
- OJHA N. G., SHARAN S. K., S. RAI AND PANDAY P. N. (2000). Studies on the sexwise consumption and utilization of leaves of different food plants in different ecotypes of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Drury fifth instar of first crop. Int. J. Wild Silkworm and Silks. 5:99-103.
- PANT R., RAMANA D. AND SARKAR D. (1986). Consumption and utilisation of food in *Philosamia ricini* larva during development. Sericologia. 26:49-54.
- PILLAI V., KRISHNASWAMI S AND KASHIVISHWANATHAN K. (1987). Growth studies silkworm of *Bombyx mori* L in tropical conditions. Indian J. Seric. 16: 32-45.
- POONIA F. S. (1978). Studies on food utilisation and rate of growth during the development stages of eri silkworm *Philosamia ricini* Hutt (Lepidoptera.: Saturniidae). Indian J. Seric. 17(10): 48-60.
- RATH S. S. (2005). Effect of quantitative nutrition on adult characters and reproductive fitness in tropical tasar silkworm *Antheraea mylitta*, Int. J. Indus. Entomol. 10(1):19-24.
- SAHU A.K., SINGHA B. B. AND DAS P. K. (1998). Phenological studies in Muga silkworm *Antheraea assama* Ww. (Lepidoptera: Saturniidae) in relation to its rearing and grainage behaviour. Proceeding of third international conference on wild silk moths. pp 25-28.
- SHIVA KUMAR, C. (1995) Physiological and Biochemical studies on nutrition in silkworm *Bombyx mori* L. Ph.D. Thesis; Bangalore University, Bangalore India. pp 211.
- SHIVA KUMAR C., SEKHARAPPA B.M. AND ARANGI S. K. (1997). Influence of temperature and leaf quality on rearing performance of silkworm, *Bombyx mori* L. India J. Seric. 36 (2):116-120.
- SINHA A. K. AND CHOUDHURY A. (1992). Factors influencing the phenology of different broods of tropical tasar silkworm *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera: Saturniidae) in relation to emergence post emergence behaviour. Environ. & Ecology. 10(4): 952-958.
- SITUMORANG J. (2002). Wild Silk Industry as new revenue to increase farmer's income and for environmental conservation. Proc. International Conference on Wild silk Moths, Yogyakarta, Indonesia 23rd-26th April, 2002. pp 1-16.
- SLANSKY F. JR AND FEENY P. (1971). Stabilization of rate of nitrogen accumulation by the larvae of the cabbage butterfly on wild and cultivated food plants. Ecol. Monogr. 47: 209-228.
- SLANSKY, F. JR. and SCRIBER, J. M. (1985). Food consumption and utilisation. In: Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and pharmacology ((Kerkut, G. A. and Gilbert, L. I. eds. Pergamon Press, Oxford.), Vol. 4. pp 87-161,
- SOO HOO C. F. AND FRAENKEL G. (1966). The consumption, digestion and utilization of food plants by a polyphagous insect, *Prodenia eridania* Cramer. J. Insect Physiol. 12:711-730.
- SREEDHARA V.M., SHANTIKUMARI M. AND BORAI AH G. (1991). Preliminary studies on changes in the levels of protein, sugar, chlorophyll and moisture content in the developmental leaves of mulberry, *Morus alba*. Proceedings of International Congress on Tropical Sericulture Practices. Bangalore. pp 35-38.
- TZENOV P., PETKOV N. AND NATCHEVA Y. (1999). Study on the inheritance of food ingestion and digestion in hybrids in between univoltine and multivoltine silkworm, *Bombyx mori* L. races. Sericologia. 39(2):171-177.
- UEDA S., KIMURA R. AND SUZUKI K. (1971). Studies on the growth of silkworm, *Bombyx mori* L. III Relative increase in body weight and silk gland weight in fifth instar. Bull. Seri. Expt. Station. 25:1-20

EFFET DE LA DUREE D'ALIMENTATION SUR CERTAINS PARAMETRES ECONOMIQUES DU VER A SOIE TASAR *ANTHERAEA MYLITTA* DRURY

DINESH KUMAR*, P. K. MISHRA, B. M. K. SINGH, S. K. SHARAN &
N. SURYANARAYANA

Silkworm Physiology Laboratory, Central Tassar Research and Training Institute, P.O.
Piska-Nagri, Ranchi 835 303, Inde.

L'élevage à l'extérieur des vers à soie tassar est directement influencé par la variation de la qualité de la nourriture et des conditions environnementales existantes, ce qui se reflète par des différences de durée larvaire et de qualité du cocon. L'étude actuelle montre l'effet des variations naturelles de la qualité de la nourriture et des conditions environnementales sur la durée larvaire et sur la qualité du cocon à partir de larves écloses à intervalle de moins de quatre heures.

Les résultats de l'élevage montrent que, jusqu'à la 4^{ème} mue, la variation de la durée larvaire est de 10 jours (28 à 37 jours) et jusqu'au filage de 16 jours (48-63 jours). Le commencement du filage diffère de 3 à 4 jours chez tous les lots de vers du 5^{ème} âge du même jour et de la même heure. On constate que les cocons mâles filent un jour plus tôt, de sorte que le premier jour seuls les mâles filent. Les femelles filent plus tard et pendant les deux derniers jours, seules les femelles filent. L'effet de la durée larvaire sur la qualité du cocon n'est pas très évident. L'analyse de régression concernant la relation entre le poids du cocon et la durée larvaire totale montre que l'augmentation de la durée larvaire affecte la qualité du cocon de manière marginale.

INTRODUCTION

Le ver à soie tassar tropical *Antheraea mylitta* est l'un des insectes séricigènes sauvages les plus exploités en Inde. Il se nourrit principalement sur les espèces de plantes hôtes primaires et secondaires de *Shorea robusta* Gaertn., *Terminalia tomentosa* Bedd., *Terminalia arjuna* W. & A., *Zizyphus jujuba* L. et *Lagerstroemia parviflora* Roxb. Etc.. dans la nature, où on récolte les cocons depuis des temps immémoriaux. Le ver à soie tassar est présent dans un habitat varié dans les états du Jharkhand, du Bihar, de Chhattisgarh, du Bengale ouest, de l'Orissa, du Madhya Pradesh et de l'Andhra Pradesh. Il est également élevé à l'extérieur sur la plantation cultivée de *Terminalia arjuna* W. A. et de *Terminalia tomentosa* Bedd. La première récolte est élevée en juillet – août comme récolte de grainage et la deuxième récolte est élevée en septembre – novembre comme récolte commerciale. L'élevage à l'extérieur ne permet pas une alimentation et des conditions environnementales uniformes, ce qui entraîne des variations du développement et de la durée larvaire. On a rapporté que les conditions d'élevage influencent la croissance de la larve et la productivité de matières soyeuses chez les vers à soie (Ueda et coll., 1971 ; Pillai et coll., 1987). Parmi les facteurs environnementaux, on sait que la température joue un rôle principal sur la croissance et sur la productivité du ver à soie (Benchamin et Jolly, 1986 ; Shivakumar et coll., 1997). Des études ont aussi été réalisées sur l'effet des saisons et des conditions d'élevage sur différents paramètres d'élevage chez d'autres groupes d'insectes (Cunnington, 1985 ; Johansen, 1997), chez d'autres vers à soie (Krishnaswami et coll., 1971 ; Mathur

* Email: dineshumrao@rediffmail.com

et coll., 1995) et chez les vers à soie non-mûriers (Choudhary, 1981 ; Sinha et Choudhury, 1992 ; Sahu, et coll., 1998 ; Situmorang, 2002). On dispose de littérature sur l'absorption et l'utilisation de nourriture aux différents âges à la fois chez les vers à soie mûriers (Hanifa et coll., 1988 ; Kurubayashi et coll., 1990 ; Tzenov et coll., 1999) et non-mûriers (Poonia, 1978 ; Pant et coll., 1986 ; Barha et coll., 1989, Ojha et coll., 2000 ; Rath, 2005) dans des conditions à l'intérieur. Les espèces de plantes hôtes ont une influence importante sur la performance d'un ensemble de larves lépidoptères (Drooz, 1970 ; Soo Hoo et Fraenkel, 1966 ; Beckwith, 1976). Il existe des études sur l'effet d'une espèce individuelle d'hôte sur la croissance et sur la survie des insectes (Hough et Pimental, 1978 ; Lindroth et Hemming, 1990). Cependant, il n'existe pas de recherche sur la quantification des variations du développement et de la qualité du cocon, sous l'effet des conditions environnementales existantes chez les larves de ver à soie tassar levées le même jour pendant la deuxième récolte (commerciale). Dans la sériciculture mûrier, où l'élevage est réalisé à l'intérieur, la variation du développement larvaire des larves levées le même jour n'est que de 2 à 3 jours jusqu'au filage. Dans cette étude, des efforts ont été réalisés pour mesurer la variation de la durée d'alimentation et son effet sur la qualité du cocon, en prenant des larves ayant éclos de manière uniforme.

MATERIELS ET METHODES

L'étude a été réalisée au laboratoire de terrain du *Central Tassar Research & Training Institute*, Ranchi, Inde (latitude 23,21° N, longitude 85,23° E et altitude de 651 m au-dessus de la mer). La deuxième récolte du ver à soie tassar *A. mylita* est élevée avec une photopériode entre 12 heures 18 minutes et 11 heures 19 minutes, dans une fourchette de température de 15 à 30 ° C et une H. R. de 54 à 91 %. Les vers qui éclosent dans les quatre premières heures sont levés et sont élevés sur des plants de *Terminalia arjuna* de 15 ans, avec un espacement de 1,83 × 1,83 m et maintenus à une hauteur de 1,83 m. Simultanément, on maintient aussi un lot séparé de vers sains pour remplacer les vers perdus au cours de l'expérience à cause des maladies, des parasites et des prédateurs. Les larves sont élevées de cette manière jusqu'à la 4^{ème} mue. A la 4^{ème} mue, on trie les larves de 0 jour du 5^{ème} âge en fonction du sexe et on les élève séparément sous forme de répétition. On conserve ces larves qui commencent à filer un jour particulier séparément pour la formation du cocon. On récolte les cocons au bout du 7^{ème} jour, une fois que les larves se sont transformées en nymphes. On enregistre la durée larvaire en fonction du sexe ainsi que la qualité du cocon, c'est-à-dire le poids du cocon, le poids nymphal, et le poids de la coque. On enregistre les données météorologiques pendant toute la durée de l'expérience. On soumet les données à la régression et à la corrélation.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats d'élevage montrent que la variation de la durée larvaire jusqu'à la 4^{ème} mue est de 10 jours (28 à 37 jours) et qu'elle est de 16 jours jusqu'au filage (48 à 63 jours). Les lots de ver à soie entrant dans le 5^{ème} âge dans les mêmes 24 heures présentent une variation de la durée d'alimentation de 3 à 4 jours. Dans tous les lots, les cocons filés les premiers jours s'avèrent être des mâles. On observe que le jour 48, seuls des cocons mâles se forment tandis que les jours 62-63, seuls des cocons femelles se forment. On analyse le poids du cocon, de la nymphe, de la coque et la richesse soyeuse chez les cocons filés au bout de différents jours d'alimentation larvaire (Figs. 1 & 2). De plus, on effectue l'analyse de régression pour la relation entre le poids d'un cocon et la durée larvaire et on observe d'après l'équation de régression $y = 739 + 0,70x$, $r^2 = 0,174$ que le coefficient de détermination est inférieur à 20 % et qu'il existe une variation inexpliquée due à des facteurs inconnus qui est supérieure à 80 % (Tableau 1). Cependant, on peut constater d'après les figs. 1 et 2 que la variation du poids du cocon, du poids de la nymphe, du poids de la coque et de la richesse soyeuse (%) est faible pendant la période précoce de filage et élevée dans la partie tardive du filage.

On pourrait attribuer le prolongement de la durée larvaire de 48 à 63 jours à l'effet des changements de température, d'humidité et de la qualité de la nourriture sous l'effet du hasard, qui est plus important dans les conditions à l'extérieur. L'allongement de la durée larvaire se produit sous l'effet de faibles niveaux de nutriments (Sreedhara et coll., 1991) chez *Bombyx mori* et dans de tels cas, les insectes arrivent à accumuler la quantité de nutriments requise en prolongeant la durée d'alimentation et en limitant les nutriments dans le corps de manière à maintenir le niveau critique de croissance (Slansky et Feeny, 1971). Par ailleurs, on a signalé une faible accumulation de biomasse sous l'effet de la baisse de l'assimilation et de la conversion de nourriture en masse corporelle (Shivakumar, 1995 ; Shivakumar et coll., 1997). Benchamin et Jolly (1986) et Situmorang (2002) ont rapporté que les variations de la durée larvaire entraînent une variation des paramètres du cocon.

La variation de la convenance et de l'abondance de nourriture, la fluctuation de la température, de l'humidité et d'autres facteurs empêchent aussi les insectes d'atteindre leur potentiel physiologique de performance vitale (Slansky et Scriber, 1985). Dans cette étude, on a aussi observé la variation de la durée larvaire et de la qualité du cocon, même si les vers sont levés le même jour en l'espace de quatre heures.

CONCLUSION

On peut conclure que l'élevage des vers à soie tasar à l'extérieur crée une inégalité de développement par rapport à la durée larvaire et à la qualité du cocon. Jusqu'au 4^{ème} âge, la variation de la durée larvaire est de 10 jours et jusqu'au filage, elle est de 16 jours. Il s'avère que les cocons mâles filent plus tôt, de sorte que le premier jour seuls les mâles filent. La femelle file plus tard et les deux derniers jours, on observe seulement des femelles filer. L'effet de la durée larvaire sur la qualité du cocon n'est pas très évident. Cependant, les cocons filés au début présentent une variation moins importante, que ceux filés plus tard. L'étude suggère des recherches supplémentaires pour s'assurer de dates de levée adaptées, présentant le moins de variations de la durée larvaire, ce qui pourrait représenter un avantage sur le plan économique pour économiser de la main d'œuvre et diminuer la consommation de feuilles.

EFFECT OF OIL CAKES AND PESTICIDES ON RHIZOSPHERE AND RHIZOPLANE MICROFLORA IN MULBERRY (*MORUS* SPP.)

D. D. SHARMA, DIVIA BABY*, V. NISHITHA NAIK & V. R. MALA

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

A field experiment was conducted in Randomized Block Design with 4 treatments and control to know the effect of recommended doses of oil cakes [obtained from seeds of neem (*Azadirachta indica* L.) after extraction of oil and niger (*Guizotia abyssinica* L.)] and pesticides [Dithane M-45 (Mancozeb 75 % WP) and Furadan (Carbofuran 3 G)] used for the control of soilborne diseases in mulberry on rhizosphere and rhizoplane microflora. Pooled data of 3 observations (10, 20 and 30 days after applications) indicated that the bacterial population was maximum in terms of colony forming units (CFU/g) followed by fungi and actinomycetes in both the habitats. This microflora was significantly higher in rhizosphere as compared to rhizoplane. Totally, 27 (18 fungi, 7 bacteria and 2 actinomycetes) and 21 forms of microflora (12 fungi, 7 bacteria and 2 actinomycetes) were isolated from rhizosphere and rhizoplane habitats of mulberry, respectively. Based on their behaviour, the microflora was categorized into 3 groups viz., beneficial, harmful and saprophytic. The effect of oil cakes and pesticides on rhizosphere and rhizoplane microflora revealed that the oil cakes of niger and neem and chemical viz., Furadan (Nematicide) do not have any effect on the beneficial microflora but significantly reduced the harmful and saprophytic microflora in both the habitats. Whereas, Dithane M-45 was found to significantly reduce the beneficial, harmful and saprophytic microflora both in rhizosphere and rhizoplane soils when compared to the control. In abundance and frequency, *Azotobacter* spp., *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* and *Pseudomonas fluorescens* (beneficial group) were found most abundant and dominant forms while *Fusarium solani*, *F. oxysporum* and *Xanthomonas* spp. belonging to harmful group, were found abundant and common/frequent. However, among saprophytic group, all the forms were observed as less abundant and frequent/occasional in all the treated and untreated (control) soils of rhizosphere and rhizoplane habitats.

Keywords: Rhizosphere, rhizoplane, microflora, mulberry, isolation, oil cakes, pesticides

INTRODUCTION

Mulberry (*Morus* spp.), the sole food plant of silkworm (*Bombyx mori* L.) is a perennial crop and intensively cultivated for leaf, with repeated harvest of 5 crops/year, favouring the survival, multiplication and inoculum build-up of certain soilborne pathogens causing different diseases. Among the diseases, root knot (*Meloidogyne incognita*), root rot (*Fusarium solani*/F. *oxysporum*/Botryodiplodia *theobromae*), root disease complex (association of *M. incognita* and root rot fungal pathogens) and nursery diseases [Cutting rot (*F. solani*) and stem canker (*B. theobromae*)] pose serious threat to mulberry crops causing leaf yield loss up to 20 % besides deteriorating the leaf quality (Sengupta *et al.*, 1990; Sharma *et al.*, 2003; Naik, 2006). Soil application of neem oil cake at the rate of 2 mt/ha/yr or Furadan (40 kg/ha/yr) have been recommended in 4 split doses for the control of root knot disease in mulberry while Dithane M-45 (Mancozeb 75%

* St. Xavier's College for Women, Aluva, Kerala (India).

WP) at the rate of 10 g/plant is recommended for the control of root rot and nursery diseases (Sengupta *et al.*, 1990; Govindaiah *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 2003). Niger oil cake at the rate of 2 mt/ha/yr in 4 splits has been recommended for the control of root disease complex (Naik, 2006). Study of the microflora with special reference to their beneficial/pathogenic nature in the habitats of rhizosphere and rhizoplane in mulberry may help to formulate an effective management strategy for soilborne diseases. The application of pesticides affects the beneficial microflora in the soil besides killing the pathogens (Ganesan and Kumari, 1991; Davies *et al.*, 1991; Paul *et al.*, 1995). Many researchers have studied the rhizosphere and rhizoplane microflora in relation to growth and age of the mulberry plants (Shree and Boraiah, 1987; Sudhakar *et al.*, 1999). Sudhakar *et al.* (2000) reported that the population of nitrogen-fixing bacteria in mulberry rhizosphere was greatly affected by the soil application of Carbandanzim 50 % WP.

So far, no attempt has been made to study the effect of beneficial microflora in mulberry rhizosphere and rhizoplane soils, after application of oil cakes and pesticides. Hence, the present study was carried out to know the distribution, effect, abundance and frequency of the beneficial/harmful/saprophytic microflora in rhizosphere and rhizoplane after the application of recommended doses of oil cakes (neem and niger) and pesticides (Furadan 3 G and Dithane M-45) used for the control of various soilborne diseases in mulberry.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted in established mulberry plantation (K-2) infested with *M. incognita* (causing root knot) and *F. solani* and *F. oxysporum* (causing root rot). The trial was laid out in Randomized Block Design (RBD) in 300 sq mt area with 5 treatments and 3 replications. The soil was red sandy loam (sand - 74.8 %; silt - 17.2 % and clay - 8.0 %) with pH range of 6.5 - 6.8, organic carbon 0.18 - 0.23 %, nitrogen 0.40 - 0.68 %, phosphorus 46.4 kg/ha and potash 260.2 kg/ha. The plot was divided into 15 sub plots (20 sq mt each) with 52 plants each. To minimize the inter plot interference bunds were raised for each sub-plot. The different treatments are:

T-0 : Control (without any treatment)

T-1 : Neem oil cake at the rate of 500 kg/ha/dose

T-2 : Niger oil cake at the rate of 500 kg/ha/dose

T-3 : Furadan (Carbofuran 3 G; at the rate of 10 kg/ha/dose)

T-4 : Dithane M-45 (Mancozeb 75% WP; at the rate of 10 g/plant)

Oil cakes of neem and niger at the rate of 500 kg/ha/dose (2 t/ha/year in 4 splits) and Furadan at the rate of 10 kg/ha/dose (40 kg/ha/year in 4 splits), were applied during intercultural operation by broadcasting around the plant and mixed well in the soil by ploughing followed by irrigation. Dithane M-45 was applied at the rate of 10 g/plant after exposing the root system (15-20 cm depth).

Isolation of microbes:

The soil samples for isolation of microbes such as fungi, bacteria and actinomycetes in rhizosphere and rhizoplane habitats were collected in sterile polythene bags after 10, 20 and 30 days of application from ten randomly selected plants. The soil samples from each replication of the treatment were mixed together to form a composite sample for isolation of microbes by dilution plate technique (Waksman, 1927). 10 g air-dried, powdered and sieved soil was suspended in 100 ml sterile distilled water in 250 ml Erlenmeyer flask. One ml of the supernatant was mixed in 9 ml of sterile distilled water and repeated to obtain the final dilution of 1:10,000. Three different culture media viz., Potato Dextrose Agar, Nutrient agar and Actinomycetes agar were prepared for isolation of fungi, bacteria and actinomycetes, respectively from the collected soil samples. 5 ml of final dilution of rhizosphere and rhizoplane sample from each treatment was mixed with 100 ml of respective

lukewarm medium and poured into five Petri plates at the rate of 20 ml/plate. The inoculated Petri plates were kept for incubation at $28 \pm 2^\circ \text{C}$ for 7 days for fungi and actinomycetes while for bacteria the plates were incubated at 30°C for 2-3 days. After incubation, the colonies of different microflora (fungi, bacteria and actinomycetes) were recorded and the population in terms of colony forming units CFU/g soil was calculated using the following formula (Sharma, 2005).

$$\text{CFU/g} = \frac{A \times B \times C}{D}$$

Where; **A** : Average number of colonies developed
B : Final dilution
C : Volume of water used for suspension of sample
D : Weight of soil sample

Identification of microbes:

All the colonies of different fungi, bacteria and actinomycetes developed on the agar surface in different Petri plates were observed visually and later under phase contrast microscope. On visual examination, the forms appeared as solid fluffy growth on medium indicated the presence of fungi, while watery growth the presence of bacteria. However, the actinomycetes appeared on medium like a shiny colony in the form of pustules (pearl like) in different colours like white, grey, milky white, etc. The fungi were identified based on their morphological and reproductive characters by comparing them with those of recognized groups of fungi published in monographs/books (Booth, 1971; Domsch *et al.*, 1980; Barnett and Hunter, 1999). The bacteria were identified on the basis of Gram reaction as described in Bergey's manual of determinative bacteriology (Krieg, 1984). The actinomycetes were identified based on the colonies and sporophore (rectus, flexibles, retinaculum apertum and spira) characters on agar media (Shirling and Gottlieb, 1966).

Categorization of microflora:

After isolation and identification of microflora from rhizosphere and rhizoplane habitats, they were categorized based on their behaviour into three groups viz., beneficial, harmful and saprophytic (Pal and Jalali, 1998). The percentage of abundance and frequency of various forms of microflora were calculated using the following formulae (Sharma, 2005).

$$\text{Abundance (\%)} = \frac{\text{Average population of individual form in all replications}}{\text{Average of total microbial population in all replications}} \times 100$$

$$\text{Frequency (\%)} = \frac{\text{No. of replications in which an individual form appeared}}{\text{Total no. of replications}} \times 100$$

Based on the abundance (%), the microflora was categorized as most abundant, abundant and less abundant (Singh and Saxena, 1991) and on the basis of frequency (%) as dominant, common, frequent and occasional (Das *et al.*, 1998).

Statistical analysis:

The pooled data on distribution of microflora in rhizosphere and rhizoplane habitats and effect of oil cakes and pesticides on beneficial/harmful/saprophytic microflora were subjected to multi-factorial analysis of variance (ANOVA) in order to study the main effects and interaction effects of the treatments under study using INDOSTAT statistical software. Post-hoc test was also done based on LSD (Least Significant Difference) for comparison of means.

RESULTS AND DISCUSSION

Distribution of microflora:

The pooled data of three observations (10, 20 and 30 days after treatments) presented in Table I indicated that the total population in terms of colony forming units (CFU/g) of microflora (fungi, bacteria and actinomycetes) was significantly higher (at 5% level) in rhizosphere habitat compared to rhizoplane. This might be due to the secretion of root exudates by host plant around the vicinity of rhizosphere zone, which influenced the development of high microbial population (Bolton *et al.*, 1993; Rao, 1999). Further, the quantity of various soluble compounds like sugar, organic acids, vitamins, minerals, *etc.* are higher in the rhizosphere region of the plant than in rhizoplane due to the root exudation (Bolton *et al.*, 1993; Pal and Jalali, 1998) serving as the microbial food. This suggests that the maximum microbial activity is in rhizosphere zone. Hiltner (1904) for the first time noticed the presence of a higher number of microbes in the surrounding of roots (rhizosphere) and assumed that the increased microbial activity may be due to root exudation. This was also in confirmation with the findings of Pandey and Uphadhyay (2000) who found higher microbial population in rhizosphere soil of pigeon pea and Shree and Boraiah (1987) in mulberry.

Among the various microbial forms of rhizosphere and rhizoplane soils, the maximum percentage of colonies were of bacteria (23.0 – 35.8 %) followed by fungi (21.9 – 32.7 %) and actinomycetes (3.5 – 4.7 %) (Table I) indicating that bacterial forms are more actively pronounced and competitive compared to fungi and actinomycetes in both rhizosphere and rhizoplane regions. The least population of actinomycetes in both the habitats might be due to the presence of low organic content and low pH (below 7) of the soil. These results are in agreement with the findings of Sharma (1989) where maximum number of actinomycetes was observed in soil rich in organic matter (Carbon 0.30 - 0.38 %; Nitrogen 0.76 - 0.92 %) and slightly alkaline soil (pH 7.5 - 7.8). He also observed that the soil pH higher than 7.8 and lower than 7.0 with poor organic content were not congenial for the survival of actinomycetes.

Effect of oil cakes and pesticides:

Twenty-seven forms of microflora (18 fungi, 7 bacteria and 2 actinomycetes) from rhizosphere soil and 21 forms from rhizoplane soil (12 fungi, 7 bacteria and 2 actinomycetes) were isolated. The 6 forms that were absent in rhizoplane soil but present in rhizosphere soil were *Alternaria alternata* and *Helminthosporium* spp. of harmful group, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium* spp., *Chaetomium* spp. and *Rhizopus* spp. of saprophytic group. The categorization of microflora based on their behaviour *viz.*, beneficial, harmful and saprophytic is presented in Table III.

The effect of oil cakes and pesticides on rhizosphere and rhizoplane microflora revealed that oil cakes (neem and niger) and Furadan maintained the population of beneficial microflora at the same level as that of the control (non-treated soil) in both the habitats and there was no significant difference in the population (Table II) suggesting that they have no adverse effect on beneficial microflora of the soil. The results are in conformity with the findings of various workers who reported that soil amended with oil cakes resulted in enhancing the colonies of *Trichoderma* and other antagonistic microbes due to fertility enhancing factors involved in oil cakes (Khalis and Monoharachary, 1985; Goswami and Bhattacharya, 1989). Sridar *et al.* (1995) and Sharma *et al.* (1999) reported that most of the antagonistic microbes are compatible with Carbofuran and oil cakes. Tu (1970) reported that *Trichoderma* and other biocontrol agents become dominant in Carbofuran treated soil. On the other hand, these oil cakes and Furadan arrested the population of harmful and saprophytic microflora significantly over the control after 10, 20 and 30 days of their applications in both the habitats. The reduction of these microbes was seen very fast up to 20 days after application.

Table I. Distribution of microflora in rhizosphere and rhizoplane habitats of mulberry.

Tableau I. Distribution de la microflore dans les habitats de la rhizosphère et du rhizoplane chez le mûrier.

Treatment	CFU/g $\times 10^6$ (average of 3 observations-10, 20 & 30 days after application) CFU/g $\times 10^6$ (moyenne de 3 observations 10, 20 et 30 jours après l'application)							
Traitement	Rhizosphere microflora / Microflore de la rhizosphère				Rhizoplane microflora / Microflore du rhizoplane			
	Fungi Champignons	Bacteria Bactéries	Actinomycetes Actinomycètes	Total Total	Fungi Champignons	Bacteria Bactéries	Actinomycetes Actinomycètes	Total Total
Control (without treatment) Témoin (sans traitement)	54.8 $\pm$ 3.78* (52.0%)	45.2 $\pm$ 1.02 (43.0%)	5.2 ^d $\pm$ 0.30 (5.0%)	105.2	32.1 ^a $\pm$ 0.48 (46.8%)	33.0 ^a $\pm$ 0.50 (48.0%)	3.6 ^d $\pm$ 0.23 (5.2%)	68.7
Neem oil cake Tourteau de margousier	35.9 ^{ab} $\pm$ 2.45 (45.2%)	38.0 ^a $\pm$ 1.11 (47.9%)	5.3 ^d $\pm$ 0.13 (6.9%)	79.2	22.2 ^b $\pm$ 2.15 (45.4%)	22.4 ^b $\pm$ 1.13 (45.9%)	4.2 ^d $\pm$ 0.29 (8.7%)	48.8
Niger oil cake Tourteau de Niger	30.9 ^{bc} $\pm$ 3.18 (41.8%)	37.5 ^a $\pm$ 1.94 (50.6%)	5.6 ^d $\pm$ 0.41 (7.6%)	74.0	22.0 ^b $\pm$ 1.51 (45.5%)	22.5 ^b $\pm$ 0.59 (46.6%)	3.8 ^d $\pm$ 0.30 (7.9%)	48.3
Furadan	28.4 ^c $\pm$ 1.63 (40.0%)	37.3 ^a $\pm$ 0.40 (52.6%)	5.2 ^d $\pm$ 0.83 (7.4%)	70.9	21.9 ^b $\pm$ 1.67 (44.2%)	23.9 ^b $\pm$ 1.38 (48.3%)	3.7 ^d $\pm$ 0.35 (7.5%)	49.5
Dithane M-45	13.7 $\pm$ 3.81 (37.1%)	21.0 $\pm$ 4.33 (56.9%)	2.2 ^d $\pm$ 0.12 (6.0%)	36.9	11.3 ^c $\pm$ 2.65 (42.3%)	13.5 ^c $\pm$ 1.68 (50.5%)	1.9 ^d $\pm$ 0.40 (7.2%)	26.7
Average / Moyenne	32.7 (44.7%)	35.8 (48.9%)	4.7 (6.4%)	73.2	21.9 (45.3%)	23.0 (47.5%)	3.5 (7.2%)	48.4
	SE $\pm$		CD at 5 %		SE $\pm$		CD at 5 %	
Microbes (M)	0.99		2.87		0.63		1.83	
Treatment / Traitement (T)	1.28		3.70		0.81		2.36	
M $\times$ T	2.22		4.42		1.47		4.09	

Figures in parentheses represent the population percentage out of total micro-flora / Les chiffres entre parenthèses représentent la population en pourcentage sur la totalité des micro-flores

*Mean $\pm$ SE / Moyenne $\pm$ Ecart-type. Figures that follow the same alphabets do not vary significantly at P = 0.05 by LSD test. / Les valeurs que suivent les mêmes lettres ne varient pas de manière significative à P = 0,05 d'après le test LSD.

Table II. Microbial load in rhizosphere and rhizoplane habitats of mulberry after 10, 20 and 30 days of oil cakes and pesticides application

Tableau II. Charge en microbes dans les habitats de la rhizosphère et du rhizoplane du mûrier 10, 20 et 30 jours après l'application de tourteaux et de pesticides.

Treatment	Days after application	Colony forming units (CFU)/g × 10 ⁶							
		Rhizosphere microflora				Rhizoplane microflora			
		Beneficial	Harmful	Saprophytic	Total	Beneficial	Harmful	Saprophytic	Total
		Unités formant colonies (CFU) / g × 10 ⁶							
Traitement	Jours après l'application	Microflore de la rhizosphère				Microflore du rhizoplane			
		Bénéfiques	Nuisibles	Saprophytes	Total	Bénéfiques	Nuisibles	Saprophytes	Total
Control (without treatment) Témoin (sans traitement)	10	38.6 ^c ± 1.72*	35.7 ^b ± 1.77	9.8b ^c ± 0.40	84.1	22.6 ^d ± 1.28	28.3 ^a ± 0.95	4.0 ^{cd} ± 0.64	54.5
	20	52.7 ^{ab} ± 1.70	43.9 ^a ± 7.08	12.4 ^a ± 1.83	109.0	31.5 ^c ± 1.53	32.7 ± 0.88	5.8 ^{ab} ± 1.08	70.0
	30	53.9 ^a ± 2.6	52.4 ± 1.64	16.2 ± 0.73	122.5	37.4 ^a ± 0.67	36.8 ± 1.03	7.0 ^a ± 0.88	81.2
	Total	145.2	132.0	38.4	315.6	91.5	97.8	16.8	206.0
	Average / Moyenne	48.4	44.0	12.8	105.2	30.5	32.6	5.6	68.7
Neem oil cake Tourteau de margousier	10	37.4 ^c ± 2.48	15.3 ^{efg} ± 1.74	5.5 ^{dc} ± 0.62	58.2	24.1 ^d ± 0.88	12.9 ^{ef} ± 0.81	0.8 ^{fg} ± 0.80	37.8
	20	50.0 ^{ab} ± 5.07	20.8 ^{cde} ± 0.41	7.3 ^d ± 0.80	78.1	29.4 ^c ± 1.03	17.2 ^{bcd} ± 1.68	2.9 ^{de} ± 0.33	49.5
	30	52.4 ^{ab} ± 2.83	39.5 ^{ab} ± 0.92	9.4 ^c ± 0.57	101.3	32.3 ^{bc} ± 1.04	22.1 ± 1.80	4.7 ^{bc} ± 0.88	59.1
	Total	139.8	75.6	22.2	237.6	85.8	52.2	8.4	146.4
	Average	46.6 (-3.7%)	25.2 (-42.7%)	7.4 (-42.2%)	79.2	28.6 (-6.2%)	17.4 (-46.6%)	2.8 (-50.0%)	48.8
Niger oil cake Tourteau de Niger	10	38.8 ^c ± 1.28	12.5 ^{fg} ± 1.30	4.3 ^e ± 0.31	55.6	25.5 ^d ± 0.74	10.8 ^f ± 1.02	0.7 ^{fg} ± 0.37	37.0
	20	52.2 ^{ab} ± 0.86	16.6 ^{defg} ± 1.07	7.0 ^d ± 0.94	75.8	31.0 ^c ± 1.18	15.0 ^{cde} ± 1.30	2.2 ^{ef} ± 0.49	48.2
	30	54.2 ^a ± 1.53	24.9 ^c ± 0.96	11.5 ^{ab} ± 0.50	90.6	36.2 ^a ± 0.59	18.6 ^b ± 1.74	4.9 ^{bc} ± 0.49	59.7
	Total	145.2	54.0	22.8	222.0	92.7	44.4	7.8	144.9
	Average	48.4 (0 %)	18.0 (-59.0%)	7.6 (-40.6%)	74.0	30.9 (+1.3%)	14.8 (-54.6%)	2.6 (-53.5%)	48.3

Table II. (Continued...)/ *Tableau II. (Suite...)*

Treatment	Days after application	Colony forming units (CFU)/g × 10 ⁸							
		Rhizosphere microflora				Rhizoplane microflora			
		Beneficial	Harmful	Saprophytic	Total	Beneficial	Harmful	Saprophytic	Total
		Unités formant colonies (CFU) / g × 10 ⁶							
Traitement	Jours après l'application	Microflore de la rhizosphère				Microflore du rhizoplane			
		Bénéfiques	Nuisibles	Saprophytes	Total	Bénéfiques	Nuisibles	Saprophytes	Total
Furadan	10	35.0 ^c ± 1.37	17.9 ^{def} ± 1.83	0 ^f	52.9	24.3 ^d ± 1.09	13.9 ^{def} ± 0.71	0 ^g	38.2
	20	49.0 ^{ab} ± 1.28	21.9 ^{cd} ± 0.84	0 ^f	70.9	30.2 ^c ± 1.46	17.9 ^{bc} ± 2.21	0 ^g	48.1
	30	51.0 ^{ab} ± 1.0	37.9 ^{ab} ± 0.84	0 ^f	88.9	35.2 ^{ab} ± 1.98	27.0 ^a ± 1.14	0 ^g	62.2
	Total	135.0	77.7	0	212.7	89.7	58.8	0	148.5
	Average	45.0 (- 7.0%)	25.9 (- 41.1%)	0 (- 100%)	70.9	29.9 (- 2.0%)	19.6 (-39.9%)	0 (-100%)	49.5
Dithane M-45	10	8.2 ^d ± 0.66	10.5 ^g ± 0.89	0 ^f	18.7	5.1 ^e ± 0.47	6.7 ^f ± 1.13	0 ^g	11.8
	20	10.3 ± 0.97	15.8 ^{defg} ± 0.99	0 ^f	26.1	8.1 ^e ± 1.26	11.3 ^f ± 0.86	0 ^g	19.4
	30	47.5 ^b ± 0.97	18.4 ^{cdef} ± 2.90	0 ^f	65.9	32.1 ^{bc} ± 1.53	16.8 ^{bcd} ± 1.24	0 ^g	48.9
	Total	66.0	44.7	0	110.7	45.3	34.8	0	80.1
	Average Moyenne	22.0 (- 54.5%)	14.9 (- 66.1%)	0 (- 100%)	36.9	15.1(- 50.5%)	11.6 (- 64.4%)	0 (-100%)	26.7
F – Test (CD at 5%) / Test – F (DC à 5 %)									
Between Treatment (T) / Entre traitements (T)		2.61	2.90	0.84	-	1.50	1.65	0.69	-
Between DAA / Entre DAA		3.37	3.74	1.08	-	1.93	2.13	0.89	-
T × DAA		5.85	6.48	1.88	-	3.35	3.69	1.55	-

Figures in parentheses are the percentage of increase (+) or decrease (–) over the control / Les chiffres entre parenthèses sont le pourcentage d'augmentation (+) ou de diminution (–) par rapport au témoin.; DAA = Days after application / Jours après l'application ; *Mean ± SE / Moyenne ± écart type

Figures that follow the same alphabets do not vary significantly at P=0.05 by LSD test / Les valeurs que suivent les mêmes lettres ne varient pas de manière significative au seuil de P = 0,005 d'après le test LSD.

Table III. Percentage of abundance (Ab) and frequency (Fr) of rhizosphere and rhizoplane microflora of mulberry.**Tableau III. Pourcentage d'abondance (Ab) et fréquence (Fr) des microflores de la rhizosphère et du rhizoplane chez le mûrier.**

Microbes	CFU/g × 10 ⁸ (average of 3 observations) CFU/g × 10 ⁶ (moyenne de 3 observations)							
	Rhizosphere microflora				Rhizoplane microflora			
	Microflores du rhizoplane				Microflores de la rhizosphère			
	Ab (%)	Categ	Fr (%)	Categ	Ab (%)	Categ	Fr (%)	Categ
Beneficial group / Groupe bénéfique								
<i>Trichoderma harzianum</i>	10.8	+++	93.3	D	10.4	+++	90.7	D
<i>T. viride</i>	2.0	+	73.3	C	3.9	+	79.9	C
<i>Verticillium chlamydosporium</i>	3.4	+	78.6	C	3.3	+	78.7	C
<i>Aspergillus awamori</i>	2.4	+	69.3	C	2.1	+	69.3	C
<i>Bacillus subtilis</i>	11.0	+++	93.3	D	11.0	+++	93.3	D
<i>Azotobacter</i> spp.	11.1	+++	92.0	D	11.2	+++	89.3	D
<i>Azospirillum</i> spp.	3.0	+	58.2	F	4.1	+	67.9	C
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	10.3	+++	92.0	D	10.1	+++	83.3	D
<i>Streptomyces</i> spp.	4.4	+	69.3	C	4.9	+	73.3	C
<i>Nocardia</i> spp.	2.0	+	58.6	F	2.3	+	51.9	F
Harmful group / Groupe nuisible								
<i>Fusarium solani</i>	8.0	++	89.3	D	8.6	++	83.3	D
<i>F. oxysporum</i>	7.6	++	82.6	D	8.5	++	81.5	D
<i>F. equiseti</i>	1.7	+	40.0	O	1.9	+	29.3	O
<i>F. moniliforme</i>	1.3	+	38.7	O	1.4	+	16.0	O
<i>Alternaria alternata</i>	0.5	+	20.0	O	-	-	-	-
<i>Helminthosporium</i> spp.	0.4	+	18.7	O	-	-	-	-
<i>Phoma</i> spp.	0.7	+	25.3	O	1.2	+	22.7	O
<i>Pseudomonas</i> spp.	5.1	++	85.9	D	5.2	++	86.6	D
<i>Xanthomonas</i> spp.	5.5	++	82.4	D	5.1	++	80.9	D
<i>Agrobacterium</i> spp.	2.9	+	32.7	O	0.8	+	32.5	O
Saprophytic group / Groupe saprophyte								
<i>Aspergillus niger</i>	1.6	+	49.3	F	1.6	+	42.7	F
<i>A. flavus</i>	0.9	+	46.0	F	1.8	+	41.6	F
<i>A. fumigatus</i>	1.4	+	46.7	F	-	-	-	-
<i>Penicillium</i> spp.	1.0	+	42.7	F	-	-	-	-
<i>Chaetomium</i> spp.	0.3	+	13.3	O	-	-	-	-
<i>Rhizopus</i> spp.	0.2	+	6.7	O	-	-	-	-
Sterile fungi (black)	0.5	+	17.3	O	0.6	+	16.0	O
<i>Champignons stériles (noirs)</i>								

Category (Categ) of abundance (%)**Catégorie d'abondance (%) :**

Most abundant / Très abondant (> 10 %) = +++

Abundant / Abondant (5.1 - 10 %) = ++

Less abundant / Moins abondant (0-5 %) = +

Forms are not observed (-) / Aucune forme observée (-).

Frequency (%) / Fréquence (%) :

Dominant (81-100 %) = D

++ Common / Courant (61-80 %) = C

Frequent / Fréquent (41-60 %) = F

Occasional / Occasionnel (0-40 %) = O

The pooled data of 3 observations revealed that the oil cakes reduced the population of harmful microflora to an extent of 46.6–59.0 % and saprophytic microflora from 40.6–50.0 % while Furadan declined the population of harmful microflora from 39.9–41.1 % and saprophytic microflora by 100 % over the control (Table II) in both the habitats. The neem oil cake contains compounds such as nimbidin, thionemone, phenolics, *etc.* (Alam, 1993), niger oil cake has compounds like oleic acid, linoleic acid, ferric oxide, calcium oxide, *etc.* (Hegde and Babu, 2004) and presence of active ingredient in Furadan *i.e.* Carbofuran (2,3-dihydro-2,2 dimethyl benzo-fluran-7 YI methyl carbamate) may be toxic to the harmful and saprophytic microbes. The results are in agreement with the findings of various workers who used oil cakes and Furadan in successful management of certain soil borne diseases in mulberry (Govindaiah *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 2003) and in other crops (Alam, 1993). Dithane M-45 affected the population of beneficial (50.5–54.5 %), harmful (64.4–66.1 %) and saprophytic (100 %) microflora significantly over the control (Table II). Dithane M-45 belongs to non-systemic group of fungicides having Mancozeb 75 % as an active ingredient, which is in the form of a complex of Zinc ion (2 %), Manganese (16 %) and Ethylene-1, 2-bisdithiocarbamate polymer (62 %) that inhibits the activity of pathogens by dissolving the vital compounds present in the cells of the pathogens and other microbes. Perusal of literature revealed that Mancozeb at higher concentrations (more than 0.1 %) was not compatible with various bioagents (Sharma *et al.*, 1999) while it was reported to be effective against many diseases in various agricultural and horticultural crops including mulberry (Philip *et al.*, 1994; Handa, 1999; Trivedi, 2001; Rangaswami and Mahadevan, 1999; Sharma *et al.*, 2003). It was interesting to note that after 10 and 20 days of Dithane M-45 application, the beneficial microflora declined very fast while on 30th day, the reduction was marginal (non significant over the control) in both the habitats (Table II) indicating that the application of bioagent should be after 30 days of Dithane M-45 application while formulating the Integrated Disease Management (IDM) package.

Abundance and frequency of microflora:

Based on the percentage of abundance, the microflora related to beneficial, harmful and saprophytic groups, were categorized as the most abundant (>10 %), abundant (5.1–10 %) and less abundant (0–5 %). Similarly, based on the frequency (%), these microflora were categorized as dominant (81–100 %), common (61–80 %), frequent (41–60 %) and occasional (0–40 %). The forms belonging to beneficial group viz., *Azotobacter* spp., *B. subtilis*, *T. harzianum* and *P. fluorescens* were found to be the most abundant and dominant (Table III), contributing towards growth in mulberry through microbial transformation of many complex plant nutrients into simpler and available forms. *T. harzianum* is used for the control of root rot and nursery diseases of mulberry (Sharma *et al.*, 2003) and species of *Azotobacter*, *B. subtilis* and *P. fluorescens* are utilized as growth promoters to induce the systemic resistance in various plants including mulberry (Pal and Jalali, 1998; Gupta and Sharma, 2004). The abundant and dominant forms were *F. solani*, *F. oxysporum*, *Xanthomonas* spp. and *Pseudomonas* spp. (harmful group) *F. solani* and *F. oxysporum* cause the root rot and wilt diseases in many crops including mulberry while species of *Pseudomonas* and *Xanthomonas* cause various types of diseases viz., stem canker, wilt, *etc.* in certain crops (Rangaswami and Mahadevan, 1999; Sharma *et al.*, 2003). However, *Streptomyces* spp., *Azospirillum* spp., *Verticillium chlamydosporium*, *T. viride*, *Aspergillus awamori* and *Nocardia* spp. (beneficial group) and species of *Aspergillus* and *Penicillium* (saprophytic group) were found to occur as less abundant and common/frequent. These microbes are known for the production of various antibiotic substances (Rao, 1999), which protect the plant roots from pathogens. The forms like *F. equiseti*, *F. moniliforme*, *Alternaria alternata*, *Helminthosporium* spp., *Phoma* spp (harmful group), *Chaetomium* spp., *Rhizopus* spp. and Sterile fungi (saprophytic group) were less abundant falling in frequent to occasional categories (Table III).

CONCLUSION

The present study has indicated that a great number of beneficial and pathogenic as well as saprophytic microflora co-exist in the rhizosphere and rhizoplane habitats of mulberry thus balancing the population in the ecosystem. Some of them are highly beneficial for optimum growth of mulberry. Further, it is also found that oil cakes and pesticides have differential effect on the various types of microflora in both the habitats. Except Dithane M-45, the oil cakes (neem and niger) and Furadan maintain the beneficial microflora in recommended doses as that of the control (non treated) and hence, the recommended doses can be safely used. In case of severe infection where Dithane M-45 needs to be used under Integrated Disease Management (IDM) package, the application of bioagents should be done after 30 days of its application.

REFERENCES

- ALAM M. M. (1993) Bioactivity against phytonematodes. In *Neem research and development*, RANDHAWA N. S. & PARMAR B. S. (Eds.), pp.123-143, Society of Pesticide Science, India (Publication no. 3).
- BARNETT H. L. & HUNTER B. B. (1999) Illustrated genera of imperfect fungi. APS Press, Minnesota, USA, pp. 1-218.
- BOLTON H. JR., FREDRICKSON J. K. & ELLIOT L. F. (1993) Microbial ecology of rhizosphere. In: *Soil Microbial Ecology*. METTINGM F. B. Jr. (Ed.), pp. 27-63, USA.
- BOOTH, C. (1971) The genus *Fusarium*. Common Wealth Mycological Institute, Kew, Surrey, U. K., pp. 1-237.
- DAS P. K., MANIVANNAN V. S., BHOGESH K. & MADHAVARAO Y. R. (1998) Studies on microbial decomposition of sericultural wastes. In: *New trends in microbial ecology*, RAI, B. & DKHAR M. S. (eds.), Department of Botany, North East Hill University Shilong and International Society for Conservation of Natural Resources, Varnasi, India, pp. 68-75.
- DAVIES K. G., DE LEIJ F. A. A. M. & KERRY B. R. (1991) TPM special review No. 4. Microbial agent for the biological control of plant parasitic nematodes in tropical agriculture. *Tropical Pest Management*, 37: 303-320.
- DOMSCH K. H., GAMS W. & ANDERSON T. H. (1980) Compendium of soil fungi. Academic Press, London, pp. 1-405.
- GANESAN T. & KUMARI D. L. (1991) Beneficial changes in fungal flora in fungicide treated soil. *Indian Phytopath.*, 44:126-128.
- GOSWAMI B. K. & BHATTACHARYA D D. (1989) Efficacy of neem and groundnut oil cakes as influenced by microorganisms: changes in rhizosphere mycoflora during the decomposition of oil cakes in sterilized and unsterilized soil. *Indian J. Nematol.*, 19:72-74.
- GOVINDAIAH, SHARMA D. D., HIMANTHARAJ M. T. & BAJPAI A. K. (1997) Nematicidal efficacy of organic manures, intercrops, mulches and nematicide against root knot nematode in mulberry. *Indian J. Nematol.*, 27: 28-35.
- GUPTA V. P. & SHARMA D. D. (2004) Induction of systemic resistance in mulberry against leaf spot and leaf rust diseases by utilization of plant growth-promoting rhizobacteria. In: *Annual Report (2003-2004)*, pp. 34-35, Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India.
- HANDA S. K. (1999) Principles of Pesticide Chemistry. Agribios, Jodhpur, India.
- HEGDE D. M. & BABU S. N. S. (2004) Niger. In Text book of field crops production. PRASAD R. (Ed.), Directorate of information and publication of agriculture, Indian Council of Agriculture Research, New Delhi, India, pp. 604-620
- HILTNER L. (1904) Über neue Efrahrungen und probleme auf dem Gebit de Boden Bacteriologie und uater besondere Beruck – Schigung der Girundumngunj under Branche. *Arbdtdeh. Landev. Ges.*, 98: 59-78.

- KHALIS N. & MANOHARCHARY C. (1985) Studies on the mycoflora changes in oil cake amended and unamended soils. *Indian Phytopath.* 38: 462-466.
- KRIEG N. R. (1984) *Bergey's manual of systemic bacteriology* (Vol.1). The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Maryland, pp. 1-964.
- NAIK V. N. (2006) Interaction of *Meloidogyne incognita* with soilborne fungal pathogens and their management in mulberry (*Morus* spp.). Ph. D. Thesis, Mysore University, Mysore, India.
- PAL V. & JALALI I. (1998) Rhizosphere bacteria for biocontrol of plant diseases. *Indian J. Microbiol.*, 38: 187-204.
- PAUL A., BABU S. P. S. & SUKUL N. C. (1995) Effect of nematode infected mulberry plants on the growth and silk production of *Bombyx mori* L. *Indian J. Seric.* 34:18-21.
- PANDEY K. K. & UPHADHYAY J. P. (2000) Microbial population from rhizosphere and non-rhizosphere soil of Pigeon pea: screening for resident antagonist and mode of mycoparasitism. *J. Mycol. Pl. Patho.* 30: 7-10.
- PHILIP T., GOVINDAIAH, BAJPAI A. K. & DATTA R. K. (1994) Chemical control of mulberry diseases in India – A review. *Indian J. Seric.* 33: 1-5.
- RANGASWAMI G. & MAHADEVAN A. (1999) *Diseases of Crop Plants in India* (4th eds.), Prentice Hall of India, Pvt., New Delhi.
- RAO N. S. S. (1999) *Soil Microbiology* (4th edition). Oxford and IBH publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi, India, pp. 277-291.
- SENGUPTA K., KUMAR P., BAIG M. & Govindaiah (1990) *Handbook on Pest and Disease Control of Mulberry and Silkworm*. United Nations, Economic and Social Commission for Asia and Pacific, Bangkok, Thailand, pp. 3-15.
- SHARMA D. D. (1989) Distribution of antifungal actinomycetes in soils. *Indian J. Microbiol.* 29: 169-171.
- SHARMA D. D., GUPTA V. P. & CHANDRASHEKAR D. S. (1999) Compatibility of certain biocontrol agents with chemical pesticides & fertilizers. *Indian J. Seric.*, 38:79-82.
- SHARMA D. D., NAIK V. N., CHOWDARY N. B. & MALA V. R. (2003) Soilborne diseases of mulberry and their management –A review. *Int. J. Indust. Entomol.* 7: 93-106.
- SHARMA D. D. (2005) Collection of diseased samples - culturing, isolation, preservation, calibration, identification and pathogenicity of mulberry pathogens. In: *A text Book on Mulberry Crop Protection*. Govindaiah, Gupta V. P., Sharma, D. D., Rajadurai, S. and Naik V. N. (Eds.), Central Silk Board (Ministry of Textiles-Government of India) Madivala, Bangalore, India, pp. 23-35
- SHIRLING E. B. & GOTTLIEB D. (1966) Methods of characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 22: 264-394.
- SHREE M.P. & BORAI AH G. (1987) Studies on the rhizosphere and rhizoplane mycoflora of *Morus indica* L. *Sericologia*, 27: 661-670.
- SINGH R. & SAXENA V. C. (1991) Wilt of cauliflower rhizosphere and rhizoplane studies, *Int. J. Tropical Plant Diseases*, 9: 71-81.
- SRIDAR R., REGUPATHY A. & RANGANATHAN K. (1995) Mycotonic effect of Carbofuran on *Trichoderma viride*. *J. Biol. Control*, 9: 65-66
- SUDHAKAR P., CHATTOPADHYAY G. N., GANGWAR S. K., GHOSH J. K. & SARATCHANDRA B. (1999) Variation in the population of nitrogen fixers and other microflora in the phylloplane and rhizosphere of mulberry (*Morus alba* L.) as influenced by shoot age and season. *Sericologia*, 39: 617-623.
- SUDHAKAR P., CHATTOPADHYAY G. N. & GANGWAR S. (2000) Effect of common pesticides on nitrogen fixing bacteria of mulberry (*Morus alba* L.). *Indian J. Agric.* 34: 211-216.
- TRIVEDI P. C. (2001) *Plant pathology*. Pointer Publishers, Jaipur, India, pp. 130-164.
- TU C.M. (1970) Effect of four organophosphorous insecticides on microbial activities in soil. *Appl. Microbiol.* 19: 479-484.
- WAKSMAN S. A. (1927) *Principles of soil microbiology*. The Williams and Wilkins Co.,

EFFET DES TOURTEAUX ET DES PESTICIDES SUR LES MICROFLORES DE LA RHIZOSPHERE ET DU RHIZOPLANE CHEZ LE MURIER (*MORUS* SPP.)

D. D. SHARMA, DIVIA BABY*, V. NISHITA NAIK & V. R. MALA

Central Sericulture Research and Training Institute, Mysore – 570008, Inde.

Nous avons réalisé une expérience sur le terrain selon une conception aléatoire en blocs avec 4 traitements et un témoin pour connaître l'effet des doses recommandées de tourteaux, [obtenus à partir de graines de margousier (*Azadirachta indica* L.), après l'extraction de l'huile, et de niger (*Guizotia abyssinica* L.)] et des pesticides [Dithane M-45 (Mancozeb 75 % WP) et Furadan (Carbofuran 3 G)], utilisés pour lutter contre les maladies originaires du sol chez le mûrier, sur les microflores de la rhizosphère et du rhizoplane. Les données regroupées à partir de 3 observations (10, 20 et 30 jours après les applications) indiquent que la population bactérienne est maximum en termes d'unités formant colonies (CFU/g), suivie par les champignons et les actinomycètes dans les deux habitats. Cette microflore est significativement plus élevée dans la rhizosphère par comparaison au rhizoplane. En tout, on isole respectivement 27 (18 champignons, 7 bactéries et 2 actinomycètes) et 21 formes de microflores (12 champignons, 7 bactéries et 2 actinomycètes) respectivement dans les habitats de la rhizosphère et du rhizoplane du mûrier. D'après leur comportement, on classe les microflores en 3 catégories, c'est-à-dire bénéfiques, nuisibles et saprophytes. L'effet des tourteaux et des pesticides sur les microflores de la rhizosphère et du rhizoplane montre que les tourteaux de niger et de margousier et les produits chimiques en l'occurrence le Furadan (Nématicide) n'ont pas d'effet sur les microflores bénéfiques, mais diminuent significativement les microflores nuisibles et saprophytes dans les deux habitats. Tandis que, le Dithane M-45 diminue significativement les microflores bénéfiques, nuisibles et saprophytes à la fois dans les sols de la rhizosphère et du rhizoplane, par comparaison au témoin. Les formes les plus abondantes et les plus dominantes sont *Azotobacter* spp., *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* et *Pseudomonas fluorescens* (groupe bénéfique), que l'on trouve en abondance et fréquemment, tandis que *Fusarium solani*, *F. oxysporum* et *Xanthomonas* spp., qui appartiennent au groupe nuisible, s'avèrent abondantes et fréquentes. Cependant, parmi le groupe saprophyte, on observe que toutes les formes sont moins abondantes et occasionnelles dans tous les sols à la fois traité et non traité (témoin) des habitats de la rhizosphère et du rhizoplane.

INTRODUCTION

Le mûrier (*Morus* spp.), la seule plante hôte du ver à soie (*Bombyx mori* L.) est une culture pérenne intensément cultivée pour sa feuille, que l'on ramasse plusieurs fois au cours de 5 récoltes / an, ce qui favorise la survie, la multiplication et l'accumulation d'inoculum de certains pathogènes véhiculés par le sol provoquant différentes maladies. Parmi les maladies, la maladie du nématode de la racine (*Meloidogyne incognita*), de la pourriture de la racine (*Fusarium solani* / *F. oxysporum* / *Botryodiplodia theobromae*), le complexe de la maladie de la racine (association de *M. incognita* et des pathogènes fongiques de la pourriture de la racine) et les maladies de pépinière [pourriture des boutures (*F. solani*) et le chancre de la tige (*B. theobromae*)] représentent une menace sérieuse pour les récoltes de mûrier, en provoquant une perte de rendement foliaire jusqu'à 20 %, tout en détériorant

* St. Xavier's College for women, Aluva, Kerala (Inde).

la qualité de la feuille (Sengupta et coll., 1990 ; Sharma et coll., 2003 ; Naik, 2006). On a recommandé l'application de tourteau de margousier dans le sol au taux de 2 t / ha / an ou de Furadan (40 kg / ha / an), en 4 doses séparées, pour lutter contre la maladie du nématode de la racine chez le mûrier et le Dithane M-45 (Mancozeb 75 % WP), au taux de 10 g / plant, dans la lutte contre la maladie du nématode de la racine et les maladies de pépinière (Sengupta et coll., 1990 ; Govindaiah et coll., 1997 ; Sharma et coll., 2003). On a recommandé le tourteau de niger, au taux de 2 t / ha / an en 4 doses, pour lutter contre le complexe de la maladie de la racine (Naik, 2006). L'étude des microflores, avec une référence spéciale à leur nature bénéfique / pathogène dans les habitats de la rhizosphère et du rhizoplane chez le mûrier, pourrait permettre de formuler une stratégie de lutte efficace contre les maladies véhiculées par le sol. L'application de pesticides tue les pathogènes mais affecte les microflores bénéfiques du sol (Ganesan et Kumari, 1991 ; Davies et coll., 1991 ; Paul et coll., 1995). De nombreux chercheurs ont étudié les microflores de la rhizosphère et du rhizoplane en relation avec la croissance et l'âge des plants de mûrier (Shree et Boraiah, 1987 ; Sudhakar et coll., 1999). Sudhakar et coll., (2000) ont signalé que la population de bactéries fixant l'azote dans la rhizosphère du mûrier est très affectée par l'application de Carbendazim à 50 % WP dans le sol.

Jusqu'à présent, on n'a pas essayé d'étudier l'effet de l'application de tourteaux et de pesticides sur les microflores bénéfiques dans les sols de la rhizosphère et du rhizoplane du mûrier. Nous avons donc entrepris cette étude pour connaître la distribution, l'effet, l'abondance et la fréquence des microflores bénéfiques / néfastes / saprophytes dans la rhizosphère et le rhizoplane, après l'application des doses recommandées de tourteaux (margousier et niger) et de pesticides (Furadan 3 G et Dithane M-45), utilisés dans la lutte contre des maladies variées véhiculées par le sol chez le mûrier.

MATERIELS ET METHODES

Nous avons réalisé l'expérience avec une plantation de mûriers (K2) établie, infestée par *M. incognita* (provoquant la maladie du nématode de la racine) et par *F. solani* et *F. oxysporum* (provoquant la pourriture de la racine). L'essai est réalisé selon une conception aléatoire en Blocs (RBD), sur une surface de 300 m², avec 5 traitements et 3 répétitions. Le sol est du terreau sablonneux rouge (sable - 74,8 % ; limon - 17,2 % et argile - 8 %) avec un pH compris entre 6,5 et 6,8, du charbon organique entre 0,18 et 0,23 %, 0,40 à 0,68 % d'azote, 46,4 kg / ha de phosphore et 260,2 kg / ha de potasse. On divise la parcelle en 15 sous-parcelles (de 20m² chacune) contenant chacune 52 plants. Pour minimiser l'interférence entre les parcelles, on élève des digues entre chaque sous-parcelle. Les différents traitements sont :

- T-0** : Témoin (sans aucun traitement)
- T-1** : Tourteau de margousier au taux de 500 kg / ha / dose
- T-2** : Tourteau de niger au taux de 500 kg / ha / dose
- T-3** : Furadan (Carbofuran 3 G ; au taux de 10 kg / ha / dose)
- T-4** : Dithane M-45 (Mancozeb 75 % WP ; au taux de 10 g / plant)

On applique les tourteaux de margousier et de niger au taux de 500 kg / ha / dose (2 t / ha / an, en 4 doses) et de Furadan au taux de 10 kg / ha / dose (40 kg / ha / an, en 4 doses) au cours des opérations interculturelles, en les répartissant autour de la plante et en les mélangeant bien dans le sol en labourant, puis on procède à une irrigation. On applique le Dithane M-45 au taux de 10 g / plant, après avoir exposé le système racinaire (15 à 20 cm de profondeur).

Isolement des microbes :

On collecte les échantillons de sol pour l'isolement des microbes, tels que les champignons, les bactéries et les actinomycètes dans les habitats de la rhizosphère et du rhizoplane, dans des sacs en polyéthylène stériles 10, 20 et 30 jours après l'application, pour 10 plants sélectionnés au hasard. On

mélange ensemble les échantillons de sol, provenant de toutes les répétitions de chaque traitement, pour former un échantillon composite pour l'isolement des microbes par la technique de dilution sur plaques (Waksman, 1927). On suspend 10 g de sol séché à l'air, réduit en poudre et tamisé dans 100 ml d'eau distillée stérile, dans un flacon Erlenmeyer de 250 ml. On mélange un ml de surnageant dans 9 ml d'eau distillée stérile et on répète cela pour obtenir une dilution finale de 1 : 10 000. On prépare trois milieux de culture différents, c'est-à-dire de l'agar de dextrose de pomme de terre, de l'agar agar et de l'agar d'Actinomycète pour l'isolement des champignons, des bactéries et des actinomycètes, respectivement à partir des échantillons de sol recueillis. On mélange 5 ml de dilution finale d'échantillon de rhizosphère et de rhizoplane de chaque traitement avec 100 ml de milieu tiède et on le verse dans des boîtes de petri au taux de 20 ml / boîte. On conserve les boîtes de Petri inoculées pour l'incubation à $28 \pm 2^\circ \text{C}$ pendant 7 jours pour les champignons et les actinomycètes, tandis que pour les bactéries, on incube les plaques à 30°C pendant 2 à 3 jours. Après l'incubation, on enregistre les colonies des différentes microflore (champignons, bactéries et actinomycètes) et on calcule la population en termes d'unités formant colonies CFU / g de sol en utilisant la formule suivante (Sharma, 2005).

$$\text{CFU / g} = \frac{A \times B \times C}{D}$$

où,

A : Nombre moyen de colonies s'étant développées

B : Dilution finale

C : Volume d'eau utilisé pour la suspension de l'échantillon

D : Poids de l'échantillon de sol

Identification des microbes :

On observe visuellement toutes les colonies des différents champignons, bactéries et actinomycètes qui se sont développées sur la surface agar dans les différentes boîtes de Petri et plus tard sous un microscope à contraste de phase. Lors de l'examen visuel, les formes apparaissent comme une croissance solide pelucheuse sur le milieu, ce qui indique la présence de champignons, tandis qu'une croissance aqueuse indique la présence de bactéries. Cependant, les actinomycètes apparaissent sur le milieu comme une colonie brillante sous la forme de pustules (comme des perles) de différentes couleurs, telles que blanc, gris, blanc laiteux etc.. On identifie les champignons d'après leurs caractères morphologiques et reproducteurs, en les comparant avec ceux des groupes de champignons reconnus publiés dans des monographies (Booth, 1971 ; Domsch et coll., 1980 ; Barnett et Hunter, 1999). On identifie les bactéries sur la base de la réaction gram comme l'a décrit Bergey dans son manuel de bactériologie déterminative (Krieg, 1984). On identifie les actinomycètes sur la base des caractères des colonies et du sporophore (rectus, flexibles, retinaculum apertum et spira) sur le milieu agar (Shirling et Bottlieb, 1966).

Classement des microflore en catégories :

Après l'isolement et l'identification des microflore des habitats de la rhizosphère et du rhizoplane, on les classe par catégories, d'après leur comportement, en trois groupes c'est-à-dire, bénéfiques, nuisibles et saprophytes (Pal et Jalali, 1998). On calcule le pourcentage d'abondance et la fréquence des formes variées de microflore en utilisant les formules suivantes (Sharma, 2005).

$$\text{Abondance (\%)} = \frac{\text{Population moyenne sous forme individuelle dans toutes les répétitions}}{\text{Moyenne de la population microbienne totale dans toutes les répétitions}} \times 100$$

$$\text{Fréquence (\%)} = \frac{\text{Nbre de répétitions dans lesquelles une forme individuelle apparaît}}{\text{Nbre total de répétitions}} \times 100$$

D'après le % d'abondance, on classe les microflores dans les catégories très abondantes, abondantes et moins abondantes (Singh et Saxena, 1991) et sur la base de la fréquence, comme dominantes, courantes, fréquentes et occasionnelles (Das et coll., 1998).

Analyse statistique :

Les données regroupées sur la distribution des microflores dans les habitats de la rhizosphère et du rhizoplane et sur l'effet des tourteaux et des pesticides sur les microflores bénéfiques / nuisibles / saprophytes sont soumises à une analyse de variance multifactorielle (ANOVA), afin d'étudier les principaux effets et les effets d'interaction entre les traitements en utilisant le logiciel statistique INDOSTAT. On procède aussi au test post-hoc d'après la LSD (différence la moins significative) pour la comparaison des moyennes.

RESULTATS ET DISCUSSION

Distribution des microflores :

Les données regroupées pour trois observations (10, 20 et 30 jours après les traitements) présentées dans le Tableau I indiquent que la population totale en termes d'unités de microflores formant colonies (CFU /g) (champignons, bactéries et actinomycètes) est plus élevée (au seuil de 5 %) dans l'habitat de la rhizosphère, par comparaison au rhizoplane. Cela pourrait être dû à la sécrétion d'exudats de la racine par la plante hôte, autour de la zone de la rhizosphère, ce qui influence le développement d'une population microbienne importante (Bolton et coll., 1993 ; Rao, 1999). De plus, la quantité de divers composés solubles comme les sucres, les acides organiques, les vitamines, les minéraux, etc... est plus élevée dans la zone de la rhizosphère du plant que dans le rhizoplane, en raison de l'exsudation de la racine (Bolton et coll., 1993 ; Pal et Jalali, 1998) qui sert de nourriture microbienne. Cela suggère que l'activité microbienne maximum se produit dans la zone de la rhizosphère.

Hiltner (1904) a pour la première fois remarqué la présence d'un nombre plus élevé de microbes dans les environs des racines (rhizosphère) et supposé que l'augmentation de l'activité microbienne pourrait être due à l'exsudation de la racine. Cela a aussi été confirmé par les résultats de Pandey et Uphadhyay (2000), qui ont observé une population microbienne plus importante dans le sol de la rhizosphère du pois d'angle et Shree et Boraiah (1987) chez le mûrier.

Parmi les diverses formes microbiennes des sols de la rhizosphère et du rhizoplane, le pourcentage maximum de colonies sont les bactéries (23 à 35,8 %), suivies par les champignons (21,9 à 32,7 %) et les actinomycètes (3,5 à 4,7 %) (Tableau I), ce qui indique que les formes bactériennes sont plus activement prononcées et compétitives par comparaison aux champignons et aux actinomycètes, à la fois dans les zones de la rhizosphère et du rhizoplane. La population moins importante d'actinomycètes dans les deux habitats pourrait être due à la présence d'un faible contenu organique et au pH faible (en dessous de 7) du sol. Ces résultats sont en accord avec les observations de Sharma (1989) qui a observé un nombre maximum d'actinomycètes dans un sol riche en matière organique (charbon 0,30 à 0,38 % ; azote 0,76 à 0,92 %) et dans un sol légèrement alcalin (pH 7,5 à 7,8). Il a aussi observé que les pH du sol supérieurs à 7,8 et inférieurs à 7, avec un faible contenu organique ne sont pas propices à la survie des actinomycètes.

Effet des tourteaux et des pesticides :

On isole vingt sept formes de microflores (18 champignons, 7 bactéries et 2 actinomycètes) dans le sol de la rhizosphère et 21 formes dans le sol du rhizoplane (12 champignons, 7 bactéries et 2 actinomycètes). Les 6 formes qui sont absentes du sol du rhizoplane, mais présentes dans le sol de la

rhizosphère sont *Alternaria alternata* et *Helminthosporium* spp. du groupe nuisible, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium* spp., *Chaetomium* spp. et *Rhizopus* spp. du groupe saprophyte. Le classement des microflore en catégories, d'après leur comportement, c'est-à-dire bénéfiques, nuisibles et saprophytes est présenté dans le Tableau III.

L'effet des tourteaux et des pesticides sur les microflore de la rhizosphère et du rhizoplane révèle que les tourteaux (de margousier et de niger) et le Furadan maintiennent la population de microflore bénéfiques au même niveau que chez le témoin (sol non traité) dans les deux habitats et il n'y a pas de différence significative dans la population (Tableau II), ce qui suggère qu'ils n'ont pas d'effet négatif sur les microflore bénéfiques du sol. Les résultats sont conformes aux observations de différents chercheurs qui ont rapporté que le sol amendé avec des tourteaux entraîne l'accroissement des colonies de *Trichoderma* et d'autres microbes antagonistes grâce à des facteurs contenus dans les tourteaux, qui améliorent la fertilité (Khalis et Monoharachary, 1985 ; Goswami et Bhattacharya, 1989). Sridar et coll., (1995) et Sharma et coll., (1999) ont rapporté que la plupart des microbes antagonistes sont compatibles avec le carbofuran et les tourteaux. Tu (1970) a signalé que *Trichoderma* et d'autres agents de lutte biologique deviennent dominants dans du sol traité au Carbofuran. D'autre part, ces tourteaux et le Furadan stoppent significativement la population de microflore nuisibles et saprophytes par rapport au témoin, 10, 20 et 30 jours après leur application dans les deux habitats. On observe une diminution très rapide de ces microbes 20 jours après l'application.

Les données regroupées à partir de 3 observations révèlent que les tourteaux réduisent la population de microflore nuisibles entre 46,6 et 59 % et les microflore saprophytes entre 40,6 à 50 %, tandis que le Furadan diminue la population des microflore nuisibles entre 39,9 et 41,1 % et les microflore saprophytes de 100 % par rapport au témoin (Tableau II) dans les deux habitats. Le tourteau de margousier contient des composés tels que le nimbidine, le thionémone, les phénols, etc... (Alam, 1993), le tourteau de niger a des composés comme l'acide oléique, l'acide linoléique, l'oxyde de fer, l'oxyde de calcium, etc.. (Hegde et Babu, 2004) et il existe dans le Furadan la présence d'un ingrédient actif, c'est-à-dire le Carbofuran (2,3-dihydro-2,2 diméthyl benzofuran-7 Yl méthyle carbamate) qui pourrait être toxique pour les microbes nuisibles et saprophytes. Les résultats confirment les observations de différents chercheurs qui ont utilisé des tourteaux de margousier et le Furadan pour lutter avec succès contre certaines maladies véhiculées par le sol chez le mûrier (Govindaiah et coll., 1997 ; Sharma et coll., 1997 ; Sharma et coll., 2003) et chez d'autres cultures (Alam, 1993).

Le Dithane M-45 affecte la population de microflore bénéfiques (50,5 à 54,5 %), nuisibles (64,4 à 66,1 %) et saprophytes (100 %) de manière significative par rapport au témoin (Tableau II). Le Dithane M-45 appartient au groupe de fongicides non systémiques qui a le Mancozeb 75 % comme ingrédient actif, qui se présente sous la forme d'un complexe de l'ion Zinc (2 %), de manganèse (16 %) et du polymère éthylène-1, 2-bisdithiocarbamate (62 %), qui inhibe l'activité des pathogènes, en dissolvant les composés vitaux présents dans les cellules des pathogènes et des autres microbes. L'observation de la littérature révèle que le Mancozeb, à des concentrations plus élevées (plus de 0,1 %), n'est pas compatible avec des agents biologiques divers (Sharma et coll., 1999), tandis qu'on a signalé qu'il est efficace contre de nombreuses maladies chez diverses cultures agricoles et horticoles y compris le mûrier (Philip et coll., 1994 ; Handa, 1999 ; Trivedi, 2001 ; Rangaswami et Mahadevan, 1999 ; Sharma et coll., 2003). Il est intéressant de noter qu'au bout de 10 et 20 jours d'application de Dithane M-45, les microflore bénéfiques baissent très rapidement, tandis que le 30^{ème} jour, la diminution est marginale (non significative par rapport au témoin) dans les deux habitats (Tableau II), ce qui indique que l'application d'agents biologiques devrait se faire 30 jours après l'application de Dithane M-45 lors de la mise au point du système de Lutte Intégrée contre les Maladies (IDM).

Abondance et fréquence des microflores :

D'après le pourcentage d'abondance, on classe les microflores liées aux groupes bénéfiques, nuisibles et saprophytes dans les catégories très abondantes (> 10 %), abondantes (5,1 à 10 %) et moins abondantes (0 à 5 %). De même, d'après la fréquence (%), on classe ces microflores dans les catégories dominantes (81 à 100 %), courantes (61 à 80 %), fréquentes (41 à 60 %) et occasionnelles (0 à 40 %). Les formes appartenant au groupe bénéfique, c'est-à-dire *Azotobacter* spp., *B. subtilis*, *T. harzianum* et *P. fluorescens* s'avèrent les plus abondantes et dominantes (Tableau III), en contribuant à la croissance du mûrier par la transformation microbienne de nombreux nutriments complexes des plantes en formes plus simples et disponibles. On utilise *T. harzianum* pour la lutte contre la pourriture de la racine et contre les maladies de pépinière du mûrier (Sharma et coll., 2003) et les espèces d'*Azotobacter*, de *B. subtilis* et de *P. fluorescens* comme promoteurs de croissance pour induire la résistance systémique chez des plantes variées y compris le mûrier (Pal et Jalali, 1998 ; Gupta et Sharma, 2004). Les formes abondantes et dominantes sont *F. solani*, *F. oxysporum*, *Xanthomonas* spp. et *Pseudomonas* spp. (groupe nuisible). *F. solani* et *F. oxysporum* provoquent la pourriture de la racine et les maladies de la flétrissure chez de nombreuses cultures y compris chez le mûrier, tandis que les espèces de *Pseudomonas* et de *Xanthomonas* provoquent des types variés de maladies comme le chancre de la tige, la flétrissure etc. chez certaines cultures (Rangaswami et Mahadevan, 1999 ; Sharma et coll., 2003). Cependant, *Streptomyces* spp., *Azospirillum* spp., *Verticillium chlamydosporium*, *T. viride*, *Aspergillus awamori* et *Nocardia* spp. (groupe bénéfique) et les espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* (groupe saprophyte) sont moins abondantes et moins courantes / fréquentes. Ces microbes sont connus pour la production de différentes substances antibiotiques (Rao, 1999), qui protègent les racines des plantes des pathogènes. Les formes comme *F. equiseti*, *F. moniliforme*, *Alternaria alternate*, *Helminthosporium* spp., *Phoma* spp. (groupe nuisible), *Chaetomium* spp., *Rhizopus* spp. et les champignons stériles (groupe saprophyte) sont moins abondantes et se classent dans les catégories fréquentes à occasionnelles (Tableau III).

CONCLUSION

Cette étude indique qu'un grand nombre de microflores bénéfiques et pathogènes ainsi que saprophytes coexistent dans les habitats de la rhizosphère et du rhizoplane du mûrier, ce qui équilibre la population dans l'écosystème. Certaines sont très bénéfiques pour une croissance optimum du mûrier. De plus, il s'avère que les tourteaux et les pesticides ont un effet différentiel sur les différents types de microflores dans les deux habitats. A l'exception du Dithane M-45, les tourteaux (margousier et niger) et le Furadan maintiennent les microflores bénéfiques aux doses recommandées, égales à celles du témoin (non traité) et on peut donc utiliser sans risque, les doses recommandées. Dans le cas d'une infestation sévère, où on a besoin d'utiliser le Dithane M-45 dans le cadre du Système de Gestion Intégrée de lutte contre les Maladies (IDM), il faut procéder à l'application des agents biologiques 30 jours après son application.

PATTERNING DEFECTS IN SILKWORM EMBRYOS ANALYSED THROUGH CUTICLE PREPARATIONS

AMIT SINGH^{1,2,*}, MADHURI KANGO-SINGH³ & K. P. GOPINATHAN⁴

1. Department of Biology, University of Dayton, Dayton, OH.

2. Center for Tissue Regeneration and Engineering at Dayton (TREND), Dayton, OH.

3. Mercer University School of Medicine, Division of Basic Sciences, West 97, Box 173, 1550 College St., Macon, GA 31207.

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

*The mulberry silkworm, **Bombyx mori**, a holometabolous lepidopteran insect, has a metameric body plan. Due to its functional adaptation, **B. mori** presents some unique deviations in its pattern from the evolutionarily advanced dipteran insect, **Drosophila melanogaster**. Previous studies on mutant phenotype analysis in **B. mori** have been carried out in late stages of larval development. Here we employ, the cuticle preparation approach during embryonic development to study morphological landmarks associated with **B. mori**, Eri, another race of silkworm, and pattern defects associated with **Ekp** mutant of **B. mori**. The homeotic mutant **Ekp**, generates ectopic abdominal legs, a feature previously documented only during larval development. Using cuticle preparation approach the patterning defects of extra abdominal legs of **Ekp** mutation could be detected as early as 7.5 day old embryo. This approach can be exploited to study patterning defects in **B. mori** mutants affecting early development.*

Keywords: *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, developmental patterning, *Philosomia cynthia ricini*, cuticle preparation.

INTRODUCTION

The mulberry silkworm, *Bombyx mori*, with the availability of the complete genomic sequence information (Xia *et al.*, 2004) is developing into an excellent system to study the genetic and molecular aspects of patterning similar to the prototype model insect *Drosophila melanogaster*. Classical mutagenesis screens have revolutionized the *Drosophila* genetics by generating a number of mutants exhibiting patterning defects during embryonic development (Nusslein-Volhard *et al.*, 1984). In these studies, the cuticle preparation approach was employed to study pattern defects during embryonic development (Van der Meer, 1977). The rationale was that *Drosophila* embryo has a highly regular and reiterative pattern of cuticular processes, denticles, and naked cuticle on the ventral side of the embryo. Any pattern defect of denticles/ naked cuticle in the mutant background was assigned as the function of that gene. The extended embryonic development period of 10 days in *B. mori*, offers the opportunity to discretely analyse the different patterning events. However, cuticle preparations have not been employed so far in silkworm to study the patterning defects. Despite having a large repository of mutants, there is not enough information about the genes that are involved in early embryonic patterning as most of the mutant phenotypes have been studied only during late larval and pupal

* Corresponding Author: Amit Singh, mail: amit.singh@notes.udayton.edu Tel: 937-229-2894, Fax: 937-229-2021.

development. The study of these unique patterning landmarks in *B. mori* using cuticle preparation approach, thus, can be of great significance in understanding genetic basis of patterning in embryo.

We have presented here, the use of cuticle preparation technique to study embryonic patterning in *B. mori*. Comparisons have also been made on the cuticle phenotype of *B. mori* with other wild race like *Philosomia cynthia ricini* (Eri). Even though Eri belongs to the same order and shares common ancestry, they have segregated long ago from *B. mori*. We have also used a homeotic mutant, *Ekp* (member of E complex homeotic mutant of *B. mori*) that show transformation in the fate of segmental identity to demonstrate the utility of our approach. Earlier studies were able to focus on patterning defects in *Ekp* as well as other mutations only during late larval stages (Ueno *et al.*, 1992; 95). However, the present approach can shift the time window of pattern defect analysis to as early as embryogenesis. These cuticle markers can be exploited genetically or experimentally in discerning the roles of genetic loci involved in patterning of the silkworm embryo.

MATERIAL AND METHODS:

Eggs were collected from a synchronous culture maintained at 24°C. Various races used for these studies are: Domesticated strains of mulberry silkworm, Bivoltine strain NB4D2 of *B. mori*, (L) (*Bombycidae*), Eri silkworm, *Philosomia cynthia ricini* (Hutt: *Saturniidae*), a wild species reared on castor leaves (*Ricinus communis*). We also used a bivoltine *Ekp* mutant stock (*Ekp*, Y (yellow blood) and F (flesh cocoon) markers) to study the mutant phenotypes.

Cuticle Preparations:

Embryos were dechorionated following the protocol of Singh and Gopinathan (1997). The dechorionated embryos were rinsed in distilled water. The dechorionated eggs were boiled in 10% KOH for 10 min. and washed with water. The embryos were fixed in acetic acid: glycerol (4:1) for 24h, and were mounted in Hoyer's mountant (recipe in Van der Meer, 1997). Weights were applied on the cover slip to flatten the tissue. The preparations were incubated at 40°C for 2-3 days to allow the clearing of the tissue and were observed under dark field optics of Leica DMRBE Microscope.

RESULTS & DISCUSSIONS

Cuticle Pattern:

B. mori egg is a flattened sphere, 1.2 mm long, 0.95 mm wide and 0.63 mm thick, which gives rise to first instar larva after 10 days of embryonic development. A larval prototype is formed as early as 7.5 days of embryonic development in terms of external morphological landmarks (Tazima, 1978; Singh and Gopinathan, 1995; for review see Gopinathan *et al.*, 1998). *B. mori* larva has a metameric body plan comprising of head, thorax and abdomen (Fig. 1a). The head is chitinous in nature and bear the segments contributing to the mouthparts. The thorax has three segments viz., pro-, meso-, and meta-thorax each bearing a pair of thoracic legs on the ventral side (Fig. 1a). Abdomen is formed of eleven segments (last three are fused to form a single segment). Ventrally, the A3-A6 and A9 bear the abdominal legs or pseudopods (Fig. 1a). Abdominal legs are functional adaptation of silkworm, which are lost during the larval to pupal metamorphosis (Suzuki *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2007). The basic unit of pattern is a segment, which comprises of rows of cuticular bristles along the entire circumference and a naked cuticle. Unlike *Drosophila* where the pattern of bristles on the dorsal and ventral ectoderm is different, silkworm exhibits a regular bristle pattern on both dorsal and ventral surface.

In bivoltine stock NB4D2, the cuticle exhibits clusters of bristles arranged in horizontal rows interspersed with the naked cuticle all along the length of the body.

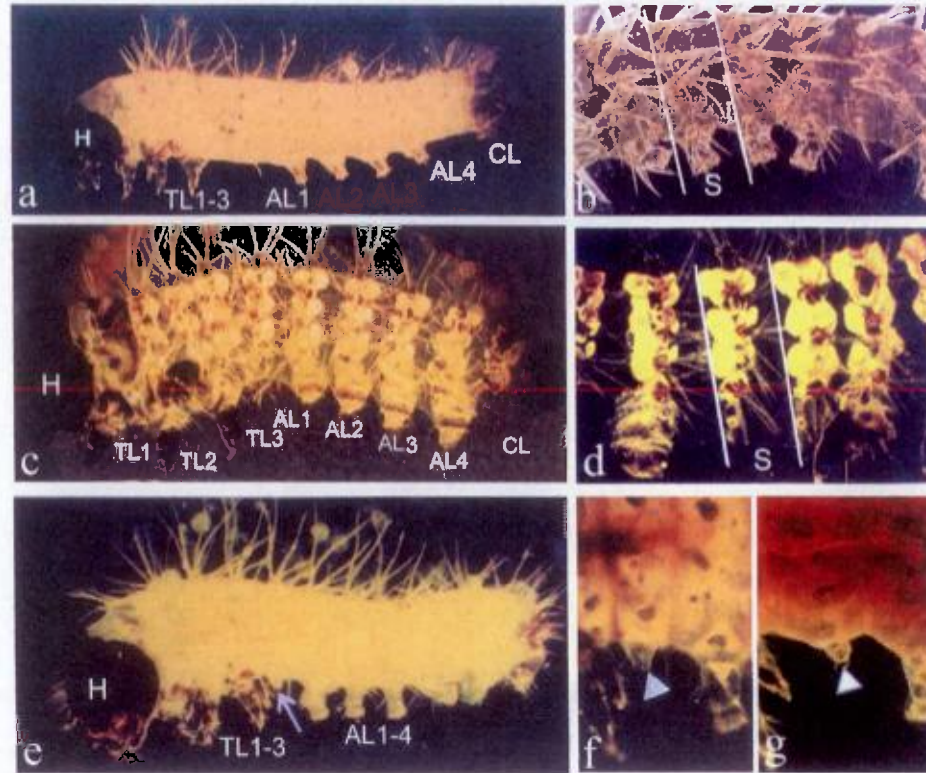


Fig. 1 Embryonic cuticular preparation exhibiting metameric body plan in a 7.5 day old embryo of (a) *B. mori* (NB4D2); (c) *P. ricini*.

Magnified view of cuticle preparations of 7.5 day old embryo of (b) *B. mori* strain (d) *P. ricini*, showing characteristic pattern of the arrangement of bristles and naked cuticle. (e-g) Cuticle phenotypes, in *Ekp* mutant embryo of *B. mori* (e) 7.5 day embryo showing an extra abdominal leg (arrow) in the A2 segment (f, g) magnified view of abdominal segment bearing extra leg (arrowhead).

(H; head; TL; thoracic leg; AL; abdominal leg; CL; caudal leg, S; segment).

Fig. 1. Préparation cuticulaire embryonnaire présentant le plan d'organisation métamérique chez un embryon de 7,5 jours de (a) *B. mori* (NB4D2) ; (c) de *P. ricini*.

Agrandissement des préparations de cuticule d'un embryon de 7,5 jours de la souche *B. mori* (b) de *P. ricini* (d) présentant un schéma caractéristique de disposition des soies et de la cuticule nue (e-g)

Phénotypes de la cuticule, chez l'embryon du mutant *Ekp* de *B. mori* (e) embryon de 7,5 jours présentant une patte abdominale supplémentaire (flèche) dans le segment A2 (f, g), agrandissement du segment abdominal présentant une patte supplémentaire (pointe de la flèche)

(H ; tête ; TL patte thoracique ; AL : patte abdominale ; CL : patte caudale ; S : segment)

The two bands of bristles are separated by a broad band of naked cuticle that is twice in width as compared to the band of bristles (Fig. 1a). Each cluster has 3-4 long serrated bristle like structures, which originate separately from basal cells (Fig. 1b).

Eri silkworm also presents a similar pattern of bristle rows with interspersed naked cuticle (Fig. 1c). However, there is difference in the number of bristles and their number in individual cluster. Each cluster has 4-5 serrated bristles originating from a common basal cell (Fig. 1d), which is a characteristic of Eri. The band of bristles has a characteristic pigmentation all along its width.

Ekp Mutant Phenotype:

The E complex mutants of *B. mori* are characterized by an ectopic leg appendage in the second abdominal (A2) segment (Fig. 1e). Abdominal legs of *B. mori* are functional adaptation and are lost during the larval to pupal metamorphosis (Suzuki *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2007). There is very low penetrance in extra leg phenotype of *Ekp* mutants. The embryonic mutant phenotype can be broadly classified into two types:

1. A small projection from the ventral surface of the A2 segment cuticle. These projections do not bear any distal siphon like cuticular projections as seen in the wild- type abdominal legs (Fig. 1f).
2. The A2 specific legs appearing as miniaturized version of A3. The projection in A2 segments bear rudimentary bristles at their tip and are half the size of the wild-type abdominal leg (Fig. 1g).

The present study clearly reveals that cuticle patterns are characteristic of every species of silkworm. Although Eri silkworm shares a common ancestry with *B. mori*, they have developed a few divergent characteristics over a period of time. The characteristic pattern of pigmentation in each segment in band of bristles in Eri is possibly a functional adaptation of larva to prevent itself from predators. The segmental arrangement in Eri is similar to NB4D2 but the pattern of bristles is dramatically different. The nature of the bristles is characteristic to the races. These studies reveal that despite sharing the common ancestry and being closely related, there is a characteristic cuticle pattern associated with different species of silkworm. These cuticle patterning elements can be exploited as identification characters and can also be used for early detection of the mutant phenotypes associated with the larval and adult structures.

Our studies with E complex mutants revealed that homeotic transformation of A2 to other abdominal segments (A2-A6) can be documented as early as 7.5 days of embryonic development. Interestingly, the mutation in E complex resulted in change of fate of A2 but it did not result in an identical wild-type abdominal leg. This indicated that homeotic transformation pathway and growth are not tightly coupled during development.

ACKNOWLEDGEMENT

Authors are thankful to CSRTI for providing the *Ekp* mutant stock used in this study. MKS is supported by a Mercer University Seed Grant. AS is supported by start up support from University of Dayton, grants from Ohio Cancer Research Associates and University of Dayton research council.

REFERENCES

- GOPINATHAN, K.P., JOY, O. & SINGH, A. (1998). Developmental aspects of mulberry and nonmulberry silkworm species: A comparative study. In *Genome Analysis in Eukaryotes: Developmental and Evolutionary Aspects* (eds. R.N. Chatterjee and L. Sanchez) Narosa Publication House, 65-97.
- KANGO-SINGH, M., SINGH, A., & GOPINATHAN, K.P. (2001) The wings of *Bombyx mori* develop from larval discs exhibiting an early differentiated state: a preliminary report. *J. BioSci.* 26(2): 167-177.
- SINGH, A. & GOPINATHAN, K.P. (1997). Analysis of gene expression during embryonic development in mulberry silkworm, *B. mori*. *Current Science* 72(3) 214-218.

- SINGH, A., KANGO-SINGH, M., PARTHASARATHY, R. & GOPINATHAN, K.P. (2007) Larval legs of mulberry silkworm *Bombyx mori* are prototypes for the adult legs. *Genesis* 45(4):169-76.
- SVACHA P. 1992. What are and what are not imaginal discs: reevaluation of some basic concepts (Insecta, Holometabola). *Dev. Biol.* 154: 101-117.
- UENO, K. HUI, C.-C., FUKUTA, M. & SUZUKI, Y. (1992). Molecular analysis of the deletion mutants in the E homeotic complex of the silkworm, *Bombyx mori*. *Development* 114: 555-563
- UENO, K. TOSHIFUMI, N., & SUZUKI, Y. (1995). Roles of homeotic genes in the *Bombyx* body plan. In "Molecular model Systems in the Lepidoptera" (eds. M.R. Goldsmith and AS Wilkins) Cambridge University Press, 165-180.
- TAZIMA Y. (1978). The silkworm: an important laboratory tool. Kodansha Ltd. Tokyo
- VAN DER MEER (1997). Optical clean and permanent whole mount preparation for phase contrast microscopy of cuticular structures of insect larvae. *Dros. Inf. Serv.* 52
- XIA, Q., *et al.*, Biology Analysis Group. (2004). A draft Sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science* 306(5703): 1937-1940.

DEFAUTS DE STRUCTURATION DANS LES EMBRYONS DE VER A SOIE ANALYSES PAR DES PREPARATIONS DE CUTICULE

AMIT SINGH^{1,2*}, MADHURI KANGO-SINGH³ & K. P. GOPINATHAN^{4*}

1. Department of Biology, University of Dayton, Dayton, OH.

2. Center for Tissue Regeneration and Engineering at Dayton (TREND), Dayton, OH.

3. Mercer University School of Medicine, Division of Basic Sciences, West 97, Box 173, 1550 College St., Macon, GA 31207.

4. Microbiology and Cell Biology Department, Indian Institute of Science, Bangalore – 560 012, Inde.

*Le ver à soie du mûrier **Bombyx mori**, un insecte lépidoptère holométabole a un plan d'organisation métamérique. En raison de son adaptation fonctionnelle, **B. mori** présente des déviations uniques de sa structure, par rapport à **Drosophila melanogaster**, insecte diptère plus avancé sur le plan évolutif. Les études précédentes sur l'analyse de phénotypes mutants chez **B. mori** ont été réalisées pendant les derniers stades du développement larvaire. Ici, nous avons employé l'approche de la préparation cuticulaire pendant le développement embryonnaire pour étudier les repères morphologiques associés à **B. mori**, et à l'Eri, une autre espèce de ver à soie et les défauts de structure associés avec le mutant **Ekp** de **B. mori**. Le mutant homéotique **Ekp**, développe des pattes abdominales ectopiques, un caractère sur lequel on n'a obtenu des informations qu'au cours du développement larvaire. En utilisant l'approche de la préparation cuticulaire, on a pu détecter les défauts de structure des pattes abdominales supplémentaires de la mutation **Ekp**, dès 7,5 jours chez l'embryon. On peut exploiter cette approche pour étudier les défauts de structuration qui affectent le début du développement chez les mutants de **B. mori**.*

INTRODUCTION

Le ver à soie du mûrier, *Bombyx mori*, du fait de l'information disponible sur sa séquence génomique complète (Xia et coll., 2004) s'avère un excellent système pour étudier les aspects génétique et moléculaire de structuration, tout comme le prototype de l'insecte modèle *Drosophila melanogaster*. Les analyses de mutagenèse classiques ont révolutionné la génétique de *Drosophila* en mettant à jour un certain nombre de mutants, présentant des défauts de structuration pendant le développement embryonnaire (Nusslein-Volhard et coll., 1984). Dans ces études, on a employé l'approche de la préparation cuticulaire pour étudier les défauts structurels pendant le développement embryonnaire (Van Der Meer, 1977). Le raisonnement est que l'embryon de *Drosophila* présente des processus cuticulaires et des denticules très réguliers et réitératifs et une cuticule nue sur le côté ventral de l'embryon. On attribue n'importe quel défaut des denticules / de la cuticule chez le mutant à la fonction de ce gène. Le prolongement de la période de développement embryonnaire de 10 jours chez *B. mori* offre la possibilité d'analyser discrètement les différentes étapes de la structuration. Cependant, jusqu'à présent, on n'a pas employé les préparations cuticulaires chez le ver à soie pour étudier les défauts de structuration. Bien qu'il y ait un grand éventail de mutants, il n'y a pas assez

* Auteur auquel adresser la correspondance Auteurs : Amit Singh, mail : amit.singh@notes.udayton.edu Tel : 937-229-2894, Fax : 937-229-2021.

d'information sur les gènes qui sont impliqués dans le début de la structuration embryonnaire, puisque la plupart des phénotypes ont été seulement étudiés à la fin du développement larvaire et nymphal. L'étude de ces repères de structuration uniques chez *B. mori*, en utilisant l'approche de la préparation cuticulaire, peut donc être très importante pour comprendre la base génétique de structuration chez l'embryon.

Nous présentons ici, l'utilisation de la technique de la préparation cuticulaire pour étudier la structuration embryonnaire chez *B. mori*. Des comparaisons ont aussi été faites sur le phénotype de la cuticule chez *B. mori* avec une autre espèce sauvage, *Philosomia cynthia ricini* (Eri). Bien que l'Eri appartienne au même ordre et partage des ancêtres communs, il s'est séparé il y a longtemps de *B. mori*. Nous avons aussi utilisé un mutant homéotique, *Ekp*, (membre de l'ensemble E du mutant homéotique de *B. mori*), qui présente une transformation, sous la forme d'une identité segmentaire, pour montrer l'utilité de notre approche. Les études précédentes ont été centrées sur les défauts de structuration chez *Ekp* ainsi que sur d'autres mutations, mais seulement pendant les derniers stades larvaires (Ueno et coll., 1992 ; 95). Cependant, chronologiquement, notre approche permet de réaliser l'analyse dès défauts de structuration dès l'embryogenèse. On peut exploiter les marqueurs cuticulaires génétiquement ou de manière expérimentale pour discerner les rôles des locus génétiques impliqués dans la structuration de l'embryon du ver à soie.

MATERIELS ET METHODES

On se procure les œufs à partir d'un élevage synchronisé maintenu à 24° C. Les différentes races utilisées pour ces études sont les souches domestiquées du ver à soie mûrier, la souche bivoltine NB4D2 de *B. mori* (L) (*Bombycidae*) et le ver à soie eri, *Philosomia cynthia ricini* (Hutt : *Saturnidae*), une espèce sauvage élevée sur des feuilles de ricin (*Ricinus communis*). Nous avons aussi utilisé une souche bivoltine du mutant *Ekp* [marqueurs *Ekp*, *Y* (sang jaune) et *F* (cocon chair)] pour étudier les phénotypes du mutant.

Préparations de la cuticule :

On enlève le chorion des embryons en suivant le protocole de Singh et Gopinathan (1997). On rince les embryons sans chorion dans de l'eau distillée. On fait bouillir les œufs sans chorion dans du KOH à 10 % pendant 10 min et on les lave à l'eau. On fixe les embryons dans de l'acide acétique : glycérol (4 : 1) pendant 24 h et on les monte sur un montant d'Hoyer (recette chez Van der Meer, 1997). On applique des poids sur le couvre - lame pour aplatir le tissu. On incube les préparations à 40° C pendant 2 à 3 jours pour permettre la clarification du tissu et on observe avec un Microscope optique Leica DMRBE sur fond noir.

RESULTATS ET DISCUSSION

Structure de la cuticule :

L'œuf de *B. mori* est une sphère aplatie de 1,2 mm de long, de 0,95 mm de largeur et de 0,63 mm d'épaisseur, qui donne des larves du 1^{er} âge au bout de 10 jours de développement embryonnaire. En termes de repères morphologiques externes, un prototype larvaire se forme également dès 7,5 jours de développement (Tazima, 1978 ; Singh et Gopinathan, 1995 ; pour la revue voir Gopinathan et coll., 1998). Les larves *B. mori* ont un plan d'organisation métamérique comprenant la tête, le thorax et l'abdomen (Fig. 1a). La tête est de nature chitineuse et comporte les segments contribuant à l'appareil buccal. Le thorax comporte trois segments c'est dire le pro-, le meso- et le meta-thorax, chacun portant une paire de pattes thoraciques sur le côté ventral (Fig. 1a). L'abdomen est formé de onze segments (les trois derniers fusionnant pour former une seule partie). Au niveau ventral, les parties A3-A6 et A9 portent les pattes abdominales ou pseudopodes (Fig. 1a). Les pattes abdominales sont une adaptation fonctionnelle du ver à soie, qui disparaissent au cours de la métamorphose de la

larve en nymphe (Suzuki et coll., 2001 ; Singh et coll., 2007). L'unité de base de la structure est le segment, qui comprend des rangées de soies sur toute la circonférence et une cuticule nue. A l'inverse de *Drosophila*, où la structure des soies sur l'ectoderme dorsal et ventral est différente, le ver à soie présente une structure de soies régulière à la fois sur la surface dorsale et ventrale.

Chez la souche bivoltine NB4D2, la cuticule présente des groupes de soies disposées en rangées horizontales qui alternent avec la cuticule nue tout le long du corps.

Les deux bandes de soies sont séparées par une large bande de cuticule nue qui est deux fois plus large par rapport à la bande de soies (Fig. 1 a). Chaque groupe présente 3 à 4 longues structures semblables à des soies en dents de scie, qui proviennent séparément des cellules de base Fig. (1 b).

Le ver à soie Eri présente aussi une structure similaire de rangées de soies qui alternent avec la cuticule nue (Fig. 1c). Cependant, le nombre des soies et le nombre dans chaque groupe individuel sont différents. Chaque groupe dispose de 4 à 5 soies en dents de scie qui proviennent d'une cellule de base commune (Fig. 1d), ceci étant une des caractéristiques de l'eri. La bande de soies a une pigmentation caractéristique sur toute sa largeur.

Phénotype du mutant *Ekp* :

Les mutants de *B. mori* de l'ensemble E sont caractérisés par un appendice, une patte ectopique sur le deuxième segment abdominal (A2) (Fig. 1e). Les pattes abdominales de *B. mori* sont une adaptation fonctionnelle et disparaissent au cours de la métamorphose (Suzuki et coll., 2001 ; Singh et coll., 2007). La fréquence de manifestation du phénotype avec une patte supplémentaire chez les mutants *Ekp* est très faible. En gros, on peut classer le phénotype du mutant embryonnaire en deux types :

1. Une petite projection à partir de la surface ventrale de la cuticule du segment A2. Ces projections ne comportent pas de projections cuticulaires comme un siphon distal, comme on l'observe dans les pattes abdominales du type sauvage (Fig. 1f)

2. Les pattes spécifiques A2 apparaissant comme une version miniaturisée d'A3. La projection dans les segments A2 porte des soies rudimentaires aux sommets et fait la moitié de la patte abdominale du type sauvage (Fig. 1g).

Cette étude révèle clairement que les structures de la cuticule sont caractéristiques de chaque espèce de ver à soie. Bien que le ver à soie eri partage un ancêtre commun avec *B. mori*, ils ont développé quelques caractéristiques divergentes au cours des années. La structure caractéristique de pigmentation de chaque segment de la bande de soies de l'eri est peut-être une adaptation fonctionnelle de la larve pour se protéger des prédateurs. La disposition segmentaire chez l'eri est similaire à celle de NB4D2, mais la structure des soies est drastiquement différente. La nature des soies est caractéristique des espèces. Ces études révèlent que, bien qu'ils partagent un ancêtre commun et soient étroitement apparentés, il existe une structure caractéristique de la cuticule associée avec différentes espèces de ver à soie. On peut exploiter ces éléments structurels de la cuticule comme caractères d'identification et on peut aussi les utiliser pour la détection précoce des phénotypes mutants, associés à des structures de la larve et de l'adulte.

Nos études avec les mutants de l'ensemble E révèlent qu'on peut obtenir des indications sur la transformation homéotique d'A2 en d'autres segments abdominaux (A2-A6) au bout de 7,5 jours de développement embryonnaire. De manière intéressante, la mutation dans l'ensemble E a entraîné le changement de destinée d'A2, mais elle n'a pas entraîné une patte abdominale identique à celle du type sauvage. Cela indique que le processus de la transformation homéotique et la croissance ne sont pas étroitement associés au cours du développement.

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** ou à **sericologia@inserco.org**. 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.

