

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*)
FONSECA T.C. (Brésil / *Brazil*)
FREDDI G. (Italie / *Italy*)
GOLDSMITH M.R. (USA)
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*)
SOMASHEKAR T.H. (Inde / *India*)
SONWALKAR T.N. (Inde / *India*)
TRENCZEK T. (Allemagne / *Germany*)
TZENOV P. (Bulgarie / *Bulgaria*)
VAGO C. (France)
XIA Q. (Chine / *China*)
YAMASHITA O. (Japon / *Japan*)
YUNGEN M. (Chine / *China*)

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 x 19 cm. Au dos de chaque illustration doivent être indiqués le nom de l'auteur, le n° de la figure (en chiffres arabes) et l'orientation de l'illustration si nécessaire.

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

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

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

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

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

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

INFORMATION FOR CONTRIBUTORS

1) Papers should be in French or in English and be original contributions or reviews in the field of sericulture including silkworm, host plant, silk reeling, whatever the nature of studies (basic or applied) and topics (biochemistry, ecology, economy, virology, genetics, etc.).

2) Papers should be submitted to: **Dr G. CHAVANCY** or to **sericologia@inserco.org**. Submission of a paper to the Editor implies that it has not previously been published, that it is not under consideration for publication elsewhere and that, if accepted in SERICOLOGIA, it will not be published elsewhere in the same form without the written consent of the Editor.

3) Manuscripts and illustrations should be submitted in duplicate and the author should retain one copy. In the case of multiple ownership, the authors indicate who is to receive the proofs.

4) Manuscripts should be typewritten with double spacing and wide margin. Authors are requested to keep their communication as concise as possible. Footnotes should be avoided and italics should not be used for emphasis.

5) The typescript should contain the following features:

- Title followed by the author's name and full address.
- Abstract which should be a brief summary of the contents and conclusions of the paper and should refer to any new information. It should not exceed 200 words and may be divided into numbered sections.
- Keywords. A short list of keywords provided for rapid scanning of the contents of the paper and used for compiling the index.

- Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion should be given for papers presenting original results. For review, authors may choose the convenient presentation.

- Acknowledgements.

- References. The 'Harvard system' is to be followed. References should be detailed in the following order: author's names and initials, date (in parentheses), the title of the article, the name of the journal as abbreviated in the World List of Scientific Periodicals (4th edit., 1963), the volume and the first and last pages of the article.

For books, the author's names, date of publication, title, edition, number of pages, reference, publisher's name and the place of publication should be given.

In the text, references should be given as Dupont (1964) or (Dupont, 1964). When a citation includes more than two authors, e. g. Dupont, Durand and Martin, the paper should be cited in the text as Dupont *et al.*, provided this is not ambiguous. If papers by the same author(s) in the same year are cited they should be distinguished by the letters a, b, etc.

References to a paper "In press" means that it has been accepted for publication and given as follows:

SETOYAMA K. (1982) Effect of water on molecular motion of silk fibroin. J. Seric. Sci. Jpn. In press.

6) Illustrations. All necessary illustrations should accompany the manuscript but should not be inserted in the text. All photographs, graphs and diagrams should be numbered consecutively in Arabic numerals in the order in which they are referred to in the text.

Glossy photographs or positive prints (not X-ray, negatives or slides) should be sent, unmounted wherever possible, and should be restricted to the minimum necessary.

Charts, graphs or diagrams should be drawn boldly in black ink on good quality white paper or card. Lettering to appear on the illustration should be given in full and should be of sufficient size to allow for considerable reduction where necessary.

Illustrations should not be larger than 14 × 19 cm. On the back of each illustration should be indicated the author's name, the figure number (in arabic numerals) and the top of illustration, when it is not clear.

Legends to figures should be typed on a separate sheet and not on the back of the original, and should give sufficient data to make the illustration comprehensible without reference to the text.

7) Tables. They should be numbered in roman numerals, typed on separate sheets and should have a title which will make the meaning clear without reference to the text. All tables and figures would be referred to in the text.

8) Only standard abbreviations should be used. Where specialized abbreviations are used, the name should firstly be given in full with the abbreviation indicated in parentheses.

9) The Latin names should be given for all species used in investigation.

10) Corrections to proofs should be restricted to printer's errors only. Other than these, substantial alterations will be charged to the author.

11) A reprint order form will be supplied with the proofs, and authors may order such reprints as they require when the proofs are returned. Please note that 25 free reprints are sent by the Editor.

SOMMAIRE – CONTENTS

Revue / Review

- Diapause in silkworm, *Bombyx mori*, with special reference to the paternal influence : a review** 145
 Revue sur la diapause, en particulier sur l'influence paternelle, chez le ver à soie, *Bombyx mori* 171
 RAJENDRA MUNDKUR, S. R. KATTI, M. V. CHANDRAKALA, CH. NARASIMHA RAO & B. M. SEKHARAPPA

Articles scientifiques / Scientific papers

- Cloning *Bombyx mori* L. female genotypes by implantation of donor's ovaries into parthenoclonal females** 187
 Clonage de génotypes femelles de *Bombyx mori* par l'implantation d'ovaires de donneurs chez des femelles parthénoclonales 199
 K. A. DOROSHENKO & V. V. KLYMENKO

- Testing of different backcross breeding generations of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Drury** 205
 Test de différentes générations de rétrocroisement pour le breeding du ver à soie tasar tropical, *Antheraea mylitta* Drury 215
 R. MANOHAR REDDY, G. HANSDA, N. G. OHJA, N. SURYANARAYANA, SURESH RAI & N. B. VIJAYAPRAKASH

Rapports techniques / Technical reports

- Socio-economic and personal correlates of adoption of improved sericulture practices** 219
 Corrélatifs socio-économiques et personnels dans l'adoption de pratiques séricicoles améliorées 227
 MOHAMMAD KARIM MOTAMED

- Studies on ovipositional behaviour and preference of eri silkworm, *Samia cynthia ricini* Boisduval under semi-arid tropics of India** 233
 Etudes sur le comportement et sur la préférence de ponte du ver à soie eri, *Samia cynthia ricini* Boisduval dans les conditions tropicales semi-arides de l'Inde 241
 P. JAYA PRAKASH, R. S. JAISHAN SINGH, B. V. SANJEEVA RAO & M. VIJAY KUMAR

- Development of intensity of leaf spot (*Phloeospora maculans*), disease of mulberry in relation to abiotic factors** 245
 Développement de l'intensité de la maladie de la tache de la feuille (*Phloeospora maculans*) du mûrier en fonction des facteurs abiotiques 251
 TASNEEM N. TANKI, N. A. MUNSHI, M. A. ZARGAR, K. A. SAHAF & T. A. RAJA

Effect of cocoon cooking conditions on reeling performance and quality characteristics of raw silk of Indian bivoltine hybrid cocoons	255
Effet des conditions de cuisson des cocons sur la performance de dévidage et les caractéristiques de qualité de la soie grège des cocons hybrides bivoltins indiens	267
SUBHAS V. NAIK, PRAKASH V. NAIK, HANUMANTH NAIK, B. M. MAHADEVIAH & S. T. VENU	
Cocoon filament size deviation in multivoltine breeds of silkworm, <i>Bombyx mori</i> L. .	273
Régularité du titre du filament du cocon chez les lignées polyvoltines du ver à soie, <i>Bombyx mori</i> L.	281
S. A. HIREMATH, P. R. KOUNDINYA, S. M. H. QADRI & C. K. KAMBLE	

DIAPAUSE IN SILKWORM, *BOMBYX MORI*, WITH SPECIAL REFERENCE TO THE PATERNAL INFLUENCE: A REVIEW

RAJENDRA MUNDKUR*, S. R. KATTI, M. V. CHANDRAKALA, CH. NARASIMHA
RAO & B. M. SEKHARAPPA

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

Toyama (1906) defined embryonic diapause in silkworm, Bombyx mori as 'a maternally inherited biological event under the control of sex-linked genes'. Sonobe and Odake (1986) have proposed two theories related to diapause: (i) diapause is the phenomenon predetermined by the diapause factor during embryogenesis, and (ii) diapause is the process determined by the genetic factor during embryogenesis. Discovery of paternal genes taking over the developmental process of diapause-destined silkworm eggs (Rajendra Mundkur et al., 2004), has conducted to re-look into the diapause phenomenon with special reference to paternal inheritance of voltinism. The present authors propose a new theory related to diapause viz., "diapause is the phenomenon determined by environment, maternal genes and paternal genes synergistically or exclusively"

Keywords: *Bombyx mori*, diapause, paternal influence, *pnd*, silkworm, voltinism.

INTRODUCTION

Adaptations to the surrounding environment are the response of all the living organisms, for their existence in the nature. Diapause phenomenon is one such adaptation evolved by animals to tide over situations which are not congenial for sustenance of life. The phenomenon is a classic example of animals' response to the adverse environmental conditions. During diapause the animal virtually suspends its growth until the conditions that are hostile turn out to be favorable. Though evolved as an adaptation for survival, the diapause phenomenon is governed or determined by genetic factors that are induced by environmental cues.

Class insecta being the largest class in animal kingdom adopted to live in various including extreme climatic conditions, presents various types of diapause phenomenon like embryonic diapause, larval diapause, pupal diapause and adult diapause. The silkworm, *Bombyx mori*, the economically important domesticated insect, producing silk – the queen of textiles, has adopted embryonic diapause during the egg stage. In a typical diapausing strain of *Bombyx mori*, the embryo ceases to develop beyond certain stage and resumes development once the condition becomes favorable. This kind of diapause phenomenon is determined long before the embryo is formed. In other words, the suspension of the continuation of the development of the embryo is determined by its parents which is a unique phenomenon. Why the parents have to regulate the development of their offsprings? Why the embryo fails to take control of its own development are the questions unanswered even today. Denlinger (1985) opines that it may be due to the lack of photoreceptor mechanism and other components of mature neuro-endocrine centre in the embryo which makes it to strongly rely on

* Corresponding author: Dr. Rajendra Mundkur, Silkworm Breeding Unit (KSSRDI), Bidadi-562109, Ramanagar District, Karnataka, INDIA. email: Rajendra.mundkur@gmail.com

maternal determinants for diapause regulation. It is a highly complex phenomenon, with great diversity among insects (Lees, 1955; Saunders, 1981). The silkworm, *Bombyx mori* is classified depending on the geographical regions, as Temperate and Tropical races. They are classified on the basis of voltinism as Univoltines, Bivoltines and Multivoltines [or Polyvoltines]; depending upon the number of generations they undergo in a year. Generally, tropical silkworms are polyvoltines and the polyvoltine eggs do not undergo hibernation, which means that, embryos develop continuously and hatch in about 10-11 days after egg laying. In Univoltines and bivoltines, the embryos 'pause' development and enter hibernation at blastoderm stage which is about 20-22 hours after oviposition. Univoltines are temperate silkworm races, show **facultative type** of diapause wherein the eggs exhibit diapause phenomenon irrespective of environmental factors. Bivoltines are also temperate races which show **obligatory type** of diapause wherein diapause phenomenon is modified by environmental factors.

In Japan, silkworm eggs hatch after completion of hibernation during Spring [about middle of May], in warmer climate with about 20°C temperature. They turn into moths around later half of June and lay eggs. The deposited eggs are non-pigmented pale yellow in color and non-hibernating. They hatch and grow during early July, with the temperature of 25-30°C. They become moths during later half of August and deposit eggs. The laid eggs are brown colored and hibernating (Tazima, 1986)

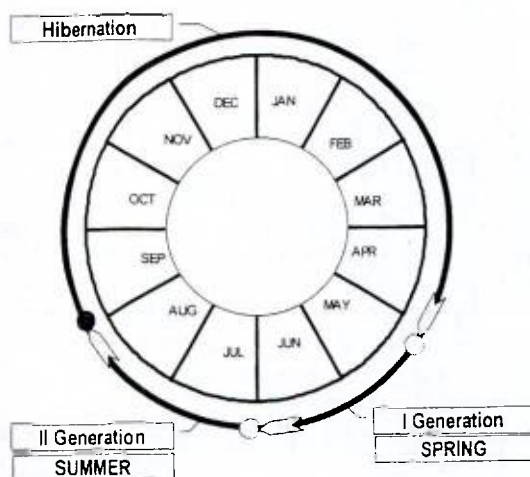


Fig. 1. Behavior of bivoltines in temperate regions. They show two successive crops in spring and following summer. Spring crop lays non-diapausing eggs while summer crop lays diapausing eggs.

Fig. 1. Comportement des bivoltins dans les régions tempérées. Ils présentent deux récoltes successives au printemps et l'été qui suit. La récolte de printemps pond des œufs sans diapause tandis que la récolte d'été pond des œufs à diapause.

The freshly laid diapausing eggs also do not have pigments, just like non-hibernating eggs, but after 10-20 days in Japan eggs become pigmented and turn to purple black. The pigmented eggs stop their development at the age of blastoderm formation, and become dormant. Eggs pass through summer and once they encounter cold weather of winter for 3 to 4 months, they continue their development. Hence, 'Bivoltine' in Japan is alternation of diapausing and non-diapausing generations (Tazima, 2001).

Extensive studies on diapause mechanism are undertaken in temperate conditions, but under tropical conditions the studies are scanty. In Indian tropical conditions, bivoltines do not behave as they behave in Japanese conditions. They undergo hibernation in every generation. During summer season, sporadic incidences of bivoltines laying non-diapausing eggs are recorded. Conversely, during winter season, sporadic incidences of polyvoltine silkworm races laying diapausing eggs are

also recorded. Generally, Polyvoltine females lay non-diapausing eggs irrespective of whether they pair with polyvoltine or bivoltine males. Similarly, bivoltine females lay diapausing eggs irrespective of whether they pair with bivoltine or polyvoltine males. Therefore, diapause is a maternally inherited character and males do not have any role in determining the voltinism of the offspring. However, an exception to this well established phenomenon was recorded where; bivoltine females (which are destined to lay hibernating eggs) lay non-hibernating eggs when they are mated with a special character race, KS-10 males (Rajendra Mundkur *et al.*, 2004). This kind of paternal influence on diapause necessitated reviewing of the diapause phenomenon in silkworm *Bombyx mori*, from point of view of its expression under tropical conditions.

1. Differences between diapause and non-diapause eggs.:

Generally there are many differences between diapause and non-diapause type of silkworm eggs. Some of the differences are indicated in the Table I.

Table I. Table showing the difference between diapausing and non-diapausing eggs.

Tableau I. Tableau montrant les différences entre les oeufs à diapause et sans diapause.

Diapausing egg <i>Oeuf à diapause</i>	Non-diapausing egg <i>Oeuf sans diapause</i>
Generally eggs are pigmented. <i>Les oeufs sont généralement pigmentés</i>	Generally non-pigmented. <i>Généralement non pigmentés</i>
Embryonic development arrested. <i>Arrêt du développement embryonnaire</i>	Continuous development. <i>Développement continu</i>
Diminished egg metabolism. <i>Diminution du métabolisme de l'oeuf</i>	Increased metabolism <i>Augmentation du métabolisme</i>
Lower Oxygen consumption by eggs. <i>Baisse de la consommation d'oxygène par l'oeuf</i>	Higher Oxygen consumption <i>Augmentation de la consommation d'oxygène</i>
Preservation of substrates like lipids and carbohydrates is more. <i>Conservation plus importante des substrats tels que lipides et hydrates de carbone</i>	Preservation of lipids and carbohydrates is less. <i>Conservation moins importante des lipides et des hydrates de carbone</i>
Marked resistance to desiccation and low temperature <i>Résistance marquée au dessèchement et à une basse température</i>	Sensitive to desiccation and low temperature <i>Sensible au dessèchement et à une température basse</i>

2. Hibernation potency:

Diapause type of eggs of different races have differential ability of cold tolerance. In Indian tropical conditions when diapause is induced in the multivoltine race, Pure Mysore, it lays about

15-27% of pigmented eggs, out of which some of the eggs hatch normally even without entering diapause. In tropical conditions, the bivoltine race Daizo lay diapausing type of eggs but these eggs do not tolerate cold treatment for more than four months. These variations may be due to the differential hibernation potency of the races. Consolidating various experimental data, Nagatomo (1953) described hibernation potency values (Table II). According to him category I, which has hibernation potency value 0-1 is always multivoltine, and category V, which has the hibernation potency 11-12 is always univoltine irrespective of the environmental conditions. However, categories II to IV oscillate between multivoltine to bivoltine depending upon the environmental conditions.

Table II. Table showing the hibernation potency and voltinism characters (Nagatomo, 1953).

Tableau II. Tableau montrant le potentiel d'hibernation et les caractères du voltinisme (Nagatomo, 1953).

Category	Hibernation potency value	Voltinism	Characteristics
<i>Catégorie</i>	<i>Valeur du potentiel d'hibernation</i>	<i>Voltinisme</i>	<i>Caractéristiques</i>
I	0-1	Multivoltine <i>Polyvoltin</i>	Always lay non-hibernating eggs <i>Pond toujours des oeufs sans hibernation</i>
II	2-4	Between multi- and bivoltine <i>Entre poly et bivoltin</i>	Some non-hibernating eggs under high incubation temperatures <i>Certains oeufs sans hibernation à des températures d'incubation élevées</i>
III	5-7	Bivoltine <i>Bivoltin</i>	Non-hibernating eggs under high and hibernating eggs under low incubation temperatures <i>Oeufs sans hibernation sous des températures d'incubation élevées et oeufs à hibernation sous de faibles températures d'incubation</i>
IV	8-10	Between bi- and univoltines <i>Entre bi et monovoltins</i>	Both non- and hibernating eggs, even under low incubation temperature <i>A la fois des oeufs sans et avec hibernation même à de faibles températures d'incubation</i>
V	11-12	Univoltines <i>Monovoltins</i>	Always lay hibernating eggs <i>Pond toujours des oeufs à hibernation</i>

THE PROCESS OF DIAPAUSE

The induction, intensification and termination of diapause are distinct stages involved in the diapause process (Iwata *et al.*, 2005a). Figure 2 schematically explains the general broad mechanism involved in laying of non-diapausing and diapausing eggs in silkworm.

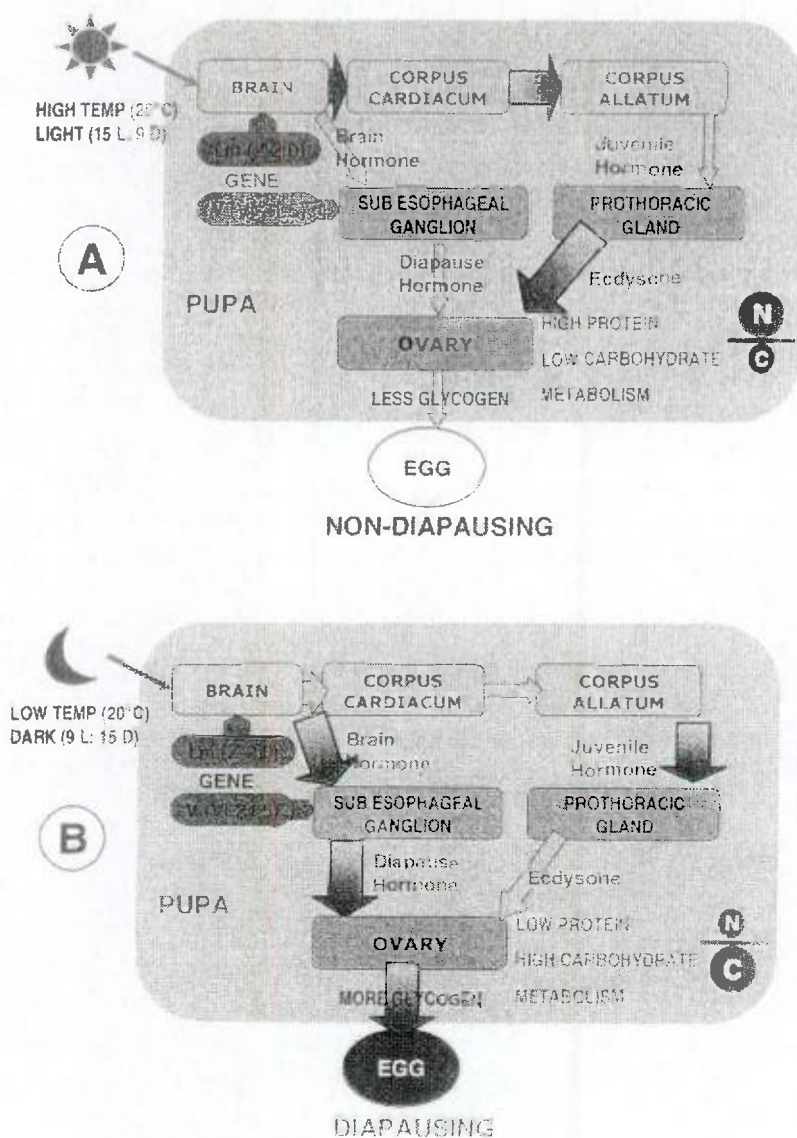


Fig. 2. Schematic diagram of steps involved in non-diapausing (A) and diapausing (B) types of eggs.

Fig. 2. Schéma des étapes impliquées chez les oeufs sans diapause (A) et à diapause (B).

The process can be broadly explained as depicted in Figure 2A and 2B. The graphical representation is based on the data of Morohoshi (2000) and Tazima (2001). When the rearing temperature is high (above 25°C) and the days are longer (15 hrs light and 9hrs dark), Brain Hormone (BH) secreted by brain, inhibits corpus allatum (CA) from producing Juvenile Hormone (JH) to the threshold level. In the absence of JH, prothoracic gland (PG) produces ecdysone which facilitates the

protein accumulation in the ovary. Under such conditions, eggs do not enter into diapause. Whereas, when the rearing temperature is low (below 20°C) and the days are shorter (9 hrs light and 15 hrs dark), BH stimulates CA to produce JH. JH inhibits PG from producing ecdysone. In the absence of ecdysone sub-oesophagal ganglion (SG) produces Diapause Hormone (DH). DH induces ovary to accumulate glycogen in the eggs, which undergo diapause.

1. Critical period of egg entering into diapause:

The first maturation division of oocyte begins prior to oviposition and ends in 5-6 minutes after oviposition. After the production of first polar nucleus, second maturation division follows, producing the female pronucleus at about 100 minutes after the egg is laid (Tazima and Onuma, 1967). Sperm enters into ovum through micropyle during oviposition and stays in the anterior region of the egg. Sperm head gradually transform into male pronucleus. The female pronucleus migrate toward male pronucleus while the three polar nuclei remain in the anterior polarplasm. After two hours of oviposition male and female pronuclei unite at a definite position nearer to the anterior pole to form zygote (Takami, 1969). Zygote divides mitotically many times to produce many cleavage nuclei. By 10 hours cleavage is completed. Cleavage nuclei enter into periplasm to form syncytial blastoderm. The cleavage nuclei undergo more tangential divisions to increase in number and form a cellular blastoderm after 15 hours of oviposition. At about 20 hours germband is developed. This is the ideal stage for acid treatment to prevent the eggs from entering into diapause. Otherwise the embryo enters into diapause. This stage is called Stage-4 in the 30 stage developmental scale (Takami, 1969).

As an initial step to define the molecular mechanism of initiation and termination of diapause during the embryogenesis of silkworms, *Bombyx mori*, mRNA transcripts from maintained and activated diapause eggs were compared with differential expression using cDNA array by Hwang *et al.* (2005). Twenty-four individual cDNA transcripts were expressed differentially in a total of 1,468 different cDNAs. Among those clones, a 2kb mRNA transcript from cytochrome oxidase subunit I (COI), gradually increased in diapause-activated eggs during early embryogenesis. They were highly expressed in testis, fat body, and midgut during the larval stage.

2. Stages of diapause:

Diapause is classified into five stages based on the distinct development of the embryo (Takami and Kitazawa, 1960).

Diapause Stage 1 (Stage-8 of embryonic development, which takes about 3-14 days of oviposition):

During this stage, Yolk cell migration occurs. Embryo is surrounded by yolk cells. Mitotic division stops on 4th day. Steep decline in glycogen content is noticed because of conversion of glycogen to polyols.

Diapause Stage 2 (Stage-9; 15-60 days):

Wider central region is lacking in yolk cells. Rate of respiration comes down to 2-5%, Water loss is arrested. The Chorion becomes impermeable to O₂ and H₂O.

Diapause Stage 3 (Stage-9; Continuation 60 days):

Water loss is totally arrested. Eggs are under anaerobic respiration. Rate of metabolism is diminished.

Diapause Stage 4 (Stage-10; Continuation 60 days):

Cryoprotection of the embryo by sorbitol and glycerol takes place.

Diapause Stage 5 (Stage-11; 100-110 days): Diapause terminates. The levels of Sorbitol declines by the activation of NAD-Sorbitol Dehydrogenase for the re-synthesis of glycogen.

3. Pigmentation and diapause:

The freshly laid eggs do not have pigments, They are similar to non-pigmented non-diapausing eggs. In Japan, after 10-20 days the eggs become pigmented and become purple black (Tazima, 2001), but in India pigmentation appears within 48 hours of egg laying. In developing eggs, diapause hormone (DH) stimulates synthesis of 3-hydroxy kynurenine in pupal ovary which is then metabolized to ommochrome, which is the serosal pigment, however, its role in diapause is not clearly understood. In Indonesian type of silkworm races, eggs are pigmented but not diapausing (*pnd*) (Yoshitake and Hashiguchi, 1969). The steps involved in the Tryptophane metabolism are shown in the Fig.3.

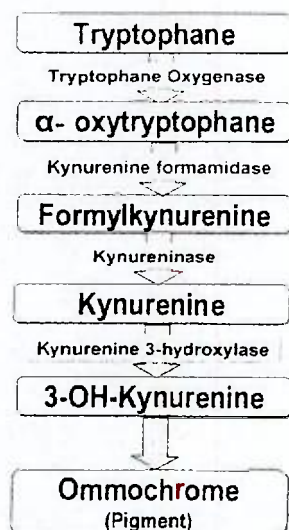


Fig. 3. Tryptophane metabolic pathway.

Fig. 3. Voie métabolique du tryptophane.

Melanine, pterine, ommochrome and carotenoids are the main pigments in insects responsible for pigmentation or coloration. Among these pigments, ommochrome is well documented in relation to embryonic diapause in *B. mori* (Yamashita and Hasegawa, 1985). These pigments are generally not present in non-diapausing eggs. Thus the diapausing eggs are usually pigmented with dark brown color due to the presence of ommochrome formed in serosal cells, while non-pigmented eggs are pale yellow/white which is the color of yolk, due to lack of this pigment.

INHERITANCE OF VOLTINISM

Voltinism was reported by Toyoma (1906) to be maternally inherited. He later opined that the voltinism is environmentally modified (Toyoma, 1913). Umeya (1925) and Nagatomo (1942) indicated that diapause behavior has sex-linked inheritance. Sex linked maturity gene (*Lm*) is linked to Z chromosome and plays role in diapause too.

1. Major genes involved in diapause:

The ordinary gene of voltinism has univoltine (V^1), bivoltine ($+^V$) and multivoltine (V^3) forms (Morohoshi, 2000). Table III indicates the major genes involved in diapause.

Table III. List of major genes involved in diapause character.

Tableau III. Liste des principaux gènes impliqués dans le caractère de la diapause.

Gene	Locus	Alleles	Description	Reference
Hs	Z-?	Hs > Hs ² > hs	Hibernation gene (? Equivalent to Lm) <i>Gène de l'hibernation (équivalent à Lm ?)</i>	Nagamoto, 1953
Lm	Z-2.0	Lm > + ^{Lm} > Lm ^c	Late maturity gene <i>Gène de maturité tardive</i>	Morohoshi, 2000
npnd	W-?		Non-pigmented non-diapausing gene <i>Gène de l'absence de pigmentation et de l'absence de diapause</i>	Murakami, 1986
M	VI-3.0	M ³ > + ^M > M ⁵	Moultinism gene <i>Gène de la mue</i>	Morohoshi, 2000
V	VI-21.5	V ¹ > + ^V > V ³	Voltinism gene (? DH-PBAN) <i>Gène du voltinisme (DH-PBAN ?)</i>	Morohoshi, 2000
Dh	XI-2.2	DhA1, DhA2, DhB	Diapause hormone (DH) and pheromone biosynthesis-activating neuropeptide (PBAN) <i>Neuropeptide d'activation de l'hormone de diapause (DH) et de la biosynthèse des phéromones (PBAN)</i>	Pinyarat <i>et al.</i> , 1995
bp	XI-40.3	-	Black pupa <i>Chrysalide noire</i>	Harizuka, 1947
pnd	XI-53.7	-	Pigmented non-diapausing gene <i>Gène de la pigmentation sans diapause</i>	Katsumata, 1968
pnd2	XII-2.6	-	Pigmented non-diapausing 2 gene <i>Gène 2 de la pigmentation sans diapause</i>	Doira, 1985
ln	XII-0.0	-	Lethal non-diapausing gene <i>Gène létal sans diapause</i>	Hirobe, 1954

Morohoshi (1976), proposes hypothetical genetic balance between genes V and Lm as the basis of voltinism phenomenon (Fig. 4).

Katsumata (1968) detected an autosomal recessive multivoltine mutant gene *pnd* which is independent of DH and environmental cues, in the silkworm strain Cambodge. Tzenov and Petkov (1998) reported that *pnd* is involved in a deficiency in the signaling pathway of DH. Doira (1985) described *pnd-2* gene which is similar to the *pnd* gene. Murakami (1986) reported that non-pigmented non-diapausing character of Cambodge and other tropical multivoltines is due to the gene *npnd* which is located in female sex chromosome and has maternal inheritance. Harizuka (1947) and Hirobe (1954) report that genes *bp* and *ln* also influence diapause.

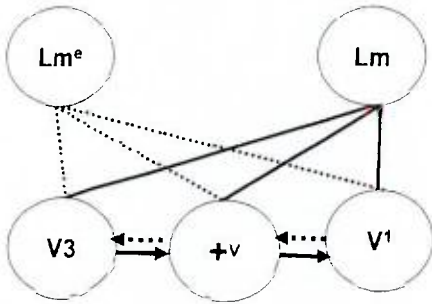


Fig. 4. Schematic representation of relationship between voltinism major genes and sex linked maturity gene (Morohoshi, 1976).

Fig. 4. Schéma de la relation entre les principaux gènes de la mue et le gène de la maturité lié au sexe (Morohoshi, 1976).

2. Related genes involved in diapause

i. BomDH gene:

Xu (1999) quantitatively measured DH mRNA in the SG of 3rd day pupae by Northern hybridization analysis and suggested that the embryonic diapause of *Bombyx mori* in succeeding generation was determined by DH mRNA content in SG. Using pBluescript KS(+) vector, BomDH gene was cloned by Xu *et al.* (1995) and expressed in *E. Coli* XL1 cells. They suggest that the BomDH is encoded by a single gene based on the Genomic Southern blot analysis.

ii. Diapause hormone-Pheromone Biosynthesis-Activating Neuropeptide (DH-PBAN or Dh):

The DH-PBAN gene, (**Dh**) encodes a common precursor protein for diapause hormone (DH) and pheromone biosynthesis-activating neuropeptide (PBAN). **Dh** locus carries three alleles, DhA1, DhA2 and DhB. Linkage analyses using polymorphisms showed that Dh was linked to the bp gene on chromosome 11 and has the locus 2.2. (Pinyarat *et al.*, 1995). In the silkworm, *Bombyx mori*, SG is known to secrete two neuropeptides, diapause hormone (DH) responsible for induction of embryonic diapause and pheromone biosynthesis-activating neuropeptide, which share a pentapeptide amide, Phe-Xaa-Pro-Arg-Leu-NH₂ (Xaa = Gly or Ser), at the C terminus. cDNA of Dh has 192 amino acid residues in which 22 amino acid residue DH peptide is located in N terminal followed by PBAN and three other neuropeptides [alpha-, beta-, and gamma-SG neuropeptide (SGN)], all of which are flanked by possible tryptic cleavage sites and share the Phe-Xaa-Pro-Arg-Leu-Gly sequence at the C terminus. These results indicate that DH, along with four other neuropeptides, is generated from a common precursor polypeptide that is encoded by a single mRNA transcribed in neurosecretory cells of SG (Sato *et al.*, 1993). The DH-PBAN gene expression starts at the histogenesis stage and gradually increases towards hatching.

iii. Samui gene:

Moribe *et al.* (2001) proposed that *Samui* gene transmits the signal for *SDH* expression in diapause eggs. It also protects the embryo against cold-injuries in non-diapause eggs. The expression of *Samui* mRNA and protein was activated after incubation at 5 °C for 5 to 6 days, lasted for another 30 days and then weakened. Exposure to 25 °C suppressed both mRNA and protein expression. In non-diapause eggs incubated at 5 °C, *Samui* was also up-regulated, although the expression was weaker. *Samui* contained nuclear localization-signals, a ssDNA-binding motif and a BAG domain similar to that of SODD/BAG-4. They opined that, because *Samui* could bind to HSP70, it could be a member of BAG protein family.

iv. NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase gene:

The Ecdysone metabolism has direct influence on the protein metabolism and indirectly on the diapause character (Fig.2). The ecdysone hydroxylation in the early stage of embryogenesis is dependent on the presence of both P450 reductase and ecdysone 20-hydroxylase P450, but its gradual reduction in the later stage may be due to the decrease in the level of ecdysone 20-hydroxylase P450 (Horike *et al.*, 2000). cDNA analysis indicate that NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase gene has 3174 bp (Horike *et al.*, 2000).

v. Sorbitol Dehydrogenase gene:

Embryonic diapause of *Bombyx mori* is sustained at 25°C, chilling at 5°C for 2 months causes diapause termination, a transition that is marked when the sorbitol dehydrogenase gene (SDH) is activated. cDNA analysis of Sorbitol Dehydrogenase gene revealed that it is about 10 kbp, with 8 exons and 7 introns. It is activated by low temperature in yolk cells of diapausing eggs and fat bodies of larvae and pupae. It also uses alternative promoter (Niimi *et al.*, 1993).

vi. Trehalase gene:

The diapause hormone stimulates transcription of trehalase gene in developing ovaries of the silkworm. A single copy of trehalase gene is present in haploid genome of silkworm. cDNA of trehalase gene contains 3143 nucleotides and comprises 579 amino acid codes (Su *et al.*, 1994).

3. Paternal influence on vltinism

Rajendra Mundkur *et al.* (2004) reported that when the silkworm race KS-10 is crossed to any diapausing type females, they lay non-diapause eggs. KS-10 is a non-diapausing white cocooning race developed by KSSRDI. This was the first report on the paternal influence on vltinism, where, paternal genes are completely inhibiting the already programmed diapause nature of the eggs. Katsumata (1968) detected an autosomal non-diapausing egg mutant '*pnd*' in the Indonesian polyvoltine race, Cambodge. He reported that when Japanese bivoltine (pigmented diapausing-*pd*) females were crossed with *pnd* type of males, resulting eggs showed normal pigmented diapausing (*pd*) character. When *pnd* type of females were crossed with *pd* type of males, then also the resulting eggs showed pigmented diapausing (*pd*) character (Katsumata, 1968). Sonobe and Odake (1986) also reported that heterozygous *pnd* (*pnd*+) shows normal diapause character. This kind of shift in diapause character is enigmatic because, in this case, though the *pnd* type of females have laid eggs without any preparations for undergoing diapause, the *pd* genes of males have forced the eggs to undergo diapause. It is equally interesting that in case of KS-10 (Rajendra Mundkur *et al.*, 2004), though the eggs laid by bivoltine females have all the necessary mechanism and preparations for undergoing diapause, the paternal genes of KS-10, inhibits the maternal diapause character and makes the embryo continue to grow. Yamamoto *et al.* (1978) indicated that the *pnd* gene is a single recessive gene. Murakami (1988, 1990) identified '*npnd*' a sex-linked gene responsible for polyvoltinism which is also epistatic to '*pnd*'. Muroga (1943) suggested that Indonesian races have a Voltinism modifier gene (*mv*) in tetravoltine silkworms. Yoshitake and Hashiguchi (1969) showed that Indonesian type of eggs when incubated at high temperature produce pigmented non-diapause type of eggs (*pnd*) and when incubated at lower temperature, produce non-pigmented non-diapause type of eggs (*npnd*). They suggested that there is a second factor, which also has a role to play in the diapause. The two factors have complementary relationship and embryo shows diapause nature only when both the factors are present (Fig.5). They suggested that Indonesian races do not have second factor, the eggs do not undergo diapause. Rajendra Mundkur *et al.* (communicated) suggest that the KS-10 type of races have a dominant Inhibitor of Diapause gene (*Id*), which prevents diapause to set in.

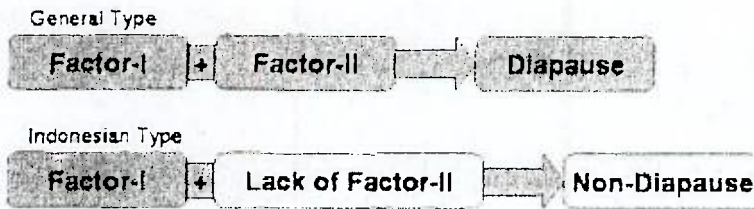


Fig. 5. Schematic representation hypothesis of Yoshitake and Hashiguchi (1969) that two factors act complementarily to produce diapause type of eggs.

Fig. 5. Représentation schématique de l'hypothèse de Yoshitake et Hashiguchi (1969) selon laquelle deux facteurs agissent de manière complémentaire pour produire des œufs à diapause.

FACTORS INFLUENCING DIAPAUSE

Volitinism in silkworm is known to be genetically controlled (Murakami, 1990) and is described by Toyama (1906, 1913), as a maternally inherited biological event under the control of sex-linked genes. However it is known to be influenced by many factors like, temperature, photoperiod, activity of neuro-endocrine glands, hormones and other chemicals.

1. Effect of Temperature and Light on diapause:

Xu *et al.* (1995) opine that the regulation of the gene encoding the diapause protein is influenced by temperature and light. High temperature (38°C), longer duration of light (15hr light: 9hr dark) and high humidity (90%) treatment is given in the early stages of pupation, diapause egg producing moths lay non-diapause type of eggs (Morohoshi, 2000 (Table IV)).

Analyzing the cDNA homolog of mammalian Sorbitol Dehydrogenase (BmSDH), by Northern hybridization and reverse transcription technique, Niimi *et al.* (1993) observed that the transcript of BmSDH occurred after chilling for 40-50 days when the diapause eggs (two days after oviposition) were exposed to 5 °C. The transcript of BmSDH was localized in yolk cells. They indicated that the yolk nuclei-dependent gene expression of BmSDH is induced by exposure to 5 °C in diapause eggs.

Using dechorionated eggs, Iwata *et al.* (2005a,b) observed that, both yolk cell dissociation and embryonic development are inhibited in diapause eggs incubated at 5 °C for 45 days by MAPK-ERK (mitogen-activated protein kinase- Extracellular signal-regulated kinase) (MEK) inhibitor U0126. Therefore, they suggested that MAPK-ERK in yolk cells has a role in regulating changes in yolk morphology and termination of embryonic diapause in *B. mori*.

2. Neuro-endocrine control of diapause hormone secretion:

i. Brain:

Brain has no relation to the determination of hibernation character (Hasegawa, 1957). However, brain is responsible for the diapause behavior by way of the level of its hormone secretion. Brain initiates the chain reaction of hormone secretion event from Brain-Corpus Allatum-Prothoracic Gland-Sub esophageal gland complex. Fig.6 depicts the general relationship between genes and neuro-endocrine glands with reference to diapause.

Table IV. Incubation of eggs at lower temperature (< 20° C) results in the production of non-diapausing eggs in the next generation, while incubation at higher temperature (> 30° C) results in the production of diapausing eggs in the next generation (Morohoshi, 2000).

Tableau IV. L'incubation des oeufs à une température plus basse (< 20° C) entraîne la production d'œufs sans diapause à la génération suivante, tandis que l'incubation à une température plus élevée (> 30° C) entraîne la production d'œufs à diapause à la génération suivante (Morohoshi, 2000).

Stages in Life cycle	Temperature ° C
<i>Stade du Cycle de vie</i>	
Diapausing egg / Oeuf à diapause	< 20
I-III instar larva / Larve du 1 ^{er} au 3 ^{ème} âge	20-25
IV-V instar larva / Larve du 4 ^{ème} au 5 ^{ème} âge	> 25
Pupa / Chrysalide	> 25
Moth / Papillon	> 25
Under above temperature regimen moth lays non-diapausing eggs	
<i>Sous les régimes de températures ci-dessus, le papillon pond des oeufs sans diapause</i>	
Non-diapausing egg / Œufs sans diapause	> 30
I-III instar larva / Larve du 1 ^{er} au 3 ^{ème} âge	28-30
IV-V instar larva / Larve du 4 ^{ème} au 5 ^{ème} âge	< 25
Pupa / Chrysalide	< 25
Moth / Papillon	< 25
Under above temperature regimen moth lays diapausing eggs	
<i>Sous les régimes de températures ci-dessus, le papillon pond des oeufs à diapause.</i>	

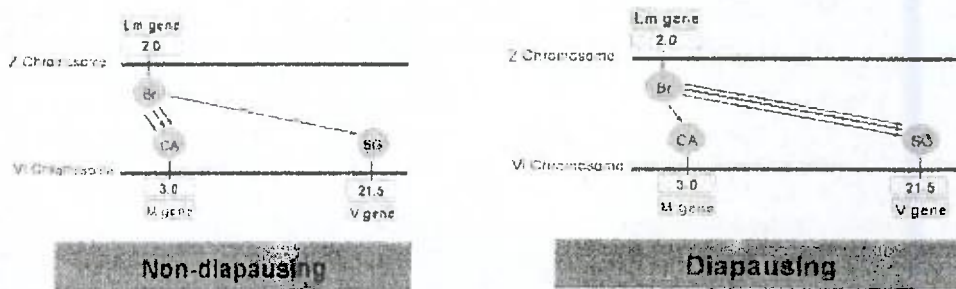


Fig. 6. Schematic representation of relationship between voltinism major genes and Brain, CA and SG. (Br: Brain, CA: Corpus allatum, SG: Sub-esophageal gland; Lm: Late maturity, M: Moultnism V: Voltinism) [Morohoshi, 2000].

Fig. 6. Représentation schématique de la relation entre les gènes principaux du voltinisme et le cerveau, le CA et la GS.

Br : Cerveau, CA : Corpus allatum, GS : Glande sous-oesophagienne, Lm : Maturité tardive, M : Mue, V : Voltinisme) [Morohoshi, 2000]

ii. Corpus allatum (CA):

The CA secretes the Juvenile hormone, which maintains the larval stage, from the early stage of growth up to about 3rd day of 5th instar. Again it secretes during 1st day of pupation (Morohoshi, 2000). The secretion is resumed again in the second half of pupal stage until the pupa becomes an adult (Fukuda, 1951). Juvenile Hormone suppresses protein synthesis. CA is controlled by moulting genes.

iii. Corpus cardium (CC):

CC is a neurosecretory gland connected to the neurosecretory cells of the brain through nerve link. It is inhibited by brain hormone (secreted by Group IV neurosecretory cells of brain). CC has role in metabolism of carbohydrates and lipids. Therefore it is possible that it is playing the role of auxiliary organ to SG (Morohoshi, 2000).

iv. Prothoracic gland (PG):

The PG secretes ecdysone and promotes protein synthesis and development, which results in increase in protein content of the eggs as a result they exhibit non-diapausing character.

v. Sub-esophageal gland (SG):

Ichikawa *et al.* (1997) observed that the females destined to lay non-diapause eggs (polyvoltines) had diapause eggs in their ovaries if their subesophageal ganglions (SG) had been surgically removed at 2 days after larval-pupal ecdysis or later. When the brain and the corpora cardiaca (CC)-corpora allata (CA) complex in addition to the SG was extirpated, the polyvoltines laid non-diapausing eggs. When polyvoltine ovary was implanted in bivoltine male pupae, the eggs turned into diapausing type (Fukuda and Sonobe, 1973).

Hasegawa (1957) opined that, Sub-esophageal ganglion (i) has a function in causing vortinism to change after 2nd day of 3rd instar. (ii) is the center of determination of hibernation character in silkworm. The extirpation of sub-esophageal ganglion caused cyclic AMP to decrease and cyclic GMP to increase at different developmental stages. The reversed changes in the cyclic nucleotides were brought about by implantation of the ganglion or by injection of the diapause hormone. No change in both cyclic nucleotides was induced in ovaries during the first 24 hr after of an injection of the hormone, but the clear effects appeared after a lag phase of a few days (Chen *et al.*, 1988). When the SG was removed from the females destined to lay diapause eggs (bivoltines), at 2 days after larval-pupal ecdysis, diapause eggs appeared but the appearance of diapause eggs was delayed by 2 days when the brain-CC-CA complex was also removed. These observations suggested that DH is produced in SG and transferred to the CC-CA complex, and that the secretion of DH from the complex is suppressed in polyvoltines. The appearance of diapause eggs in polyvoltines with transected protocerebrum of the brain indicated that there was an inhibitory center in the protocerebrum. By injecting gamma-aminobutyric acid (GABA) and picrotoxin they suggested that a GABAergic inhibitory mechanism in DH secretion may be active in polyvoltines but inactive in bivoltines throughout the pupal stage.

The implantation of a part of a developing embryo including the SG into the pupae with the SG removed induced diapause eggs in the progeny. These results were obtained from eggs incubated under diapause-averting conditions as well as diapause-inducing conditions by Morita *et al.* (2003). They opine that a neurosecretory system responsible for biosynthesis of FXPRLamide neuropeptides (DH) is established as early as histogenesis, although the system to regulate the secretion of neuropeptide hormones has not been fully formed by that time. The immunoreactive somata against DH-antiserum were found in the SG from blastokinesis (Morita *et al.*, 2003).

3. Hormones and other chemicals related to Diapause:

i. Diapause Hormone (DH): DH is a polypeptide amide comprising of 24 amino acids. (Yamashita, 1996)

H-[Thr-Asp-Met-Lys-Asp-Glu-Ser-Asp-Arg-Gly-Ala-His-Ser-Glu-Arg-Gly-Ala-Leu-Cys-Phe-Gly-Pro-Arg-Leu] - NH₂

DH is an amidated peptide belonging to FXPRLamide family. Its C-terminal penta-peptide amide structure (Phe-Gly-Pro-Arg-Leu-NH₂) is believed to be essential for biological activity. Out of these 5 amino acids, Glycine could be replaced by other amino acids and still have the same biological activity. The shorter tri-peptide amide, (Pro-Arg-Leu -NH₂) also possessed low but significant activity, indicating the minimum structure of diapause hormone (Imai *et al.*, 1991; 1998; Saito *et al.*, 1994).

DH consists of two active principles of peptides, DH-A and DH-B with estimated molecular weights of 3300 ± 400 and 2000 ± 200 kDa, respectively (Kubota *et al.*, 1976).

Injection of synthetic diapause hormone into non-diapause pupae induced an incidence of 45% diapause in the eggs (Katagiri *et al.*, 1998). However, Shiomi *et al.* (1994) observed that DH had no effect when injected to non-diapause (polyvoltine) pupae. Male moths had more DH content than females. DH is produced by SG at the larval stage itself, however, its peak reaches at late pupal stage. Even polyvoltines produce DH though the activity is weaker compared to bivoltines (Hasegawa, 1964). When anti-diapause hormone rabbit serum was injected into diapause type of pupae, non-diapause eggs were induced (Shiomi *et al.*, 1994).

ii. Dopamine:

Measurement of catecholamine concentrations in hemolymph and brain-sub-oesophageal ganglia (Br-SGs) showed that only dopamine concentrations in both tissues were consistently higher in diapause-type than non-diapause-type larvae and pupae (Noguchi and Hayakawa, 2001). The difference in dopamine concentrations in both tissues increases around pupal ecdysis. During the early pupal stage, Dopa decarboxylase activities and mRNA concentrations in Br-SGs were also much higher in diapause-type than non-diapause-type insects. Elevation of dopamine levels induced by feeding Dopa to IV and V instar larvae, and by injecting Dopa or dopamine into 2 day old pupae made the non-diapause-destined moths lay diapause eggs at 59% and 70% frequencies respectively. Injection of Dopa or dopamine elevated mRNA levels of the diapause hormone in the Br-SGs of non-diapause-type pupae 1 day after injection. Incubation of Br-SGs isolated from non-diapause-type 2day old pupae with Dopa or dopamine also stimulated the expression of diapause hormone mRNA. The environmental stimuli during parental embryonic development increase dopamine levels in both hemolymph and Br-SGs from the larval stage to early pupal stage, which results in laying of diapause-destined eggs through enhanced expression of the diapause hormone gene (Noguchi and Hayakawa, 2001).

iii. Ecdysteroid:

Ecdysteroids are hormones involved in developmental process in insects. In *B. mori* eggs, 20-hydroxyecdysone (20E) is the physiologically active molecule. In non-diapause eggs, 20E is produced by the conversion of maternal conjugated ecdysteroids (such as ecdysone 22-phosphate and 20-hydroxyecdysone 22-phosphate, to active free ecdysteroids) by an enzyme, called ecdysteroid-phosphate phosphatase (EPPase), and by *de novo* biosynthesis. But, in diapause eggs, neither of these metabolic processes occurs. In *de novo* biosynthesis of 20E, hydroxylation at the C-20 position of ecdysone, which is catalyzed by ecdysone 20-hydroxylase, is a rate-limiting step. EPPase is localized in the cytosol of yolk cells. The bulk of maternal ecdysteroid-phosphates is bound to vitellin and stored in yolk granules. The acidification in yolk granules, induced by vacuolar H(+)-ATPase, triggers the dissociation of ecdysteroid-phosphates from the

vitellin-ecdysteroid-phosphates complex and the dissociated ecdysteroid-phosphates are released from yolk granules to the cytosol (Sonobe and Yamada, 2004; Yamada and Sonobe, 2003). Horike and Sonobe (1999) reported that the microsomal ecdysone 20-monooxygenase activity in diapause eggs remained at a low level, while that in the non-diapause eggs increased from the gastrula stage. The increase in the activity was prevented by actinomycin D and alpha-amanitin, suggesting that gene transcription is required for eliciting an increase in ecdysone 20-monooxygenase activity.

The biological activities of various egg ecdysteroids was studied by Makka *et al.* (2002), by in vitro ligand-binding assay and bioassay using *B. mori* eggs. Using the ecdysteroid receptor of *B. mori* (BmEcR-B1/BmUSP heterodimer) prepared by yeast and *Escherichia coli* expression systems, they found that the relative binding affinities of egg ecdysteroids to the BmEcR-B1/BmUSP heterodimer decreased in the order of 20-hydroxyecdysone > 2-deoxy-20-hydroxyecdysone > 22-deoxy-20-hydroxyecdysone > ecdysone > 2-deoxyecdysone > ecdysone 22-phosphate. The injection of 20-hydroxyecdysone (25 ng/egg) into the prospective diapause eggs, which show a very low level of free ecdysteroids at the onset of embryonic diapause (gastrula stage), induced 7% of the eggs to develop beyond the gastrula stage without entering diapause. In contrast, the injection of other ecdysteroids was not effective in inducing embryonic development.

iv. Other chemicals related to diapause: The important chemicals which have relation with diapause is listed in the Fig.7.

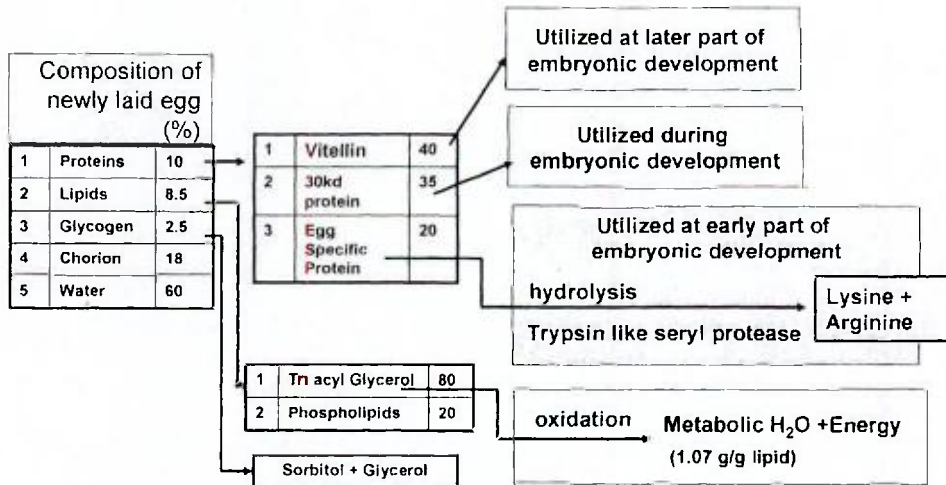


Fig. 7. Table indicating chemical constituents of freshly laid eggs and their utilization.

Fig. 7. Tableau indiquant les constituants chimiques des œufs venant d'être pondus et leur utilisation.

a. Glycogen:

Glycogen is the reserve carbohydrate of the cell. In cells it is broken down and built up from glucose-1-phosphate by means of phosphorylase. In the digestive system it is broken down by

glycosidase to glucose. Newly laid diapause destined eggs have about 2.5% of its constituents as glycogen. There is a tendency for glycogen content to be higher in Japanese than Chinese races.

b. Trehalose / Trehalase / Trehalase inhibitor:

A single injection of trehalase inhibitor, **trehazolin** into 5 day old pupae (40µg/g body wt) did not interfere with the accumulation of proteins and lipids, but markedly reduced glycogen content in eggs accompanied by a remarkable increase in hemolymph trehalose levels. In these eggs glycogen content was reduced to a trace level. The reduced glycogen content was almost restored to the control level by injection of glucose but not by trehalose. However, injection of trehazolin never affected diapause induction by the hormone, despite considerably reduced glycogen content in these eggs (Katagiri *et al.*, 1998).

c. Sorbitol:

In diapausing eggs of the silkworm, *Bombyx mori*, activity of NAD-sorbitol dehydrogenase (EC 1.1.1.14, SDH) is almost negligible. SDS-PAGE and immunoblotting analyses using the SDH antiserum showed that SDH biosynthesis is induced by acclimation at 5 °C in diapause eggs of *B. mori* (Niimi and Yaginuma, 1992). The *in vitro* experiments revealed that sorbitol directly inhibits the development of embryos explanted from diapausing eggs but has no effect on the development of embryos from prediapause eggs. Neither alanine nor diapause hormone prevent isolated embryos from developing (Iwata *et al.*, 2005a). The development of embryos derived from diapausing eggs was strongly inhibited by the addition of either sorbitol or trehalose (0.2M concentration) to the culture medium. This inhibitory effect disappeared when the embryos were transferred to a control medium which did not contain either sorbitol or trehalose, indicating that the inhibitory reactions caused by both substances are reversible. Glycerol, mannitol or glucose were moderately effective for inhibition. Sorbitol present in diapausing silkworm eggs does not appear to serve as an antifreeze, but as a strong arresting factor of embryonic development. The decrease in sorbitol releases the embryos from diapause at the termination of diapause (Yu *et al.*, 1991; Horie *et al.*, 2000a,b). Within 3 hrs after oviposition in diapausing eggs, polyol (Sorbitol and glycerol) content was below 4µM/g. Polyols increased during the first 40 chilling days, and then reached a peak. Polyol content was higher in Japanese than Chinese races, and Chinese races showed higher residues of glycogen content. Hybrid eggs were more preservation tolerant at 5°C than their parental eggs after diapause termination, but their sugar content was not significantly different. (Yu *et al.*, 1991).

d. Egg Proteins:

Two types of high molecular weight proteins (vitellogeneins and egg-specific-proteins) are sequestered in the yolk spheres of the oocytes during vitellogenesis. Vitellogenins are produced in the fat body during the pupal to adult transformation. The Egg-specific-proteins are synthesized in the follicle cells (Goldsmith and Kafatos, 1984)

B.mori vitellin, the egg storage form of vitellogeneins sediment at 13.5 S, have a native size of about Mr 440,000 and consists of two sub-units in a 1:1 ratio, viz., VITL-H of Mr ~180,000 and VITL-L of Mr ~42,000 (Izumi *et al.*, 1980). Vitellin is a tetramer composed of two molecules of each sub-unit. VITL-H and VITL-L are translated from different mRNAs (Izumi and Tomino, 1983). Vitellin remains constant until about day six or seven and then fall to about 50% of the initial level before hatching. Yamashita and Irie (1980) suggests that the vitellin is not required for the normal embryogenesis and larval development.

Egg-specific-protein (ESP) is a glycolipoprotein of about Mr 125,000 composed of single type of sub-units of about Mr 55,000 (Irie and Yamashita, 1983). It comprises of 14% of soluble proteins

in newly laid eggs and has been localized in follicle cells and yolk spheres of developing oocytes. Irie and Yamashita (1980) have demonstrated that the amount of ESP decreases slowly in early embryos until about day-six, then rapidly declines to trace-levels by day-nine just before hatching. Dorel and Coulon (1988) and Coulon and Dorel (1991) report that a set of heat-shock proteins of hsp 70 family was synthesized in diapausing and non-diapausing development at the early germ-anlage stage; by contrast, protein 61 (P61; 61 kDa) was synthesized only in the diapausing gastrula stage. The synthesis of P61 decreased during days at 5 °C. Thereafter, the synthesis of the hsp 70 family at 5 °C was observed. After the artificial prevention of diapause, P61 synthesis was not induced at the gastrula stage, whereas the hsp 70 family was enhanced in the 6 hr following the preventive treatment. P61 was synthesized only after treatments were ineffective in preventing diapause and in inducing hsp 70. They described P61 as a "diapause arrest-associated protein."

e. Glycoprotein:

An ATPase EA4 is a glycoprotein containing N-linked oligosaccharide and acts as timer-protein (Time Interval Measuring Enzyme (TIME)) in measuring the time. PIN binds to EA4, forming an equimolar complex and holds the timer. The dissociation of the complex when exposed to cold sets the time running. When PIN completely dissociates from EA4, the latter becomes free to regulate developmental function. (Tani *et al.*, 2001). The TIME-EA4, from silkworm diapause eggs of pure strain C108, *Bombyx mori*, has glycosylated chain as tetrasaccharide (Man(2)GlcNAc(2)) attaching to the Asn(22) of T3 peptide from tryptic digests. On the other hand, from Showa silkworm has a pentasaccharide (Man(3)GlcNAc(2)) on T3 at the same linkage site (Pitchayawasin *et al.*, 2004).

f. Caesin:

The studies on phosphorylation activities of casein kinase 2 (CK2) (Yamamoto *et al.*, 2005) during early embryonic development stages until 60 hrs after oviposition indicated that, in nondiapause eggs, the phosphorylated signals were found at each stage and became progressively stronger through each stage. On the other hand, in diapause eggs, the strongest phosphorylated signals were found at approximately 12 to 24 hr after oviposition and became progressively weaker through each stage. The cDNAs encoding alpha- and beta-subunit of CK2 had 342 and 220 amino acid residues respectively. RT-PCR indicated that these genes were expressed in non-diapause and diapause eggs and the changes in CK2 activity are regulated mainly at the level of post-transcription during embryonic development in *Bombyx mori* (Yamamoto *et al.*, 2005).

g. Trypsin :

Baba *et al.* (2001) observed that very fast tryptic degradation of the silkworm diapause hormone proceeded by cleavage at Arg23 and finally at Arg15. As the C-terminal structure of DH was essential for exhibiting bioactivity, the first cleavage caused rapid inactivation of the hormone. This tryptic digestion was strongly suppressed by adding VAP-map, a synthetic analog of the cuticular peptide of silkworms, Bm ACP-6.7 (VAP-peptide), which is a natural synergist of DH. VAP-map suppressed the enzymic reaction by interacting with the substrate, but not with the enzyme.

h. Oxygen:

In non-diapause eggs at 25 °C, O₂ uptake takes place in three phases, corresponding to morphogenetic processes. In diapause eggs at 25 °C, O₂ uptake shows a peak (100 µl/g eggs/h) at 1 day and then sharply drops to reach a level of 8-10 µl/g eggs/h at 10 days and thereafter. Chorion acts as the barrier of Oxygen in diapausing eggs (Okada, 1971). When eggs were exposed to 5 °C for varying periods, the O₂ uptake remains at 6 µl/g eggs/h. immediately after warming to 25 °C, the rates increased after a lag phase. In HCl-treated eggs, O₂ uptake increases immediately after acid-treatment. The highly increasing O₂ uptake at 25 °C coincides with termination of diapause

(Yaginuma and Yamashita, 1999). However, Sonobe and Yamada (2004) opine that the increase in oxygen permeability of the chorion is not a pre-requisite for the termination of the diapause and resynthesis of glycogen from 2 polyols.

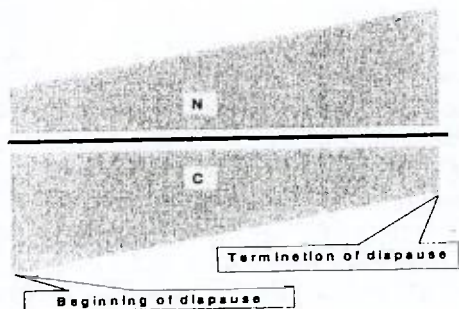


Fig. 8. Diagrammatic representation of N/C ratio during different phases of diapause.

Fig. 8. Diagramme du ratio N/C pendant les différentes phases de la diapause.

i. Carbon/Nitrogen (C/N) Ratio:

The ratio of Carbon (C) (glycogen and lipid) to Nitrogen (N) (Protein) of diapausing eggs is low while the ratio is high in non-diapausing eggs (Fig.8) (Morohoshi, 2000).

SUMMARY

Diapause phenomenon is an adaptation evolved by animals to tide over environmental conditions which are not congenial for sustenance of life. The mulberry silkworm *Bombyx mori*, has adopted embryonic diapause during the egg stage. In silkworm, diapause phenomenon is determined long before the embryo is formed by the mother. Diapause phenomenon may be Facultative (Strictly genetic) or Obligatory (gene expression modified by environment) types. The silkworms are classified on the basis of voltinism as Univoltines, Bivoltines and Multivoltines [or Polyvoltines]; depending upon the number of generations they undergo in a year. In univoltines and bivoltines, the embryos undergo hibernation after blastoderm stage but the polyvoltine eggs do not undergo hibernation. There are many differences between diapause type and non-diapause type of silkworm eggs. The expression of diapause depends upon the HP (hibernation potency) value of the silkworm, which ranges between 0-12. The induction, maintenance and termination of diapause are distinct stages involved in the embryonic diapause process. The induction starts at the Blastoderm stage i.e., Stage-4 in the 30 stage developmental scale. Diapause can be subdivided into 5 stages.

Cytochrome oxidase subunit I (COI) mRNA transcript gradually increases in diapause-activated eggs during early embryogenesis. During the diapause stage, glycogen is converted into polyols. During termination of diapause, the levels of Sorbitol declines by the activation of NAD-Sorbitol Dehydrogenase for the re-synthesis of glycogen. Even though there is no relation between serosal pigmentation and diapause, generally, diapausing eggs develop pigmentation. However, Indonesian type of polyvoltine eggs also exhibit pigmentation (pnd). Brown color of the egg is due to the ommochrome pigment formed from Tryptophane metabolism.

There are many genes reported to have influence on the diapause phenomenon. The important ones are; V, M, Lm, Hs, pnd, pnd2, npnd, ln, bp, BomDH, DH-PBAN, Samui, NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase gene, Sorbitol Dehydrogenase gene, Trehalase gene and Inhibitor of Diapause gene (Id). Brain (BR), corpus allatum (CA), prothoracic gland (PG) and sub-esophageal ganglion (SG) are the neuro-endocrine glands involved in the process of diapause. Embryonic diapause of *Bombyx mori* in next generation was determined by DH mRNA content in SG. Temperature and lights

are the major environmental cues which modify the expression of genes through the neuro-endocrine glands.

Diapause Hormone (DH) is produced by SG and transferred to the corpora cardiaca-corpora allata (CC-CA) complex. It is an amidated peptide belonging to FXPRLamide family and consists of two active principles of peptides, DH-A and DH-B with estimated molecular weights of 3300 ± 400 and 2000 ± 200 kDa. The minimum structure of diapause hormone is: Pro-Arg-Leu-NH₂. This hormone acts on the maturing oocytes in the pupal stage and causes development to stop once the embryo has reached about 12,000 cells. Polyvoltines also produce DH, however the activity is weaker compared to bivoltines. Males have higher concentration of DH. By injecting anti-diapause hormone rabbit serum into diapause type of pupae, non-diapause eggs can be induced. The dopamine concentrations are higher in diapause-type than non-diapause-type larvae and pupae. In non-diapause eggs, 20-hydroxyecdysone (20E) is produced by the conversion of maternal conjugated ecdysteroids to active free ecdysteroids by EPPase, and by de novo biosynthesis. But, in diapause eggs, neither of these metabolic processes occurs. EPPase is localized in the cytosol of yolk cells. The bulk of maternal ecdysteroid-phosphates is bound to vitellin and stored in yolk granules. Newly laid diapause destined eggs have about 2.5% of its constituents as glycogen which is converted to glycerol and Sorbitol during diapause. Sorbitol present in diapausing silkworm eggs does not appear to serve as an antifreeze, but as a strong arresting factor of embryonic development. The decrease in sorbitol releases the embryos from diapause at the termination of diapause. The ratio of Carbon (glycogen and lipid) to Nitrogen (Protein) of diapausing eggs is low while the ratio is high in non-diapausing eggs.

Chen *et al.* (1988) suggest that all silkworm races are of diapause type. In polyvoltines there is inhibition at SG level. There are two views related to the question whether embryo is diapausing or the yolk is forcing the embryo not to grow, Umeya (1937a, 1937b, 1938, 1939) opines that in the diapausing egg, although the embryo is always ready to grow, some unfavorable condition of the yolk surrounding the embryo inhibits its development beyond a certain stage, while Miura (1932a, 1932b, 1938) claims that not only the yolk, but also the embryo itself remains inactive in the diapausing egg. Muroga (1951) explains that, the 'inhibitory substance', may not necessarily exist continuously in diapausing eggs; it may be present for a short time only, acting at a very early stage of embryonic development, and this may be sufficient for the determination of diapause. Once the embryo enters diapause state, it becomes the property of the embryo itself.

The termination of diapause necessitates consumption of the inhibitory substance under the effect of low temperature (Muroga, 1951). Fujiwara *et al.* (2006), indicated that ERK/MAPK (Extra-cellular Signal Regulated Kinase/ Mitogen-activated Protein Kinase) regulates ecdysteroid and sorbitol metabolism for embryonic diapause termination though gene transcription of key enzymes EPPase and sorbitol dehydrogenase-2 in silkworm, *Bombyx mori*.

A set of heat-shock protein (hsp) 70 family was synthesized in diapausing and non-diapausing development at the early germ-anlage stage; by contrast, 61 kDa protein (P61) was synthesized only in the diapausing gastrula stage. The synthesis of P61 decreased during days at 5 °C. Thereafter, the synthesis of the hsp 70 family at 5 °C was observed. After the artificial prevention of diapause, P61 synthesis was not induced at the gastrula stage, whereas the hsp 70 family was enhanced in the 6 hr following the preventive treatment (Coulon and Dorel, 1991).

Yamamoto *et al.* (1978) describe that in the pigmented and non-diapausing egg mutant (*pnd*) there is a single recessive mutation of a gene in the 11th chromosome as a result of which the embryo never enters diapause. Katsumata (1968) and Sonobe and Otake (1986) indicate that when such homozygous *pnd* type of female is crossed with normal diapausing type male, then the eggs show normal diapause behavior. They opine that there is a possibility that in the eggs which have been exposed to diapause factor during ontogenesis, the specific protein synthesized by *pnd*⁺ gene (about 22 kDa) may stimulate the synthesis of diapause associated proteins. Rajendra Mundkur *et al.* (2004) described that when normal diapausing type of female is crossed with the males of silkworm race

KS-10, diapause was prevented in the eggs. The authors suggested that the silkworm race KS-10 has a dominant 'Inhibitor of diapause' gene 'Id', which supersedes the process predetermined by the diapause factor during embryogenesis.

Andrewartha (1952) opines that diapause is a convergent trait that has evolved independently several times in the course of evolution. Toyama (1906), described diapause as a maternally inherited biological event under the control of sex-linked genes. Sonobe and Odake (1986) have proposed two theories related to the embryonic diapause in silkworm: (i) diapause is the phenomenon predetermined by the diapause factor during embryogenesis, and (ii) diapause is the process determined by the genetic factor during embryogenesis. The present authors propose a new theory related to diapause specially taking paternal influence into account. "diapause is the phenomenon determined by environment, maternal genes and paternal genes synergistically or exclusively". Fig.9 show a set of three overlapping circles representing Environment, Maternal genes and Paternal genes. The diapause phenomenon can be one of the following seven types:

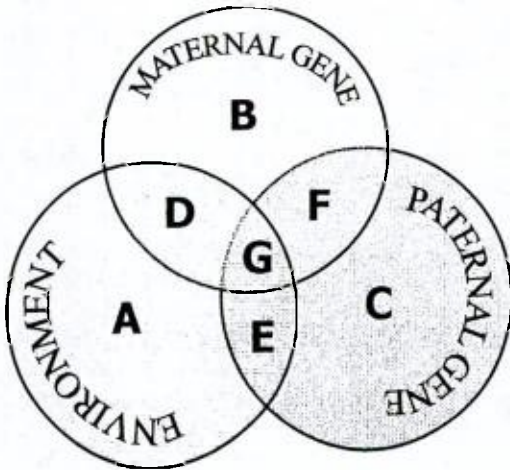


Fig. 9. Schematic representation different types of diapause.

Fig. 9. Représentation schématique des différents types de diapause.

1. Type-A: Exclusively determined by environment:

One of the examples for this kind of diapause is the Indian multivoltine race Pure Mysore. Normally, the eggs of Pure Mysore are non-pigmented and non-diapausing. However, during colder (~20°C) and darker (~10D:14L) conditions, about 11-29% of the eggs turn pigmented and enter diapause. Shimizu *et al.* (2005) report that in temperate region, when multivoltine races namely Annan, Cambodge, Pure Mysore and Ringestsu were reared under low temperature (20°C) and darker (12L:12D) photoperiodic conditions during late age rearing, these races lay 70-90% diapausing eggs.

2. Type-B: Exclusively determined by maternal genes:

In this type diapause is induced exclusively by maternal genes irrespective of the environmental conditions. E.g., European univoltine races, which are exclusively determined by maternal genes and least affected by environmental cues. This behavior is one of the tests to determine whether a given race is a univoltine or a bivoltine.

3. Type-C: Determined exclusively by paternal genes:

Example for this kind of behavior is the race KS-10. When any normally diapausing type of females are mated with KS-10 males, they lay non-diapausing eggs irrespective of the environmental cues (Rajendra Mundkur *et al.*, 2004).

4. Type-D: Determined by maternal genes but modified by environment:

In this type, diapause is determined by maternal genes but synergistically modified by environmental conditions. E.g., Japanese bivoltines, which are strongly controlled by maternal genes but modified by environmental cues, therefore they lay alternating diapause and non-diapause type of eggs (Tazima, 2001).

5. Type-E: Determined by paternal genes but modified by environment:

Yoshitake and Hashiguchi (1969) showed that Indonesian type of eggs when incubated at high temperature produce pigmented non-diapause type of eggs (*pnd*) and when incubated at lower temperature, produce non-pigmented non-diapause type of eggs (*npnd*).

6. Type-F: Determined by maternal genes but modified by paternal genes:

(or *vice-versa*), as described by Katsumata (1968), Sonobe and Otake (1986) and Sonobe (1989). Katsumata explains that in the case of a Indonesian race SI, eggs do not enter diapause because of a mutant maternal recessive *pnd* (pigmented non-diapause) gene. However, when such females are crossed with normal Japanese bivoltine males, the eggs become normally diapausing in heterozygous condition. He also reported that when normal Japanese bivoltine (pigmented diapausing-*pd*) females were crossed with the *pnd* type of males of Indonesian polyvoltine race, Cambodge, resulting eggs showed normal pigmented diapausing (*pd*) character. When *pnd* type of females were crossed with *pd* type of males, then also the resulting eggs showed pigmented diapausing (*pd*) character (Katsumata, 1968). Sonobe and Otake (1986) also reported that heterozygous *pnd* (*pnd*+) shows normal diapause character.

7. Type-G: Mutually determined by maternal genes, paternal genes and environment:

This type of diapause behavior is yet to be reported. However, theoretically this type is also possible and hence proposed.

To occupy the diverse niche like, tropical warmer conditions where the mulberry food is available throughout the year and temperate cooler conditions where the food is not available for about six months in a year, the silkworms have adapted functional modifications. Diapause is a very effective switch to 'pause' the development till the favorable conditions prevail. Unlike in other animals, diapause in mulberry silkworm is unique because, it is not the individual which is exposed to the unfavorable conditions resorting to diapause. It is the parents who live in the favorable conditions forecast that the next season would be unfavorable and therefore the continuation of the next generation should be delayed. In the temperate conditions this kind of forecast works out to be true. A lot of studies are undertaken in the temperate zone, the data of which are sufficient to reasonably explain the mechanism of diapause under such conditions. However, if the same variety of the temperate silkworm is shifted to tropical (Indian) niche, the forecast becomes false. But the eggs undergo diapause in every generation though the conditions are suitable for the continuation of the life. It is hypothesized that to overcome this kind of paradox, the nature has evolved another functional adaptation in tropical conditions by activating a special gene to nullify the results of all the earlier forecasts, as in case of KS-10. The invention of paternal inheritance of voltinism has opened up new areas in the subject of diapause. A lot of work is yet to be undertaken to understand the mechanism of paternal inheritance of voltinism. This is very significant because, especially under Indian conditions, more than 95% of the raw silk produced is from the non-diapausing type of hybrids (locally

known as cross-breeds). Maintenance and overcoming of diapause in bivoltine hybrids are highly skilled activities which have many bottle necks in the level of implementation. Therefore the tool of naturally overcoming of the diapause through paternal genes may act as a bridge between moderately productive non-diapausing crossbreeds and high productive diapausing bivoltines.

REFERENCES

- ANDREWARTHA M.G. (1952) DIAPAUSE IN RELATION TO THE ECOLOGY OF INSECTS. *BIO. REV.*, 27:50-107.
- BABA H., KATSUZAKI H., KOMIYA T., YAMASHITA O., IMAI K. (2001) Rapid degradation of the silkworm diapause hormone by trypsin and its suppression by VAP-map, a synthetic analog of the cuticular peptide of silkworm, Bm ACP-6.7 (VAP-peptide). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65(5):1033-1037.
- CHEN J.H., YAGINUMA T., YAMASHITA O. (1988) Effect of diapause hormone on cyclic nucleotide metabolism in developing ovaries of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp Biochem Physiol B*, 91(4):631-637.
- COULON-BUBLEX M., DOREL C. (1991) The arrest of embryogenesis at gastrula stage in the diapausing silkworm, *Bombyx mori* is related to the synthesis of protein P61. *Roux's Arch Dev Biol* 199:469-475.
- DENLINGER D. L. (1985) Hormonal control of diapause. In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, Vol. 8 (Ed. by G. A. Kerkut & L. I. Gilbert), pp. 353-411. Oxford: Pergamon Press.
- DOIRA H. (1985) Linkage maps of *Bombyx mori* – the status quo in 1983. *Sericologia*, 23:45-269
- DOREL C., COULON M. (1988) Regulation of gene expression in prediapausing embryos of the silkworm, *Bombyx mori*: pattern of protein synthesis. *Cell Differ.*, 23(1-2):87-92.
- FUJIWARA Y., TANAKA Y., IWATA K., RUBI R.O., YAGINUMA T., YAMASHITA O., SHIOMI K. (2006) ERK/MAPK regulates ecdysteroid and sorbitol metabolism for embryonic diapause termination in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 526:569-575.
- FUKUDA S. (1951) Factors determining the production of non-diapause eggs in the silkworm. *Proc. Japan. Acad.*, 27: 582-586.
- FUKUDA S., SONOBE H. (1973) Diapause of eggs produced by the ovary implanted in the male of *Bombyx mori* L. *C.R. Seances Soc. Biol. Fil.*, 167(3):594-597.
- GOLDSMITH M.R., KAFATOS F.C. (1984) Developmentally regulated genes in silkmoths. *Ann Rev Genet.*, 18:443-487.
- HARIZUKA M. (1947) Genetic and physiological studies on the black pupa of the silkworm, *Bombyx mori*. *Bull. Sericul. Exp. Stn.*, 12: 530-533.
- HASEGAWA K. (1957) The diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Nature, Lond.*, 179: 300-301.
- HASEGAWA K. (1964) Studies on the Mode of Action of the Diapause Hormone in the Silkworm, *Bombyx Mori* L : II. Content of Diapause Hormone in the Suboesophageal Ganglion. *Journal of Experimental Biology*, 41:55-63.
- HIROBE T. (1954) On lethal spindle egg in silkworm, *J. Seric. Sci. Jpn.*, 21: 122.
- HORIKE N., SONOBE H. (1999) Ecdysone 20-monooxygenase in eggs of the silkworm, *Bombyx mori*: enzymatic properties and developmental changes. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 41(1):9-17.
- HORIE Y., KANDA T., MOCHIDA Y. (2000a) Sorbitol as an arrester of embryonic development in diapausing eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 46(6):1009-1016.
- HORIKE N., TAKEMORI H., NONAKA Y., SONOBE H., OKAMOTO M. (2000b) Molecular cloning of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase from silkworm eggs- Its involvement in 20-hydroxyecdysone biosynthesis during embryonic development *Eur. J. Biochem.*, 267: 6914-6920.

- HWANG J.S., GO H.J., GOO T.W., YUN E.Y., CHOI K.H., SEONG S.I., LEE S.M., LEE B.H., KIM I., CHUN T., KANG S.W. (2005) The analysis of differentially expressed novel transcripts in diapausing and diapause-activated eggs of *Bombyx mori*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 59(4):197-201.
- ICHIKAWA T., AOKI S., SHIMIZU I. (1997) Neuroendocrine control of diapause hormone secretion in the silkworm, *Bombyx mori*, *J. Insect Physiol.*, 43(12):1101-1109.
- IMAI K., NOMURA T., KATSUZAKI H., KOMIYA T., YAMASHITA O. (1998) Minimum structure of diapause hormone required for biological activity. *Biosci Biotechnol. Biochem.*, 62(10):1875-1879.
- IMAI K., KONNO T., NAKAZAWA Y., KOMIYA T., ISOBE M., KOGA K., GOTO T., YAGINUMA T., SAKAKIBARA K., Hasegawa K., Yamashita O. (1991) Isolation and structure of diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Proceedings of the Japan Academy*, B67: 98-101.
- IRIE K., YAMASHITA O. (1980) Changes in vitellin and other yolk proteins during embryonic development in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 26: 811-817.
- IRIE K., YAMASHITA O. (1983) Egg specific proteins in the silkworm, *Bombyx mori*: Purification, properties, localization and titre changes during oogenesis and embryogenesis. *Insect Biochem.*, 13: 71-80.
- IWATA K., FUJIWARA Y., TAKEDA M. (2005a) Effects of temperature, sorbitol, alanine and diapause hormone on the embryonic development in *Bombyx mori*, in vitro tests of old hypotheses. *Physiological Entomology*, 30(4):317-322.
- IWATA K., SHINDOME C., KOBAYASHI Y., TAKEDA M., YAMASHITA O., SHIOMI K., FUJIWARA Y. (2005b) Temperature-dependent activation of ERK/MAPK in yolk cells and its role in embryonic diapause termination in the silkworm *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 51(12):1306-1312.
- IZUMI S., TOMINO S. (1983) Vitellogenin synthesis in the silkworm, *Bombyx mori*: Separate mRNAs encode two sub-units of vitellogenin. *Insect Biochem.*, 13:81-85.
- IZUMI S., TOMINO S., CHINO H. (1980) Purification and molecular properties of vitellin from the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*, 10:199-208.
- KATAGIRI N., ANDO O., YAMASHITA O. (1998) Reduction of glycogen in eggs of the silkworm, *Bombyx mori*, by use of a trehalase inhibitor, trehalosin, and diapause induction in glycogen-reduced eggs. *J. Insect Physiol.*, 44(12):1205-1212.
- KATSUMATA F. (1968) Non maternal inheritance in Voltinism observed in the crossing experiments between Indonesian polyvoltine and Japanese bivoltine races of silkworm, *Bombyx mori*, *J. Seric. Sci. Jpn.*, 37: 453-461.
- KUBOTA I., ISOBE M., GOTO T., HASEGAWA K. (1976) Molecular size of the diapause hormone of the silkworm, *Z Naturforsch.*, 31(3-4):132-134.
- LEES A.D. (1955) *The physiology of diapause in Arthropods*. Cambridge University Press, London.
- MAKKA T., SEINO A., TOMITA S., FUJIWARA H., SONOBE H. (2002) A possible role of 20-hydroxyecdysone in embryonic development of the silkworm *Bombyx mori*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 51(3):111-120.
- MIURA E. (1932a) Studies on the yolk cells in the diapausing, non-diapausing and artificial non-diapausing silkworm eggs. (In Japanese.) *Bull. Kyoto Imp. Coll. Seric.*, 1 (3): 1-36.
- MIURA E. (1932b) Principles of artificial hatching in the silkworm. (Preliminary report.) (In Japanese). *Bull. Kyoto Imp. Coll. Seric.*, 1 (3), 37-42.
- MIURA E. (1938) Questions to Dr Umeya concerning his criticism on the hypothesis of active and passive growths of the silkworm embryo. (In Japanese.) *Sanshikaihō*, 47 (559): 35-39.
- MORIBE Y., NIIMI T., YAMASHITA O., YAGINUMA T. (2001) Samui, a novel cold-inducible gene, encoding a protein with a BAG domain similar to silencer of death domains (SODD/BAG-4), isolated from *Bombyx* diapause eggs. *Eur. J. Biochem.* 268: 3432-3442.
- MORITA A., NIIMI T., YAMASHITA O. (2003) Physiological differentiation of DH-PBAN-producing neurosecretory cells in the silkworm embryo. *J. Insect Physiol.*, 49(12):1093-1102.

- MOROHOSHI S. (1976) Growth Physiology in silkworm Tokyo University press, Tokyo.
- MOROHOSHI S. (2000) Development Physiology of Silkworms. Translation of Second Japanese edition of Kaiko no Hatsuioku Seiri by Morohoshi S.,(1979). Oxford and IBH Pub.Co.Pvt.Ltd, New Delhi.
- MURAKAMI A. (1986) Changes in embryonic diapause in the tropical multivoltine silkworm stock Cambodge. Abstract : 34th Annual meetings of the Tokyo district Sericul.Sci.Soc.27.
- MURAKAMI A. (1988) Ecogenetical studies on tropical mulberry *Bombyx mori* Proceedings of the Int. Cong. on Tropical Seric. Practices Bangalore, India, 11-23.
- MURAKAMI A. (1990) Insect adaptation and genetics- A special reference to *Bombyx* egg diapause. Nat. Inst. Seric. Entomol. Sci., 4: 43-58.
- MUROGA H. (1943) Heredity relationship of mono-voltine and tetra-voltine, *Nichisanzatsu*, 14:237-249.
- MUROGA H. (1951) On the consumption coefficient of the inhibitory substance in the silkworm egg. (In Japanese.) J. Seric. Sci., Tokyo, 30:92-94.
- NAGATOMO T. (1942) Kaiko no kasei no iden tsuite (regarding the heredity of voltinism in silkworms), *Nichisanzatsu*, 13:114-115.
- NAGATOMO T. (1953) Genetic studies on the voltinism in the silkworm, *Bombyx mori*, Bull.Fac.Agric.Kagoshima Univ., 2:1-70.
- NIIMI T., YAGINUMA T. (1992) Biosynthesis of NAD-sorbitol dehydrogenase is induced by acclimation at 5 degrees C in diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. Comp Biochem Physiol B., 102(1):169-173.
- NIIMI T., YAMASHITA O., YAGINUMA T.(1993) A cold-inducible *Bombyx* gene encoding a protein similar to mammalian sorbitol dehydrogenase. Yolk nuclei-dependent gene expression in diapause eggs, Eur. J. Biochem.,213(3):1125-31.
- NOGUCHI H., HAYAKAWA Y. (2001) Dopamine is a key factor for the induction of egg diapause of the silkworm, *Bombyx mori*. Eur. J. Biochem., 268: 774-780.
- OKADA M. (1971) Role of the chorion as a barrier to oxygen in the diapause of the silkworm, *Bombyx mori* L, *Experientia*, 27(6):658-660.
- PINYARAT W., SHIMADA T., XU W.H., SATO Y., YAMASHITA O., KOBAYASHI M. (1995) Linkage analysis of the gene encoding precursor protein of diapause hormone and pheromone biosynthesis-activating neuropeptide in the silkworm, *Bombyx mori*, *Genet Res.*, 65(2):105-111.
- PITCHAYAWASIN S., ISOBE M., TANI N., KAI H. (2004) Structure of pentasaccharide of glycopeptide from TIME-EA4, N-glycoprotein in silkworm diapause eggs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14(10):2527-2531.
- RAJENDRA MUNDKUR, MALLESHA MURTHY, MAHADEVAPPA, RAGHURAMAN R., BONGALE U.D. (2004) Prevention of diapause in bivoltine eggs of the silkworm, *Bombyx mori* L., through a cross with the race KS-10 as male parent. *Int.J.Indust.Entomol.*, 9(1):107-109.
- SAITO H., TAKEUCHI Y., TAKEDA R., HAYASHI Y., WATANABE K., SHIN M., IMAI K., ISOBE M., YAMASHITA O. (1994) The core and complementary sequence responsible for biological activity of the diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Peptides*, 15:1173-1178.
- SATO Y., OGUCHI M., MENJO N., IMAI K., SAITO H., IKEDA M., ISOBE M., YAMASHITA O.(1993) Precursor polypeptide for multiple neuropeptides secreted from the suboesophageal ganglion of the silkworm *Bombyx mori*: characterization of the cDNA encoding the diapause hormone precursor and identification of additional peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 90(8):3251-3255.
- SAUNDERS D.S. (1981) Insect Photoperiodism- the clock and the counter:a review, *Physiol.Ent.*, 6:99-116.
- SHIMIZU K., HIROKAWA M., TATEMATSU K., KASEGAWA E. (2005) Effective induction of egg diapause in multivoltine silkworm races by low temperature and short photoperiod rearing condition. *J.Seric.Sci.Jpn.*, 74(1): 1-7.

- SHIOMI K., ISHIDA Y., IKEDA M., SATO Y., SAITO H., IMAI K., ISOBE M., YAMASHITA O. (1994) Induction of non-diapause eggs by injection of anti-diapause hormone rabbit serum into the diapause type of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol., 40:693-639.
- SONOBE H. (1989) Studies on embryonic diapause in the pnd mutant of the silkworm, *Bombyx mori*: Characterization of protein synthesis during early development. Zool Sci., 6(3):515-522.
- SONOBE H., ODAKE H. (1986) Studies on embryonic diapause in the pnd mutant of the silkworm, *Bombyx mori*; V. Identification of a pnd+ gene-specific protein. Roux's Arch Dev Biol., 195:229-235.
- SONOBE H., YAMADA R. (2004) Ecdysteroids during early embryonic development in silkworm *Bombyx mori*: metabolism and functions. Zoolog. Sci., 21(5):503-516.
- SU Z.H., IKEDA M., SATO Y., SAITO H., IMAI K., ISOBE M., YAMASHITA O. (1994) Molecular characterization of ovary trehalase of the silkworm, *Bombyx mori* and its transcriptional activation by diapause hormone. Biochim. Biophys. Acta., 1218(3):366-374.
- TAKAMI T. (1969) A general text book of silkworm egg. Zenkoku Sanshu Kyokai, Tokyo, Japan.
- TAKAMI T., KITAZAWA T. (1960) External observation of embryonic development in the silkworm. Sanshi Shikenjo Hokoku, Sericultural Expt. Stn. Tech. Bull. 75:1-31.
- TANI N., KAMADA G., OCHIAI K., ISOBE M., SUWANS., KAI H. (2001) Carbohydrate moiety of Time-Interval measuring enzyme regulates time measurement through its interaction with Time-Holding Peptide PIN1, J. Biochem., 129: 221-227.
- TAZIMA Y. (1986) "The Genetics of the Silkworm", Logos Press, Academic Press.
- TAZIMA Y. (2001) Improvement of biological functions in the silkworm, (Translated from Japanese), Oxford & IBH Pub. Co. Ltd. New Delhi.
- TAZIMA Y., ONUMA A. (1967) Experimental induction of androgenesis, gynogenesis and polyploidy in *Bombyx mori* L. by treatment with CO gas. J. Seric. Sci. Jpn., 36:286-291.
- TZENOV P., PETKOV P. (1998) Effect of some environmental factors during different stages of the silkworm (*Bombyx mori*) development on the penetrator and expression rate of the pnd gene responsible for diapause. J. Anim. Sci. (Suppl):92-95.
- TOYAMA K. (1906) Mendel's law of heredity as applied to the silkworm crosses. Biol. Zentralbl., 26: 321-334.
- TOYAMA K. (1913) Maternal inheritance and Mendelism, J. Gen., 2:351-405.
- UMEYA Y. (1925) On the experiments of ovarian transplantation and blood transfusion in the silkworm with special reference to the alternation of voltinism. Jpn. J. Genet., 3: 155-182.
- UMEYA Y. (1937a) Preliminary note on experiments of ooplasm transfusion of silkworm-eggs with special reference to the development of embryo. Proc. Imp. Acad. Japan, 13: 378-380.
- UMEYA Y. (1937b) Studies on the preservation of the diapausing silkworm egg. (In Japanese.) Bull. Seric. Dept. Agric. Exp. Sta. Chosen, 4: 1-36.
- UMEYA Y. (1938) Answers to Prof. Miura concerning development of the silkworm egg. (In Japanese.) *SanshikaihO*, 47 (560): 33-38.
- UMEYA Y. (1939) Experiments on the artificial development of the diapausing silkworm egg. (In Japanese.) Proc. Jap. Ass. Adv. Sci., 14:504-508.
- Xu W., Sato Y., YAMASHITA O. (1995) Cloning of the diapause hormone gene of the silkworm (*Bombyx mori*), 22(3):178-184.
- XU W.H. (1999) Molecular mechanism of diapause in *Bombyx mori*. 2. Diapause determination and expression of diapause hormone gene in pupal stage. Yi Chuan Xue Bao, 26(2):107-111.
- YAGINUMA T., YAMASHITA O. (1999) Oxygen consumption in relation to sorbitol utilization at the termination of diapause in eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. J Insect Physiol., 45(7):621-627.
- YAMADA R., SONOBE H. (2003) Purification, kinetic characterization, and molecular cloning of a novel enzyme ecdysteroid-phosphate phosphatase. J. Biol. Chem., 278(29):26365-73.
- YAMAMOTO T., GOTO T., HIROBE T. (1978) Genetical studies of the pigmented and non-diapausing egg mutant in *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn., 47:181-185.

- YAMAMOTO T., KANEKATSU M., NAKAGOSHI M., KATO T., MASE K., SAWADA H. (2005) Casein kinase 2 during early embryonic development in silkworm, *Bombyx mori*: cDNA sequence, gene expression, and enzyme activity. *DNA Seq.*, 16(6):446-455.
- YAMASHITA O. (1996) Diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*: Structure, gene expression and function. *Journal of Insect Physiology*, 42: 669-679.
- YAMASHITA O., IRIE K. (1980) Larval hatching from vitellogenin-deficient eggs developed in male hosts of the silkworm. *Nature*, 283:385-386.
- YAMASHITA O., HASEGAWA K. (1985) Embryonic diapause. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol. 1. Pergamon Press, Oxford, pp. 407-434.
- YOSHITAKE N., HASHIGUCHI T. (1969) On the diapause of Indonesian polyvoltine silkworm *Bombyx mori*. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.*, 13:206-207.
- YU S. J., HOU R. F., HSIEH F. K., DHU H.T. (1991) Comparison of sugar content in diapausing embryos of various strains of the silkworm *Bombyx mori* L. *Chinese J. Entomol.*, 11:1-12.

REVUE SUR LA DIAPAUSE, EN PARTICULIER SUR L'INFLUENCE PATERNELLE, CHEZ LE VER A SOIE, *BOMBYX MORI*

RAJENDRA MUNDKUR*, S. R. KATTI, M. V. CHANDRAKALA, CH. NARASIMHA
RAO & B. M. SEKHARAPPA

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

Toyama (1906) a défini la diapause embryonnaire chez le ver à soie, Bombyx mori comme « un évènement biologique hérité par la mère sous le contrôle des gènes liés au sexe ». Sonobe et Otake (1986) ont proposé deux théories liées à la diapause : (i) la diapause est le phénomène prédéterminé par le facteur de la diapause pendant l'embryogenèse et (ii) la diapause est le processus déterminé par le facteur génétique pendant l'embryogenèse. La découverte des gènes paternels qui assurent le processus de développement des œufs de ver à soie destinés à la diapause (Rajendra Mundkur et coll., 2004) a conduit à réexaminer le phénomène de la diapause, en accordant une attention particulière à l'héritage paternel du voltinisme. Les auteurs de cet article proposent une nouvelle théorie liée à la diapause, à savoir « la diapause est le phénomène déterminé par l'environnement, les gènes maternels et paternels de manière synergétique ou exclusive ».

INTRODUCTION

Les adaptations à l'environnement ambiant sont la réponse de tous les organismes vivants par rapport à leur existence dans la nature. Le phénomène de la diapause est une adaptation de ce type mise au point par les animaux pour surmonter les situations qui ne sont pas propices au maintien de la vie. Le phénomène est un exemple classique de la réponse des animaux aux conditions environnementales hostiles. Pendant la diapause, l'animal suspend virtuellement sa croissance, jusqu'à ce que les conditions qui sont hostiles deviennent favorables. Bien que conçu comme une adaptation à la survie, le phénomène de la diapause est gouverné ou déterminé par des facteurs génétiques qui sont induits par des signaux environnementaux.

La classe des insectes étant la plus grande classe dans le royaume animal adaptée à vivre dans différentes conditions climatiques, y compris dans les plus extrêmes, elle présente différents types de phénomènes de diapause, comme la diapause embryonnaire, la diapause larvaire, la diapause nymphale et la diapause adulte. Le ver à soie, *Bombyx mori*, l'insecte domestiqué important sur le plan économique, qui produit la soie, la reine des textiles, a adopté la diapause embryonnaire pendant le stade de l'œuf. Chez une souche typique à diapause de *Bombyx mori*, l'embryon cesse de se développer au-delà d'un certain stade et reprend son développement une fois que les conditions deviennent favorables. Ce type de phénomène de diapause est déterminé bien avant que l'embryon ne soit formé. En d'autres termes, la suspension de la continuation du développement de l'embryon est déterminée par ses parents, ce qui est un phénomène unique. Les questions qui restent sans réponse même à l'heure actuelle sont les suivantes : Pourquoi les parents doivent réguler le développement

* Auteur auquel adresser la correspondance : Dr Rajendra Mundkur, Silkworm Breeding Unit (KSSRDI), Bidadi-562 109, Ramanagar District, Karnataka, Inde. Email : Rajendra.mundkur@gmail.com

de leur descendance ? Pourquoi l'embryon n'arrive pas à contrôler son propre développement ? Denliger (1985) a pensé que cela pourrait être dû au manque de mécanisme photorécepteur et d'autres composants du centre neuro-endocrinien mature chez l'embryon, qui le fait fortement dépendre des déterminants maternels pour la régulation de la diapause. C'est un phénomène très complexe, qui présente une grande diversité parmi les insectes (Lees, 1955 ; Saunders, 1981). Le ver à soie *Bombyx mori* est classé, en fonction des régions géographiques, en races tempérées et tropicales. Elles sont classées sur la base du voltinisme en tant que monovoltines, bivoltines et multivoltines (ou polyvoltines), en fonction du nombre de générations qu'elles connaissent pendant un an. En général, les vers à soie tropicaux sont polyvoltins et les œufs polyvoltins ne subissent pas d'hibernation, ce qui signifie que les embryons se développent de manière continue et éclosent environ 10 à 11 jours après la ponte des œufs. Chez les monovoltins et les bivoltins, les embryons font une pause dans leur développement et entrent en hibernation au stade du blastoderme, 20 à 22 heures après la ponte. Les monovoltins sont des races de vers à soie tempérées et présentent un type facultatif de diapause, où les œufs présentent un phénomène de diapause, quels que soient les facteurs environnementaux. Les bivoltins sont aussi des races tempérés qui présentent un type obligatoire de diapause, où le phénomène de la diapause est modifié par les facteurs environnementaux.

Au Japon, les œufs de vers à soie éclosent après l'achèvement de l'hibernation, au printemps, (vers la mi-mai) dans un climat plus chaud à une température d'environ 20° C. Ils se transforment en papillons dans la deuxième moitié de juin et pondent des œufs. Les œufs pondus sont de couleur jaune pâle, non pigmentés et sans hibernation. Ils éclosent et croissent au début du mois de juillet, avec une température de 25-30 ° C. Ils deviennent des papillons pendant la deuxième partie du mois d'août et pondent des œufs. Les œufs pondus sont de couleur marron et à hibernation (Tazima, 1986) (Fig. 1).

Les œufs à diapause venant d'être pondus n'ont pas de pigments, comme les œufs sans hibernation, mais au bout de 10 à 20 jours au Japon, les œufs deviennent pigmentés et deviennent violet foncé. Les œufs pigmentés arrêtent leur développement à l'âge de la formation du blastoderme et entrent en repos. Les œufs traversent l'été et une fois qu'ils rencontrent le temps froid de l'hiver pendant 3 à 4 mois, ils continuent leur développement. Donc « bivoltin » au Japon est la succession de générations à diapause et sans diapause (Tazima, 2001).

On a entrepris des études complètes sur le mécanisme de la diapause dans les conditions tempérées, mais dans les conditions tropicales, les études sont rares. Dans les conditions tropicales indiennes, les bivoltins ne se comportent pas comme ils se comportent dans les conditions japonaises. Ils subissent une hibernation à chaque génération. Pendant la saison d'été, on enregistre des fréquences sporadiques de bivoltins pondant des œufs sans diapause. Inversement, pendant l'hiver, on enregistre aussi des incidences sporadiques de races de vers à soie polyvoltines pondant des œufs à diapause. En général, les femelles polyvoltines pondent des œufs sans diapause, qu'elles s'accouplent avec des mâles polyvoltins ou bivoltins. De même, les femelles bivoltines pondent des œufs à diapause, qu'elles s'accouplent avec des mâles bivoltins ou polyvoltins. La diapause est donc, un caractère hérité maternellement et les mâles n'ont pas de rôle dans la détermination du voltinisme de la descendance. Cependant, on a enregistré une exception à ce phénomène bien établi, quand des femelles bivoltines (qui sont destinées à pondre des œufs à hibernation) pondent des œufs sans hibernation quand on les accouple avec les mâles d'une race à caractère spécial, KS-10 (Rajendra Mundkur et coll., 2004). Ce type d'influence paternelle sur la diapause nécessite l'analyse du phénomène de la diapause chez le ver à soie *Bombyx mori*, d'un point de vue de son expression dans des conditions tropicales.

1. Différences entre les œufs à diapause et sans diapause :

En général, il y a beaucoup de différences entre les œufs de ver à soie à diapause et sans diapause. Certaines différences sont indiquées dans le Tableau I.

2. Potentiel d'hibernation :

Les œufs à diapause des différentes races ont une capacité différentielle de tolérance du froid. Dans les conditions tropicales indiennes, quand on induit la diapause chez la race polyvoltine Pure Mysore, elle pond environ 15 à 27 % d'œufs pigmentés, dont certains des œufs éclosent normalement, même s'ils n'entrent pas en diapause. Dans les conditions tropicales, la race bivoltine Daizo pond des œufs à diapause, mais ces œufs ne tolèrent pas le traitement au froid pendant plus de quatre mois. Ces variations pourraient être dues au potentiel d'hibernation différentiel des races. En rassemblant plusieurs données expérimentales, Nagatomo (1953) a décrit les valeurs du potentiel d'hibernation (Tableau II). Selon lui, la catégorie I, qui a une valeur de potentiel d'hibernation de 0 à 1 est toujours polyvoltine et la catégorie V, qui a un potentiel d'hibernation de 11 à 12 est toujours monovoltine, quelles que soient les conditions environnementales. Cependant, les catégories II à IV oscillent entre polyvoltin et bivoltin selon les conditions environnementales.

PROCESSUS DE LA DIAPAUSE

L'induction, l'intensification et l'achèvement de la diapause sont des étapes distinctes impliquées dans le processus de la diapause (Iwata et coll., 2005a). La figure 2 explique schématiquement le mécanisme général impliqué dans la ponte d'œufs sans diapause et à diapause chez le ver à soie.

On peut expliquer le processus dans les grandes lignes comme le montrent les figures 2A et 2B. Le graphique est basé sur les données de Morohoshi (2000) et Tazima (2001). Quand la température d'élevage est élevée (au-dessus de 25° C) et que les jours sont plus longs (15 h de lumière et 9 h d'obscurité), l'hormone du cerveau (BH) sécrétée par le cerveau, inhibe le corpus allatum (CA) dans la production d'hormone juvénile (JH) au niveau seuil. En l'absence de JH, la glande prothoracique (PG) produit l'ecdysone qui facilite l'accumulation de protéines dans l'ovaire. Dans de telles conditions, les œufs n'entrent pas en diapause. Tandis que quand la température d'élevage est faible (en dessous de 20° C) et que les jours sont plus courts (9 h de lumière et 15 h d'obscurité) la BH stimule les CA pour produire la JH. La JH inhibe la PG dans la production d'ecdysone. En l'absence d'ecdysone, le ganglion sous-oesophaegien (SG) produit l'hormone de la diapause (DH). La DH conduit l'ovaire à accumuler du glycogène dans les œufs, qui subissent une diapause.

1. Période critique d'entrée en diapause de l'œuf :

La première division de maturation commence avant la ponte et se termine 5-6 minutes après la ponte. Après la production du premier noyau polaire, la deuxième division de maturation se produit, qui produit le pronucléus femelle en environ 100 minutes après la ponte de l'œuf (Tazima et Onuma, 1967). Le spermatozoïde entre dans l'œuf par le micropyle pendant la ponte et reste dans la partie antérieure de l'œuf. La tête du spermatozoïde se transforme progressivement en pronucléus mâle. Le pronucléus femelle migre vers le pronucléus mâle, tandis que les trois noyaux polaires restent dans le polarplasma antérieur. Après deux heures de ponte, les pronucléi mâle et femelles s'unissent à une position définie plus près du pôle antérieur pour former un zygote (Takami, 1969). Le zygote se divise de manière mitotique de nombreuses fois pour produire des noyaux de segmentation. En 10 heures, la segmentation est terminée. Les noyaux de segmentation entrent dans le périplasma pour former le blastoderme syncytial. Les noyaux de segmentation subissent plus de divisions tangentielles pour augmenter en nombre et former un blastoderme cellulaire 15 heures après la ponte. Au bout de 20 heures, l'ébauche germinale s'est formée. C'est le stade idéal pour le traitement à l'acide pour empêcher les œufs d'entrer en diapause. Autrement, l'embryon entre en diapause. Ce stade s'appelle stade 4 dans l'échelle de développement en 30 étapes (Takami, 1969).

Hwang et coll., (2005) ont comparé, d'après l'expression différentielle, les transcrits de l'ARNm des œufs à diapause activés et maintenus en utilisant la batterie de l'ADNc, comme étape initiale pour définir le mécanisme moléculaire de début et d'achèvement de la diapause pendant l'embryogenèse

des vers à soie, *Bombyx mori*. Vingt quatre transcripts individuels de l'ADNc s'expriment de manière différentielle dans un ensemble de 1 468 ADNc différents. Parmi ces clones, un transcript d'ARNm de 2kb de la sous-unité I de la cytochrome oxydase (COI) augmente progressivement chez les œufs à diapause activés pendant le début de l'embryogenèse. Ils sont fortement exprimés dans les testicules, les corps gras et l'intestin moyen pendant le stade larvaire.

2. Etapes de la diapause :

On classe la diapause en cinq étapes, d'après le développement distinct de l'embryon (Takami et Kitazawa, 1960).

Stade 1 de la diapause (Stade 8 du développement embryonnaire qui prend environ 3 à 14 jours de ponte) :

Pendant ce stade, la migration des cellules du jaune se produit. L'embryon est entouré par les cellules du jaune. La division mitotique s'arrête le 4^{ème} jour. On remarque un déclin marqué de la teneur en glycogène, en raison de la conversion du glycogène en polyols.

Stade 2 de la diapause (Stade 9 ; 15 à 60 jours)

La zone centrale plus large manque de cellules du jaune. Le taux de respiration diminue autour de 2 à 5 %. La perte d'eau s'arrête. Le chorion devient imperméable à l'O₂ et à l'H₂O.

Stade 3 de la diapause (Etape 9 ; continuation 60 jours) :

La perte d'eau s'arrête complètement. Les œufs sont sous respiration anaérobie. Le taux de métabolisme diminue.

Stade 4 de la diapause (Etape 10 : continuation 60 jours)

La cryoprotection de l'embryon par le sorbitol et par le glycérol se produit.

Stade 5 de la diapause : (Etape 11 ; 100 à 110 jours)

La diapause se termine. Les niveaux de sorbitol baissent par l'activation de la NAD-Sorbitol déshydrogénase pour la resynthèse du glycogène

3. Pigmentation et diapause :

Les œufs venant d'être pondus n'ont pas de pigments. Ils sont similaires aux œufs sans diapause non pigmentés. Au Japon, au bout de 10 à 20 jours, les œufs deviennent pigmentés et deviennent violet foncé (Tazima, 2001), mais en Inde la pigmentation apparaît dans les 48 h après la ponte de l'œuf. Chez les œufs en développement, l'hormone de la diapause (DH) stimule la synthèse de la 3-hydroxy kynurénine dans l'ovaire nymphal, qui est ensuite métabolisée en ommochrome, qui est le pigment de la séreuse, cependant on n'a pas clairement compris son rôle dans la diapause. Chez les races de ver à soie de type indonésien, les œufs sont pigmentés mais sans diapause (*pnd*) (Yoshitake et Hashiguchi, 1969). Les étapes impliquées dans le métabolisme du tryptophane sont présentées dans la Fig. 3.

La mélanine, la pterine, l'ommochrome et les caroténoïdes sont les principaux pigments chez les insectes responsables de la pigmentation ou de la coloration. Parmi ces pigments, on dispose de beaucoup d'informations sur l'ommochrome par rapport à la diapause embryonnaire de *B. mori* (Yamashita et Hasegawa, 1985). Ces pigments ne sont généralement pas présents chez les œufs sans diapause. Les œufs à diapause sont donc habituellement pigmentés et de couleur marron foncé, en raison de la présence de l'ommochrome qui se forme dans les cellules de la séreuse, tandis que les œufs non pigmentés sont jaune pâle / blanc, ce qui est la couleur du jaune, en raison de l'absence de ce pigment.

HERITAGE DU VOLTINISME

Toyoma a signalé que le voltinisme (1906) est hérité par la mère. Plus tard il a émis l'opinion que le voltinisme est modifié par l'environnement (Toyoma, 1913). Umeya (1925) et Nagatomo (1942) ont indiqué que le comportement de diapause présente un héritage lié au sexe. Le gène de maturité lié au sexe (Lm) est lié au chromosome Z et joue aussi un rôle dans la diapause.

1. Gènes principaux impliqués dans la diapause :

Le gène ordinaire du voltinisme a des formes monovoltine (V^1), bivoltine ($+ V$) et polyvoltine (V^3) (Morohoshi, 2000). Le Tableau III indique les gènes principaux impliqués dans la diapause.

Morohoshi (1976) a proposé un équilibre génétique hypothétique entre les gènes V et Lm comme la base du phénomène du voltinisme (Fig. 4).

Katsumata (1968) a détecté un gène mutant polyvoltin récessif autosomal *pnd* qui est indépendant de la DH et des signaux environnementaux, chez la souche de ver à soie Cambodge. Tzenov et Petkov (1998) ont signalé que *pnd* est impliqué dans une carence du mécanisme d'action du signalage de la DH. Doira (1985) a décrit le gène *pnd-2* qui est similaire au gène *pnd*. Murakami (1986) a signalé que le caractère d'absence de pigmentation, d'absence de diapause de Cambodge et d'autres polyvoltins tropicaux est dû au gène *npnd*, qui est situé dans le chromosome sexuel de la femelle et s'hérite par la mère. Harizuka (1947) et Hirobe (1954) ont signalé que les gènes *bp* et *ln* influencent aussi la diapause.

2. Gènes associés impliqués dans la diapause :

i. Gène BomDH :

Xu (1999) a mesuré quantitativement l'ARNm de la DH dans le SG des chrysalides de 3 jours avec l'analyse d'hybridation Northern et suggéré que la diapause embryonnaire de *Bombyx mori* chez la génération suivante est déterminée par la teneur en ARNm de la DH dans le SG. En utilisant le vecteur pBluescript KS(+), Xu et coll., (1995) ont cloné le gène BomDH et l'ont exprimé dans les cellules *E. Coli* XL1. Ils ont suggéré que BomDh est codé par un gène unique, d'après l'analyse génomique Southern par buvardage.

ii. Neuropeptide activant la biosynthèse des phéromones (DH-PBAN ou Dh) et de l'hormone de la diapause

Le gène DH-PBAN (Dh) code une protéine précurseur commun pour l'hormone de la diapause (DH) et pour le neuropeptide activant la biosynthèse de phéromone (PBAN). Le locus *Dh* porte trois allèles, DhA1, DhA2 et DhB. Les analyses de liaison en utilisant les polymorphismes ont montré que le Dh est lié au gène *bp* sur le chromosome 11 et qu'il a le locus 2,2 (Pinyarat et coll., 1995). Chez le ver à soie, *Bombyx mori*, on sait que la SG sécrète deux neuropeptides, l'hormone de la diapause (DH) responsable de l'induction de la diapause embryonnaire et le neuropeptide activant la biosynthèse de phéromone, qui partagent un amide pentapeptide, Phe-Xaa-Pro-Arg-Leu-NH₂ (Xaa = Gly ou Ser), au C terminal. L'ADNc du Dh a 192 résidus d'acides aminés où le peptide DH de 22 résidus d'acides aminés est situé au N terminal, suivi par PBAN et par trois autres neuropeptides [α -, β - et le neuropeptide gamma-SG (SGN)], qui sont tous flanqués par des sites de segmentation tryptiques potentiels et partagent la séquence Phe-Xaa-Pro-Arg-Leu-Gly au C terminal. Ces résultats indiquent que la DH, avec les quatre autres neuropeptides, est générée à partir d'une polyprotéine précurseur commun, qui est codée par un ARNm unique transcrit dans les cellules neurosécrétrices de la SG (Sato et coll., 1993). L'expression du gène DH-PBAN commence au stade de l'histogénèse et augmente progressivement alors que l'éclosion se rapproche.

iii. Gène *Samui* :

Moribe et coll (2001) ont suggéré que le gène *Samui* transmet le signal pour l'expression *SDH* chez les œufs à diapause. Il protège aussi l'embryon contre les blessures dues au froid chez les œufs sans diapause. L'expression de l'ARNm et de la protéine de *Samui* est activée après l'incubation à 5° C pendant 5 à 6 jours, dure pendant 30 jours supplémentaires et puis faiblit. L'exposition à 25° C supprime à la fois l'expression de l'ARNm et de la protéine. Chez les œufs sans diapause incubés à 5° C, *Samui* est aussi régulé en amont, bien que l'expression soit plus faible. *Samui* contient des signaux de localisation nucléaire, un motif de liaison à l'ADNss et un domaine BAG similaire à celui de SODD/BAG-4. Ils ont pensé que parce que *Samui* peut se lier à HSP70, qu'il pourrait être un membre de la famille des protéines BAG.

iv. Gène de la NADPH-cytochrome P450 oxydoréductase :

Le métabolisme de l'ecdysone a une influence directe sur le métabolisme de la protéine et indirectement sur le caractère de la diapause (Fig. 2). L'hydroxylation de l'ecdysone pendant le premier stade de l'embryogenèse est dépendante de la présence à la fois de la P450 réductase et de l'ecdysone 20-hydroxylase P450, mais sa diminution progressive pendant le dernier stade pourrait être due à la diminution du niveau d'ecdysone 20-hydroxylase P450 (Horike et coll., 2000). L'analyse de l'ADNc indique que le gène de la NADPH-cytochrome P450 oxydoréductase a 3174 pb (Horike et coll., 2000).

v. Gène de la sorbitol déshydrogénase:

La diapause embryonnaire de *Bombyx mori* est maintenue à 25° C, le refroidissement à 5° C pendant 2 mois entraîne l'achèvement de la diapause, une transition qui est marquée quand le gène de la sorbitol déshydrogénase (SDH) est activé. L'analyse de l'ADNc du gène de la sorbitol déshydrogénase révèle qu'il est d'environ 10 kpb, avec 8 exons et 7 introns. Il est activé par une faible température dans les cellules du jaune des œufs à diapause et dans les corps gras des larves et des nymphes. Il utilise aussi un promoteur alternatif (Niimi et coll., 1993).

vi. Gène de la tréhalase :

L'hormone de la diapause stimule la transcription du gène de la tréhalase dans les ovaires en développement du ver à soie. Une copie unique du gène de la tréhalase est présente dans le génome haploïde du ver à soie. L'ADNc du gène de la tréhalase contient 3143 nucléotides et comprend 579 codes d'acides aminés (Su et coll., 1994).

3. Influence paternelle sur le voltinisme :

Rajendra Mundkur et coll., (2004) ont signalé que quand on croise la race de ver à soie KS-10 avec n'importe quel type de femelles à diapause, elle pond des œufs sans diapause. KS-10 est une race à cocons blancs sans diapause mise au point par le KSSRDI. Cela a été le premier rapport concernant l'influence paternelle sur le voltinisme, où les gènes paternels inhibent complètement la nature déjà programmée de diapause des œufs. Katsumata (1968) a détecté un mutant autosomal à œufs sans diapause « *pnd* » chez la race polyvoltine indonésienne Cambodge. Il a signalé que quand des femelles bivoltines japonaises (pigmentées à diapause-*pd*) sont croisées avec le mâle de type *pnd*, les œufs qui en résultent présentent un caractère normal de diapause pigmentée (*pnd*). Quand le type de femelles *pnd* est croisé avec le type de mâles *pd*, les œufs qui en résultent présentent aussi un caractère de diapause pigmentée (*pd*) (Katsumata, 1968). Sonobe et Otake (1986) ont aussi signalé qu'un *pnd* hétérozygote (*pnd*+) présente un caractère normal de diapause. Ce type de changement dans le caractère de la diapause est énigmatique parce que, dans ce cas, bien que le type de femelles *pnd* ait pondu des œufs sans aucune préparation pour subir la diapause, les gènes *pd* des mâles ont forcé les œufs à subir la diapause. Il est tout aussi intéressant que dans le cas de KS-10 (Rajendra

Mundkur et coll., 2004), bien que les œufs pondus par les femelles bivoltines aient toutes le mécanisme et les préparations nécessaires pour subir la diapause, les gènes paternels de KS-10 inhibent le caractère maternel de la diapause et font que l'embryon continue à se développer. Yamamoto et coll., (1978) ont indiqué que le gène *pnd* est un gène unique récessif. Murakami (198, 1990) a identifié « *npnd* », un gène lié au sexe responsable du polyvoltinisme, qui est aussi épistatique à « *pnd* ». Muroga (1943) a suggéré que les races indonésiennes ont un gène modificateur du voltinisme (*mv*) chez les vers à soie tetravoltins. Yoshitake et Hashiguchi (1969) ont montré que quand on incube des œufs de type indonésien à une température élevée, ils produisent des œufs pigmentés sans diapause (*pnd*) et quand on les incube à une température plus faible, ils produisent un type d'œufs non pigmentés sans diapause (*npnd*). Ils ont suggéré qu'il y a un deuxième facteur, qui joue aussi un rôle dans la diapause. Les deux facteurs ont une relation complémentaire et l'embryon présente une nature de diapause seulement quand les deux facteurs sont présents (Fig. 5). Ils ont suggéré que les races indonésiennes n'ont pas de deuxième facteur, les œufs ne subissent pas de diapause. Rajendra Mundkur et coll., (communiqué) ont suggéré que les races de type KS-10 ont un gène inhibiteur de diapause dominant (*Id*), qui empêche la diapause de s'installer.

FACTEURS QUI INFLUENCENT LA DIAPAUSE

On sait que le voltinisme chez le ver à soie est contrôlé génétiquement (Murakami, 1990) et il a été décrit par Toyama (1906, 1913) comme un événement biologique hérité par la mère sous le contrôle de gènes liés au sexe. Cependant, on sait qu'il est influencé par de nombreux facteurs comme la température, la photopériode, l'activité des glandes neuro-endocriniennes et d'autres substances chimiques.

1. Effet de la température et de la lumière sur la diapause :

Xu et coll., (1995) ont émis l'opinion que la régulation du gène codant la protéine de la diapause est influencée par la température et la lumière. On procède à un traitement de température élevée (38° C), de plus longue durée de lumière (15 h de lumière : 9 h d'obscurité) et d'humidité élevée pendant les premiers stades de la nymphose, les papillons produisant des œufs à diapause pondent des œufs sans diapause (Morohoshi, 2000) (Tableau IV).

En analysant l'homologue de l'ADNc de la sorbitol déhydrogénase (BmSDH) de mammifère par l'hybridation Northern et par la technique de transcription inversée, Niimi et coll., (1993) ont observé que le transcript de BmSDH se produit après le refroidissement pendant 40 à 50 jours, quand les œufs à diapause (deux jours après la ponte) sont exposés à 5° C. Le transcript de BmSDH est localisé dans les cellules du jaune. Ils ont indiqué que l'expression du gène dépendant des noyaux du jaune de BmSDH est induite par l'exposition à 5° C chez les œufs à diapause.

En utilisant des œufs sans chorion, Iwata et coll., (2005 a, b) ont observé que, la dissociation des cellules du jaune et le développement embryonnaire sont inhibés chez les œufs à diapause incubés à 5° C pendant 45 jours par l'inhibiteur, UO126 de la MAPK-ERK (protéine kinase activée par la mitose et kinase régulée par signal extracellulaire) (MEK). Ils ont donc suggéré que la MAP-ERK dans les cellules du jaune a un rôle dans la régulation des changements de la morphologie du jaune et dans l'achèvement de la diapause embryonnaire chez *B. mori*.

2. Contrôle neuro-endocrinien de la sécrétion de l'hormone de la diapause :

i. Cerveau :

Le cerveau n'a pas de relation dans la détermination du caractère de l'hibernation (Hasegawa, 1957). Cependant, le cerveau est responsable du comportement de diapause en ce qui concerne le niveau de sécrétion de l'hormone. Le cerveau démarre la réaction en chaîne de la sécrétion d'hormone à partir de l'ensemble Cerveau – Corpus allatum – Glande prothoracique - glande sous oesophagienne.

La Fig. 6 présente la relation générale entre les gènes et les glandes neuroendocriniennes par rapport à la diapause.

ii. Corpus allatum (CA) :

Le CA sécrète l'hormone juvénile, qui maintient le stade larvaire, du premier stade de la croissance jusqu'au 3^{ème} jour du 5^{ème} âge environ. Il sécrète à nouveau le 1^{er} jour de la nymphose (Morohoshi, 2000). La sécrétion reprend pendant la deuxième moitié du stade nymphal jusqu'à ce que la nymphe devienne adulte (Fukuda, 1951). L'hormone juvénile supprime la synthèse de protéine. Le CA est contrôlé par les gènes de mue.

iii. Corpus cardium (CC) :

Le CC est une glande neurosécrétrice reliée aux cellules neurosécrétrices du cerveau par la liaison nerveuse. Il est inhibé par l'hormone du cerveau (sécrétée par le groupe IV des cellules neurosécrétrices du cerveau). Le CC joue un rôle dans le métabolisme des hydrates de carbone et des lipides. Il est donc possible qu'il joue le rôle d'organe auxiliaire à la SG (Morohoshi, 2000).

iv. Glande prothoracique (PG) :

La PG sécrète de l'ecdysone et promeut la synthèse de protéine et le développement, ce qui entraîne l'augmentation de la teneur en protéines des œufs et par conséquent la présentation d'un caractère sans diapause.

v. Glande sous-oesophagienne (SG) :

Ichikawa et coll., (1997) ont observé que les femelles destinées à pondre des œufs sans diapause (polyvoltines) ont des œufs à diapause dans leurs ovaires si on enlève de manière chirurgicale leurs ganglions sous-oesophagiens (SG) deux jours après l'ecdysie larve - nymphe ou plus tard. Quand on retire le cerveau et l'ensemble corpora cardiaca (CC)-corpora allata (CA) en plus de la SG, les polyvoltins pondent des œufs sans diapause. Quand on implante l'ovaire polyvoltin dans des nymphes males bivoltines, les œufs deviennent à diapause (Fukuda et Sonobe, 1973).

Hasegawa a émis l'opinion (1957) que le ganglion sous-oesophagien (i) a une fonction qui permet au voltinisme de changer après le 2^{ème} jour du 3^{ème} âge. (ii) qu'il est le centre de détermination du caractère de l'hibernation chez le ver à soie. L'extirpation du ganglion sous-oesophagien fait baisser l'AMP cyclique et augmenter la GMP cyclique pendant différents stades de développement. Les changements inversés dans les deux nucléotides cycliques sont provoqués par l'implantation du ganglion ou par l'injection de l'hormone de diapause. Aucun changement n'est induit dans les deux nucléotides cycliques dans les ovaires pendant les 24 premières heures après l'injection de l'hormone, mais des effets clairs apparaissent après une phase de décalage de quelques jours (Chen et coll., 1988). Quand on retire la SG des femelles destinées à pondre des œufs à diapause (bivoltines), 2 jours après l'ecdysie larve - nymphe, les œufs à diapause apparaissent, mais l'apparition des œufs à diapause est retardée de 2 jours quand on retire aussi l'ensemble cerveau-CC-CA. Ces observations suggèrent que la DH est produite dans la SG et transférée dans l'ensemble CC-CA et que la sécrétion de la DH à partir de l'ensemble est supprimée chez les polyvoltins. L'apparition d'œufs à diapause chez les polyvoltins dont le protocerebrum du cerveau est sectionné indique qu'il y a un centre inhibiteur dans le protocerebrum. En injectant l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) et la picrotoxine, il a été suggéré qu'un mécanisme inhibiteur GABAergique dans la sécrétion de la DH pourrait être actif chez les polyvoltins, mais inactif chez les bivoltins pendant le stade nymphal.

L'implantation d'une partie de l'embryon en développement y compris de la SG dans les nymphes dont la SG a été retirée induit des œufs à diapause dans la descendance. Ces résultats ont été obtenus avec des œufs incubés dans des conditions non propices à la diapause, ainsi que dans des conditions induisant la diapause par Morita et coll., (2003). Ils ont émis l'opinion qu'un système neurosécréteur

responsable de la biosynthèse de neuropeptides FXPRLamide (DH) est établi dès le début de l'histogénèse, bien que le système pour réguler la sécrétion des hormones neuropeptides ne se soit pas complètement formé à ce moment là. On trouve les somates immunoréactives contre l'anti-sérum DH dans la SG à partir de la blastokinèse (Morita et coll., 2003).

3. Hormones et autres substances chimiques liées à la diapause :

i. Hormone de la diapause (DH) :

La DH est un amide à polypeptides qui comprend 24 acides aminés (Yamashita, 1996).

H-[Thr-Asp-Met-Lys-Asp-Glu-Ser-Asp-Arg-Gly-Ala-His-Ser-Glu-Arg-Gly-Ala-Leu-Cys-Phe-Gly-Pro-Arg-Leu] - NH₂

La DH est un peptide amidé appartenant à la famille FXPRLamide. On pense que sa structure d'amide penta-peptidique du C-terminal (Phe-Gly-Pro-Arg-Leu-NH₂) est essentielle à l'activité biologique. Sur ces 5 acides aminés, la glycine pourrait être remplacée par d'autres acides aminés et avoir encore la même activité biologique. L'amide tripeptidique plus court (Pro-Arg-Leu-NH₂) possède aussi une activité faible mais significative, ce qui indique la structure minimum de l'hormone de diapause (Imai et coll., 1991 ; 1998 ; Saito et coll. ; 1994).

La DH est constituée de deux principes actifs peptidiques, la DH-A et la DH-B avec des poids moléculaires estimés de respectivement 3300 ± 400 et 2000 ± 200 kDa (Kubota et coll., 1976).

L'injection d'hormone de diapause synthétique chez des nymphes sans diapause induit une incidence de diapause de 45 % chez les œufs (Katagiri et coll., 1998). Cependant, Shiomi et coll., (1994) ont observé que la DH n'a pas d'effet quand on l'injecte à des nymphes sans diapause (polyvoltines). Les papillons mâles ont une teneur plus élevée en DH que les femelles. La DH est produite par la SG pendant le stade larvaire, cependant, elle atteint son sommet à la fin du stade nymphal. Même les polyvoltins produisent de la DH, bien que son activité soit plus faible par comparaison aux bivoltins (Hasegawa, 1964). Quand on injecte de l'hormone de sérum de lapin anti diapause chez des nymphes à diapause, on induit des œufs sans diapause (Shiomi et coll., 1994).

ii. Dopamine :

La mesure des concentrations de catécholamine dans l'hémolymphe et dans les ganglions cerveau-sous-oesophagiens (Br-SGs) montre que seules les concentrations en dopamine dans les deux tissus sont régulièrement plus élevées chez les larves et les nymphes à diapause que chez celles sans diapause (Noguchi et Hayakawa, 2001). La différence des concentrations en dopamine dans les deux tissus augmente autour de l'ecdysie nymphale. Au début du stade nymphal, les activités de dopa décarboxylase et les concentrations en ARNm dans les Br-SGs sont aussi beaucoup plus élevées chez les insectes à diapause que chez ceux sans diapause. L'élévation des niveaux de dopamine induite en administrant de la Dopa aux larves du 4^{ème} et 5^{ème} âge et en injectant de la Dopa ou de la dopamine chez des nymphes de 2 jours fait pondre des œufs à diapause à des fréquences de 59 % et 70 % respectivement par les papillons non destinés à la diapause. L'injection de Dopa ou de dopamine élève les niveaux d'ARNm de l'hormone de la diapause dans les Br-SGs des nymphes sans diapause un jour après l'injection. L'incubation des BR-SGs isolés chez des nymphes sans diapause de 2 jours avec de la dopa ou de la dopamine stimule aussi l'expression de l'ARNm de l'hormone de la diapause. Les stimuli environnementaux pendant le développement embryonnaire parental augmentent les niveaux de dopamine à la fois dans l'hémolymphe et dans les Br-SG à partir du stade larvaire jusqu'au début du stade nymphal, ce qui entraîne la ponte d'œufs destinés à la diapause par l'augmentation de l'expression du gène de l'hormone de la diapause (Noguchi et Hayakawa, 2001).

iii. Ecdystéroïde :

Les ecdystéroïdes sont des hormones impliquées dans le processus de développement des insectes. Dans les œufs de *B. mori* la 20-hydroxyecdysone (20 E) est la molécule physiologiquement

active. Chez les œufs sans diapause, la 20 E est produite par la conversion d'ecdystéroïdes conjuguées par la mère (telles que l'ecdysone 22-phosphate et la 20-hydroxyecdysone 22-phosphate en ecdystéroïdes libres actives) par une enzyme, appelée ecdystéroïde-phosphate phosphatase (EPPase) et par une nouvelle biosynthèse. Mais, chez les œufs à diapause, aucun de ces processus métaboliques ne se produit. Dans la nouvelle biosynthèse de 20E, l'hydroxylation à la position C-20 de l'ecdysone, qui est catalysée par l'ecdysone 20-hydroxylase est une étape limitative du taux. L'EPPase est localisée dans le cytosol des cellules du jaune. La grande partie des phosphates ecdystéroïdes maternels sont liés à la vitelline et sont stockées dans les granules du jaune. L'acidification des granules du jaune, induite par l'H(+)-ATPase vacuolaire déclenche la dissociation des phosphates ecdystéroïdes à partir de l'ensemble vitelline-ecdystéroïde-phosphates et les phosphates dissociés de l'ecdystéroïde sont libérés des granules du jaune dans le cytosol (Sonobe et Yamada, 2004 ; Yamada et Sonobe, 2003). Horike et Sonobe (1999) ont signalé que l'activité de l'ecdysone 20-monoxygénase microsomale dans les œufs à diapause reste à un faible niveau, tandis que celle dans les œufs sans diapause augmente à partir du stade de la gastrula. L'actinomycine D et l'alpha-amanitine empêchent l'augmentation de l'activité, ce qui suggère que la transcription du gène est nécessaire pour entraîner une augmentation de l'activité de l'ecdysone 20-monoxygénase.

Makka et coll., (2002) ont étudié les activités biologiques de plusieurs ecdystéroïdes des œufs par l'analyse de la liaison ligande *in vitro* et par l'évaluation biologique en utilisant des œufs de *B. mori*. En utilisant le récepteur de l'ecdystéroïde de *B. mori* (BmEcr-B1/BmUSP heterodimer) préparé par les systèmes d'expression de la levure et d'*Escherichia coli*, ils ont constaté que les affinités de liaison relatives des ecdystéroïdes de l'œuf à l'hétérodimère BmEcr-B1/BmUSP baisse dans l'ordre suivant : 20-hydroxyecdysone > 2-deoxy-20-hydroxyecdysone > 22-deoxy-20-hydroxyecdysone > ecdysone > 2-deoxyecdysone > ecdysone 22-phosphate. L'injection de 20-hydroxyecdysone (25 ng / œuf) dans des œufs à diapause potentielle, qui présentent un niveau très bas d'ecdystéroïdes libres au début de la diapause embryonnaire (stade gastrula) induit 7 % des œufs à se développer au-delà du stade de gastrula sans entrer en diapause. A l'opposé, l'injection d'autres ecdystéroïdes n'est pas efficace pour induire le développement embryonnaire.

iv. Autres substances chimiques liées à la diapause :

Les substances chimiques importantes qui ont une relation avec la diapause sont présentées dans la Fig. 7.

a. Glycogène :

Le glycogène est l'hydrate de carbone de réserve de la cellule. Dans les cellules, il est décomposé et augmente à partir du glucose-1-phosphate au moyen de la phosphorylase. Dans le système digestif, il est décomposé par la glycosidase en glucose. Les œufs destinés à la diapause venant d'être pondus ont environ 2,5 % de leurs constituants qui sont du glycogène. La teneur en glycogène a tendance à être plus élevée chez les races japonaises que chez les races chinoises.

b. Tréhalose / Tréhalase / inhibiteur de la tréhalase :

Une injection unique de l'inhibiteur de la tréhalase, la tréhaloline chez des nymphes de 5 jours (40 µg / g de poids corporel) n'interfère pas avec l'accumulation de protéines et de lipides, mais diminue de manière marquée la teneur en glycogène dans les œufs, accompagné par une augmentation remarquable des niveaux de tréhalose dans l'hémolymphe. Dans ces œufs, la teneur en glycogène diminue à un niveau traces. La diminution de la teneur en glycogène est presque restaurée au niveau témoin par l'injection de glucose mais pas par le tréhalose. Cependant, l'injection de tréhaloline n'a jamais d'effet sur l'induction de la diapause par l'hormone, malgré la teneur considérablement diminuée en glycogène dans ces œufs (Katagiri et coll., 1998).

c. Sorbitol :

Chez les œufs à diapause du ver à soie, *Bombyx mori*, l'activité de la NAD-sorbitol déshydrogénase (EC 1,1,1,14, SDH) est presque négligeable. La SDS-PAGE et les analyses d'immunoempreinte en utilisant l'antisérum SDH montrent que la biosynthèse de la SDH est induite par l'acclimatation des œufs à diapause de *B. mori* à 5° C (Niimi et Yaginuma, 1992). Les expériences *in vitro* révèlent que le sorbitol inhibe directement le développement des embryons explantés des œufs à diapause, mais n'a pas d'effet sur le développement des embryons chez les œufs avant la diapause. Ni l'alanine, ni l'hormone de diapause n'empêchent les embryons isolés de se développer (Iwata et coll., 2005a). Le développement des embryons d'œufs à diapause est fortement inhibé par l'ajout de sorbitol ou de tréhalose (concentration de 0,2 M) au milieu de culture. Cet effet inhibiteur disparaît, quand on transfère les embryons dans un milieu témoin qui ne contient ni sorbitol, ni tréhalose, ce qui indique que les réactions inhibitrices provoquées par les deux substances sont réversibles. Le glycérol, le mannitol ou le glucose sont modérément efficaces pour l'inhibition. Le sorbitol présent dans les œufs de ver à soie à diapause ne semble pas servir d'antigel, mais de facteur puissant d'arrêt du développement embryonnaire. La baisse du sorbitol libère les embryons de la diapause à la fin de la diapause (Yu et coll., 1991 ; Horie et coll., 2000a, b). Trois heures après la ponte des œufs à diapause, la teneur en polyol (sorbitol et glycérol) est en dessous de 4 µm / g. Les polyols augmentent pendant les 40 premiers jours de refroidissement et atteignent ensuite un sommet. La teneur en polyol est plus élevée chez races japonaises que chez les races chinoises et les races chinoises présentent plus de résidus de teneur en glycogène. Les œufs hybrides tolèrent plus la conservation à 5° C que leurs œufs parentaux après l'achèvement de la diapause, mais leur teneur en sucres ne présente pas de différence significative (Yu et coll., 1991).

d. Protéines de l'œuf :

Deux types de protéines à poids moléculaire élevé (les vitellogénines et les protéines spécifiques de l'œuf) sont retenues dans les sphères du jaune des ovocytes pendant la vitellogenèse. Les vitellogénines sont produites dans le corps gras pendant la transformation de la chrysalide en adulte. Les protéines spécifiques à l'œuf sont synthétisées dans les cellules du follicule (Goldsmith et Kafatos, 1984).

La vitelline de *B. mori*, la forme de stockage dans l'œuf du sédiment des vitellogénines à 13,5 S a une taille originelle d'environ 440 000 Mr et est constituée de deux sous-unités dans un ratio 1 : 1, c'est-à-dire VITL-H de ~ 180 000 Mr et VITL-L de ~ 42 000 Mr (Izumi et coll., 1980). La vitelline est un tétramère composé de deux molécules de deux sous-unités chacune. VITL-H et VITL-L sont traduites à partir de différentes ARNm (Izumi et Tomino, 1983). La vitelline reste constante jusqu'au 6^{ème} ou 7^{ème} jour et puis chute à environ 50 % du niveau initial avant l'éclosion. Yamashita et Irie (1980) ont suggéré que la vitelline n'est pas nécessaire à l'embryogenèse et au développement larvaire normaux.

La protéine spécifique de l'œuf (ESP) est une glycolypoprotéine d'environ 125 000 Mr, composée d'un type unique de sous-unités d'environ 55 000 Mr (Irie et Yamashita, 1983). Elle comprend 14 % de protéines solubles chez les œufs venant d'être pondus et on l'a localisée dans les cellules du follicule et dans les sphères du jaune des ovocytes en développement. Irie et Yamashita (1980) ont montré que la quantité d'ESP baisse lentement dans les jeunes embryons jusqu'au 6^{ème} jour, puis baisse rapidement à des niveaux traces dès le 9^{ème} jour juste avant l'éclosion. Dorel et Coulon et Coulon et Dorel (1991) ont signalé qu'un ensemble de protéines de choc thermique de la famille hsp 70 est synthétisé pendant le développement avec diapause et sans diapause au début du stade de l'ébauche germinale ; à l'inverse, la protéine 61 (P61 ; 61 kDa) n'est synthétisée que pendant le stade de gastrula de la diapause. La synthèse de P61 baisse à 5° C. Puis, on observe la synthèse de la famille hsp 70 à 5° C. Après l'empêchement artificiel de la diapause, la synthèse de P61 n'est pas induite pendant le stade de la gastrula, tandis que la famille hsp 70 augmente dans les 6 h suivant le

traitement préventif. P61 n'est synthétisé que si les traitements sont inefficaces pour prévenir la diapause et induire l'hsp70. Ils ont décrit P61 comme « une protéine associée avec l'arrêt de la diapause ».

e. Glycoprotéine :

Une ATPase EA4 est une glycoprotéine contenant un oligosaccharide lié à N et qui agit comme une protéine chronomètre (Enzyme de Mesure de l'Intervalle de Temps (TIME) pour mesurer le temps. PIN se lie à EA4, et forme un ensemble équimolaire et gère le chronomètre. La dissociation de l'ensemble quand il est exposé au froid déclenche le passage du temps. Quand PIN se dissocie complètement d'EA4, cette dernière devient libre pour réguler la fonction de développement (Tani et coll., 2001). La TIME-EA4 des œufs de ver à soie à diapause de la souche pure C108, de *Bombyx mori* a une chaîne glycosylée comme un tétrasaccharide (Man(2)GlcNAc(2)) attachée à l'Asn(22) du peptide T3 à partir des digestions tryptiques. D'autre part, le ver à soie Showa a un pentasaccharide (Man(3)GlcNAc(2)) sur T3 au même site de liaison (Pitchayawasin et coll., 2004).

f. Caséine :

Les études sur les activités phosphorylation de la caséine kinase 2 (CK2) (Yamamoto et coll., 2005) pendant le début des stades embryonnaires jusqu'à 60 h après la ponte indiquent que chez les œufs sans diapause, on trouve des signaux phosphorylés à chaque stade et ils deviennent progressivement plus puissants au cours de chaque stade. D'autre part, chez les œufs à diapause, on trouve les signaux phosphorylés les plus puissants environ 12 à 24 h après la ponte et ils deviennent progressivement plus faibles au cours de chaque stade. Les sous-unités alpha et bêta codant l'ADNc de CK2 ont respectivement 342 et 220 résidus d'acides aminés. La RT-PCR indique que ces gènes s'expriment chez les œufs à diapause et sans diapause et que les changements de l'activité CK2 sont régulés principalement au niveau de la post-transcription pendant le développement embryonnaire chez *Bombyx mori* (Yamamoto et coll., 2005).

g. Trypsine :

Baba et coll., (2001) ont observé que la dégradation tryptique très rapide de l'hormone de la diapause se produit par une division à ARg23 et finalement à ARg15. Comme la structure du C-terminal de la DH est essentielle pour présenter une bioactivité, la première division provoque une désactivation rapide de l'hormone. Cette digestion tryptique est fortement supprimée en ajoutant du VAP-map, un analogue synthétique du peptide cuticulaire des papillons du ver à soie, Bm ACP-6,7 (peptide VAP), qui est en synergie naturelle avec la DH. VAP-map supprime la réaction enzymatique en interagissant avec le substrat mais pas avec l'enzyme.

h. Oxygène :

Chez les œufs sans diapause, à 25° C, l'absorption d'oxygène se produit en trois phases, qui correspondent aux processus morphogénétique. Chez les œufs à diapause, à 25° C, l'absorption d'O₂ présente un pic (100 µl / g d'œufs / h) le 1er jour et puis chute rapidement pour atteindre un niveau de 8 à 10 µl / g œufs / h à partir du 10ème jour. Le chorion sert de barrière de l'oxygène chez les œufs à diapause (Okada, 1971). Quand les œufs sont exposés à 5° C pendant des périodes variables, l'absorption d'O₂ demeure à 6 µl / g œufs / h. Immédiatement après le réchauffement à 25° C, les taux augmentent après une phase de décalage. Chez les œufs traités à l'HCl, l'absorption d'O₂ augmente immédiatement après le traitement à l'acide. L'absorption d'O₂ qui augmente fortement à 25° C, coïncide avec l'arrêt de la diapause (Yaginuma et Yamashita, 1999). Cependant, Sonobe et Yamada (2004) pensent que l'augmentation de la perméabilité à l'oxygène du chorion n'est pas une condition nécessaire à l'achèvement de la diapause et à la resynthèse du glycogène à partir de 2 polyols.

i. Ratio Carbone / Azote (C / N) :

Le ratio de carbone (C) (glycogène et lipides) par rapport à l'azote (N) (Protéine) chez les œufs à diapause est faible, tandis que le ratio est élevé chez les œufs sans diapause (Fig. 8) (Morohoshi, 2000).

RESUME

Le phénomène de la diapause est une adaptation mise au point par les animaux pour surmonter les conditions environnementales qui ne sont pas propices au maintien de la vie. Le ver à soie mûrier *Bombyx mori* a adopté la diapause embryonnaire pendant le stade de l'œuf. Chez le ver à soie, le phénomène de la diapause est déterminé bien avant que l'embryon ne soit formé par la mère. Le phénomène de la diapause peut être de type facultatif (strictement génétique) ou obligatoire (expression du gène modifiée par l'environnement). On classe les vers à soie sur la base du voltinisme en tant que monovoltins, bivoltins et multivoltins (ou polyvoltins), en fonction du nombre de générations qu'ils opèrent pendant un an. Chez les monovoltins et les bivoltins, les embryons subissent une hibernation après le stade du blastoderme, mais les œufs polyvoltins ne subissent pas d'hibernation. Il existe de nombreuses différences entre les œufs de vers à soie à diapause et sans diapause. L'expression de la diapause dépend de la valeur HP (potentiel d'hibernation) du ver à soie qui est comprise entre 0 et 12. L'induction, le maintien et l'achèvement de la diapause sont les étapes distinctes impliquées dans le processus de la diapause embryonnaire. L'induction commence au stade du Blastoderme, c'est-à-dire à l'étape 4 sur l'échelle de développement en 30 étapes. On peut subdiviser la diapause en 5 étapes.

Le transcript de l'ARNm de la sous-unité 1 de la cytochrome oxydase (COI) augmente progressivement chez les œufs à diapause activée pendant le début de l'embryogenèse. Pendant l'étape de la diapause, le glycogène se converti en polyols. Pendant l'achèvement de la diapause, les niveaux de sorbitol baissent par l'activation de la Nad-Sorbitol déshydrogénase pour la resynthèse du glycogène. Bien qu'il n'y ait pas de relation entre la pigmentation de la sereuse et la diapause, en général, les œufs à diapause développent une pigmentation. Cependant, les œufs polyvoltins de type indonésien présentent aussi une pigmentation (pnd). La couleur marron de l'œuf est due au pigment de l'ommochrome, qui se forme à partir du métabolisme du Tryptophane.

On a rapporté que beaucoup de gènes influencent le phénomène de la diapause. Ceux qui sont importants sont ; V, M Lm, Hs, pnd, pnd2, npnd, ln, bp, BomDH, DH-PBAN, Samui, gène de NADPH-cytochrome P450 oxydoréductase, gène de la sorbitol déhydrogénase, le gène de la tréhalase, le gène inhibiteur de la diapause (Id). Le cerveau (BR), le corpus allatum (CA), la glande prothoracique (PG) et le ganglion sous-oesophagien (SG) sont les glandes neuroendocriniennes impliquées dans le processus de la diapause. La diapause embryonnaire de *Bombyx mori* chez la génération suivante est déterminée par la teneur en ARNm de la DH dans la SG. La température et la lumière sont les principaux signaux environnementaux, qui modifient l'expression des gènes par les glandes neuroendocriniennes.

L'hormone de la diapause (DH) est produite par la SG et est transférée à l'ensemble corpora cardiaca-corpora allata (CC-CA). C'est un peptide amidé appartenant à la famille FXPRLamide et il est constitué de deux principes actifs des peptides, la DH-A et la DH-B avec des poids moléculaires estimés de 3300 ± 400 et 2000 ± 200 kDa. La structure minimum de l'hormone de la diapause est Pro-Arg-Leu-NH₂. Cette hormone agit sur les ovocytes en maturation pendant le stade nymphal et entraîne l'arrêt du développement une fois que l'embryon a atteint environ 12 000 cellules. Les polyvoltins produisent aussi de la DH, cependant l'activité est plus faible par comparaison aux bivoltins. Les mâles ont une concentration plus élevée en DH. En injectant du sérum de lapin de l'hormone antidiapause chez des chrysalides à diapause, on peut induire des œufs sans diapause. Les concentrations en dopamine sont plus élevées chez les larves et les nymphes à diapause que chez

celles sans diapause. Chez les œufs sans diapause, la 20-hydroxyecdysone (20 E) est produite par la conversion d'ecdystéroïdes conjuguées par la mère en ecdystéroïdes libres actifs par l'EPPase et par une nouvelle biosynthèse. Mais, chez les œufs à diapause, aucun de ces processus métaboliques ne se produit. L'EPPase est localisée dans le cytosol des cellules du jaune. La majorité des phosphates ecdystéroïdes maternels sont liées à la vitelline et sont stockées dans les granules du jaune. Les œufs destinés à la diapause venant d'être pondus ont environ 2,5 % de leurs constituants qui sont du glycogène, qui est converti en glycérol et en sorbitol pendant la diapause. Le sorbitol présent dans les œufs de ver à soie à diapause ne semble pas servir d'antigel mais plutôt de facteur puissant d'arrêt du développement embryonnaire. La baisse du sorbitol libère les embryons de la diapause à la fin de la diapause. Le ratio de carbone (glycogène et lipide) par rapport à l'azote (protéine) des œufs à diapause est faible, tandis qu'il est élevé chez les œufs sans diapause.

Chen et coll., (1988) ont suggéré que toutes les races de ver à soie sont à diapause. Chez les polyvoltins, il y a une inhibition au niveau de la SG. Il y a deux approches de la question, selon la première l'embryon est à diapause et selon la deuxième, c'est le jaune qui force l'embryon à ne pas se développer ; Umeya (1937a, 1937b, 1938, 1939) a pensé que chez l'œuf à diapause, bien que l'embryon soit toujours prêt à se développer, des conditions défavorables du jaune entourant l'embryon, inhibent son développement au-delà d'un certain stade, tandis que selon Mirua (1932a, 1932b, 1938) non seulement le jaune, mais aussi l'embryon lui-même restent inactifs chez l'œuf à diapause. Muroga (1951) a expliqué que, « la substance inhibitrice » pourrait ne pas exister de manière continue chez les œufs à diapause ; elle pourrait n'être présente que pendant une courte période, en agissant au tout début du développement embryonnaire et cela pourrait être suffisant pour la détermination de la diapause. Une fois que l'embryon entre dans l'état de diapause, elle devient la propriété de l'embryon lui-même.

La fin de la diapause nécessite la consommation d'une substance inhibitrice sous l'effet d'une faible température (Muroga, 1951). Fujiwara et coll., (2006) ont indiqué que l'ERK / MAPK (la kinase régulée par un signal extracellulaire / la protéine de la kinase activée par le mitogène) régule le métabolisme des ecdystéroïdes et du sorbitol pour l'arrêt de la diapause embryonnaire par la transcription du gène des enzymes clé de l'EPPase et de la sorbitol déhydrogénase2 chez le ver à soie, *Bombyx mori*.

On a synthétisé un ensemble de protéines de choc thermique (hsp) de la famille 70 dans le développement avec diapause et sans diapause au stade précoce de l'ébauche germinale; à l'opposé, la protéine 61 kDa (P61) n'est synthétisée que pendant le stade gastrula de la diapause. La synthèse de P61 baisse à 5° C. Puis, on observe la synthèse de la famille hsp 70 à 5° C. Après l'empêchement artificiel de la diapause, la synthèse de P61 n'est pas induite pendant le stade de gastrula, tandis que la famille hsp 70 augmente dans les 6 heures qui suivent le traitement préventif (Coulon et Dorel, 1991).

Yamamoto et coll. (1978) ont précisé que chez l'œuf mutant pigmenté et sans diapause (*pnd*), il y a une mutation récessive unique d'un gène sur le 11^{ème} chromosome, à la suite de laquelle l'embryon n'entre jamais en diapause. Katsumura (1968) et Sonobe et Otake (1986) ont indiqué que quand on croise une femelle de type *pnd* homozygote avec un mâle normal à diapause, les œufs présentent un comportement normal à diapause. Ils ont pensé qu'il est possible que chez les œufs qui ont été exposés au facteur de la diapause pendant l'ontogenèse, la protéine spécifique synthétisée par le gène *pnd+* (environ 22 kDa) pourrait stimuler la synthèse des protéines associées à la diapause. Rajendra Mundkur et coll., (2004) ont rapporté que quand on croise un type normal de femelle à diapause avec les mâles de la race de ver à soie KS-10, cela empêche la diapause dans les œufs. Les auteurs ont suggéré que la race de ver à soie KS-10 a un gène « inhibiteur de diapause » dominant « Id », qui remplace le processus prédéterminé par le facteur de la diapause pendant l'embryogenèse.

Andrewartha (1952) a pensé que la diapause est un caractère convergeant qui a évolué indépendamment plusieurs fois au cours de l'évolution. Toyoma (1906) a décrit la diapause comme

un évènement biologique hérité par la mère sous le contrôle des gènes liés au sexe. Sonobe et Odake (1986) ont proposé deux théories liées à la diapause embryonnaire chez le ver à soie : (i) la diapause est le phénomène prédéterminé par le facteur de la diapause pendant l'embryogenèse et (ii) la diapause est le processus déterminé par le facteur génétique pendant l'embryogenèse. Les auteurs de cet article proposent une nouvelle théorie liée à la diapause en prenant spécialement en compte l'influence paternelle « la diapause est le phénomène déterminé par l'environnement, les gènes maternels et les gènes paternels de manière synergétique ou exclusive ». La Fig. 9 présente un ensemble de trois cercles qui se chevauchent, qui représentent l'environnement, les gènes maternels et les gènes paternels. Le phénomène de la diapause peut être l'un des sept types suivants.

1. Type A : Exclusivement déterminé par l'environnement :

Un des exemples de ce type de diapause est la race polyvoltine indienne Pure Mysore. Normalement, les œufs de Pure Mysore sont sans pigmentation et sans diapause. Cependant, pendant les conditions plus froides (~ 20° C) et plus sombres (~10 Jour : 14 Nuit), environ 11 à 29 % des œufs deviennent pigmentés et entrent en diapause. Shimizu et coll., (2005) ont signalé que dans une région tempérée, quand on élève les races polyvoltines à savoir, Annan, Cambodge, Pure Mysore et Ringestu à basse température (20° C) et dans des conditions photopériodiques plus sombres (12 Jour : 12 Nuit) pendant l'élevage du dernier âge, ces œufs pondent 70 à 90 % d'œufs à diapause.

2. Type B : Exclusivement déterminé par les gènes maternels :

Chez ce type, la diapause est induite exclusivement par les gènes maternels, quelles que soient les conditions environnementales, c'est-à-dire les races monovoltines européennes, qui sont exclusivement déterminées par les gènes maternels et les moins affectées par les signaux environnementaux. Ce comportement est l'un des tests pour déterminer si une race est monovoltine ou bivoltine.

3. Type C : Déterminé exclusivement par les gènes paternels :

L'exemple de ce type de comportement est la race KS-10. Quand n'importe quel type de femelle normale à diapause est accouplée avec les mâles KS-10, elles pondent des œufs sans diapause, quels que soient les signaux environnementaux (Rajendra Mundkur et coll., 2004).

4. Type D : Déterminée par les gènes maternels mais modifiée par l'environnement :

Chez ce type, la diapause est déterminée par les gènes maternels, mais modifiée de manière synergétique par les conditions environnementales, par exemple, les bivoltins japonais, qui sont fortement contrôlés par les gènes maternels, mais modifiés par les signaux environnementaux, ils pondent donc de manière alternée des œufs à diapause et des œufs sans diapause (Tazima, 2001).

5. Type E : Déterminé par les gènes paternels, mais modifié par l'environnement :

Yoshitake et Hashiguchi (1969) ont montré que quand on incube des œufs de type indonésien à une température élevée, ils produisent des œufs pigmentés sans diapause (*pnd*) et quand on les incube à une température plus basse, ils produisent des œufs non pigmentés sans diapause (*npnd*).

6. Type F : Déterminé par les gènes maternels mais modifiée par les gènes paternels :

(ou l'inverse), comme l'ont décrit Katsumata (1968), Sonobe et Odake (1986) et Sonobe (1989). Katsumata a expliqué que dans le cas d'une race indonésienne SI, les œufs n'entrent pas en diapause à cause d'un gène *pnd* maternel récessif mutant (pigmenté, sans diapause). Cependant, quand on croise des femelles de ce type avec des mâles bivoltins Japonais normaux, les œufs deviennent normalement à diapause, dans la condition hétérozygote. Il a aussi rapporté que quand on croise des femelles bivoltines Japonaises normales (pigmentées, à diapause, *pd*) avec des mâles de type *pnd* de la race

polyvoltine indonésienne Cambodge, les œufs qui en résultent présentent un caractère normal, pigmenté, à diapause (*pd*). Quand on croise des femelles de type *pnd* avec des mâles de type *pd*, les œufs qui en résultent présentent aussi un caractère pigmenté à diapause (*pd*) (Katsumata, 1968). Sonobe et Odake (1986) ont aussi rapporté que le *pnd* hétérozygote (*pnd*+) présente un caractère normal à diapause.

7. Type G : Déterminé mutuellement par les gènes maternels, les gènes paternels et l'environnement :

Ce type de comportement de diapause n'a pas encore été signalé. Cependant, théoriquement ce type est aussi possible et donc proposé.

Les vers à soie ont adopté des modifications fonctionnelles pour occuper les différentes niches, telles que les conditions tropicales plus chaudes où la nourriture de mûrier est disponible toute l'année et les conditions tempérées plus froides, où la nourriture n'est disponible que pendant environ six mois par an. La diapause est un interrupteur très efficace pour « arrêter » le développement jusqu'à ce que les conditions favorables soient présentes. A la différence des autres animaux, la diapause chez le ver à soie mûrier est unique parce que ce n'est pas l'individu qui est exposé aux conditions défavorables, qui a recours à la diapause. Ce sont les parents, qui vivent dans des conditions favorables, qui prévoient que la prochaine saison ne sera pas favorable et que la continuation de la prochaine génération doit donc être retardée. Dans les conditions tempérées, ce type de prévisions s'avère vrai. De nombreuses études ont été entreprises dans la zone tempérée, dont les données sont suffisantes pour expliquer de manière raisonnable le mécanisme de la diapause dans de telles conditions. Cependant, si on transfère la même variété de ver à soie tempéré dans une niche tropicale (Indienne), la prévision devient fausse. Mais, les œufs subissent une diapause à chaque génération, bien que les conditions soient adaptées à la continuation de la vie. On a émis l'hypothèse que pour surmonter ce type de paradoxe, la nature a mis au point une autre adaptation fonctionnelle dans les conditions tropicales, en activant un gène spécial pour annuler les résultats de toutes les prévisions antérieures, comme c'est le cas avec KS-10. L'invention de l'héritage paternel du voltinisme a ouvert de nouvelles perspectives dans le domaine de la diapause.

Il reste encore à entreprendre de nombreux travaux pour comprendre le mécanisme d'héritage paternel du voltinisme. Cela est très important, surtout dans les conditions indiennes, parce que plus de 95 % de la soie grège produite provient d'hybrides sans diapause (connus localement comme des cross-breeds). Le maintien et le dépassement de la diapause chez les hybrides bivoltins sont des activités très qualifiées qui débouchent sur de nombreux goulets d'étranglement dans la pratique. Le dépassement naturel de la diapause par les gènes paternels représente un outil qui pourrait servir de passerelle entre des cross-breeds sans diapause modérément productifs et des bivoltins à diapause très productifs.

CLONING *BOMBYX MORI* L. FEMALE GENOTYPES BY IMPLANTATION OF DONOR'S OVARIES INTO PARTHENOCLONAL FEMALES

K. A. DOROSHENKO & V. V. KLYMENKO

V.N. Karazin Kharkov National University, Germ and Stem Cells Laboratory, Svobody Sq. 4, Kharkov 61077, Ukraine.

The eggs produced in the ovaries that had been transplanted from two inbred lines (with no ability to thermal parthenogenesis) into parthenoclone females have been shown to acquire the parthenocloning potential. Earlier clone creation was possible only at a high level of heterozygosity of any genotype to be cloned. The results obtained in this study definitely show that certain expansion of the spectrum of cloned female genotypes is possible. We have observed for the first time hundreds of clones derived from some "zero" breeds; their continuous clonal reproduction needs ovary implantation into a record parthenoclone, P29 being the best recipient. The approach will be also used for searching genes that determine the ability for Astaurov thermal parthenogenesis.

Keywords: *Bombyx mori*, oogenesis, thermal parthenogenesis, genotype cloning, gonad transplantation, inbreeding, heterosis.

INTRODUCTION

The silkworm *Bombyx mori* L. was the first animal object, in which the experimental genotype cloning has been realized, with success far surpassing the subsequent achievements in transnuclear cloning on amphibians and mammals (Astaurov, 1940, 1973). Having been reproduced during many years, the silkworm parthenoclones have been clearly and convincingly demonstrating phenotypic ontogenetic lability (plasticity) even if the development of clonal individuals had been synchronized and took place in "identical" conditions. It is more than that, having made aware of the results of parthenocloning in the silkworm, it is becoming inevitable to just forget about phenotypic identity of individuals of a clone together with "identical" internal and/or external conditions of individual development. They simply do not exist. (Klymenko, Spiridonova, 1978; Klymenko *et al.*, 1980; Klymenko, 2001).

However, the genotype cloning in the silkworm by means of thermal parthenogenesis has some restrictions: firstly and as a matter of course, it is the restriction by female sex, if it is the question of parthenogenesis. Further, within the limits of female sex essential restrictions of parthenocloning arise in connection with the fact that clone creation is possible only at a high level of heterozygosity of the genotype to be cloned (Astaurov, 1940; Altukhov, Klymenko, 1978). Hereupon clones inside breeds and, especially, inbred lines have not been obtained at all during more than 70 years; in other words, none of the interesting and unique for genetic research female genotypes, that emerged spontaneously or had been induced in inbred material, could have been cloned by Astaurov method.

It has also to be noticed that cloning male genotypes by means of artificial dispermic androgenesis can be achieved only in the case of an absolutely homozygous male-founder, in which any two spermatozoa produced are considered as genetically identical (Strunnikov, Lezhenko, 1982). The problem of cloning any male genotype remains for the silkworm the destiny of its future.

In the present work has been shown the opportunity for parthenocloning female genotypes from some breeds and lines, where ability to full parthenogenesis and, hence, to cloning is absent. Positive results have been reached through implanting at the same developmental stages the ovaries of "zero" donors into larvae of stable parthenoclones from the laboratory collection. We supposed that during *in vivo* culture in the organism of a "successful" parthenoclone the mature egg components (proteins) missing for complete parthenogenesis would enter the donor oocytes during oogenesis from the recipient organism, the composition of oocyte, as is known, being formed appreciably due to the proteins and other components synthesized outside the ovaries. Earlier we have shown with ovary transplantations that some egg proteins of the heterozygotic clone (recipient), which were lost in its inbred descendants (donors), come back into the mature eggs of the implanted ovary from the recipient in parallel with increased donor's ability to parthenocloning, the latter being reduced during inbreeding (Klymenko, 1988, 2001, 2006).

MATERIAL AND METHODS

The breeds and parthenoclones of the laboratory silkworm collection have been used for the study. Most part of our experimentation has been carried out on Sovietskaya-5 (S-5) breed where due to sex-marked eggs early separation of male and female larvae is possible, the pigmented eggs giving rise to females, nonpigmented – to males (Strunnikov, 1971). Ineffective efforts of cloning this breed with Astaurov technique have been undertaken for many years; at present, when S-5 has passed through many generations of inbreeding and became a line, thermoactivation of its unfertilized eggs, though results sometimes in appreciable number of egg pigmentation indicative of embryonic development, never reaches the hatching stage. S-5 has been often used as the "zero" donor of ovaries for transplantations. Line-analyzer *mo*, a laboratory line with many recessive markers in homozygous state, is much more inbred, more stable and viable than S-5, with zero ability to parthenocloning, lacking egg pigmentation in normal development (*w*₂), with nonactivated egg numbers estimated by percentage of shrunk (nonpigmented) eggs.

The recipient material used in this study includes two parthenoclones that were selected many years ago by Astaurov's team: P29 - the record diploid clone with practically 100% complete thermoparthenogenesis (Astaurov, 1973) and P4n17 - a tetraploid clone with semicentennial history of persisting. Other clones were created later by V.Klymenko as a result of his selection work.

The method of gonad transplantation in the larval period of silkworm development is simple enough and described in detail earlier. One donor's ovary was placed between the ovaries of the recipient, the operation place was then treated with alcohol and the operated larva was put on a piece of sterile paper close to fresh leaves. At imago stage the moths were dissected and the graft ovarioles were separated from recipient ones (Spiridonova *et al.*, 1987).

The procedure of preparing unfertilized eggs from moths for parthenocloning, washing off ovariole cells from the eggs, thermal induction of ameiotic parthenogenesis are described in detail in Astaurov's classical work (1940). According to his method the eggs are excised from the ovarioles of a moth and heated in water at 46° C during 18 min, the ability to thermoparthenogenesis (parthenocloning) being estimated by the percentage of the eggs that have formed the pigmented serose (the percentage of pigmentation is traditionally accepted in the silkworm as an estimate of successful egg activation) and the percentage of the larvae that hatched from the pigmented, i.e. activated, part of the grain. The latter is considered as the main measure of the individual ability to parthenocloning. On "parthenodiagrams" of the present work where the coordinate axes correspond to the specified parameters, the ability to cloning is presented by a separate point for each implanted ovary. So, the increasing ability to parthenocloning will come to light on the diagrams as arrangement of the experimental points (*m* stands for implant weighted averages) between the control values for the donor (*d* stands for donor) and for the recipient (*r* stands for recipient).

RESULTS AND DISCUSSION

It would be difficult to evaluate the efficiency of our method without taking into account survival rate of the operated material and the implanted ovaries. According to four years experimentation on donor breed S-5 and recipient P29 clone 77% of the operated larvae survive up to imago stage, on average, and 56% - survive and contain the implanted ovary. With other recipients we had, at the same time, 68% and 53% respectively. The transplantations have been carried out at all larval instars starting from the second one. Survival rate of the operated larvae and grafts do not seem to depend on the age, at which operation is made, but the results obtained appear always better if, within the limits of the same instar, the donor is somewhat elder than the recipient.

Whether the increase in ability to parthenocloning found in this study depends on larval age chosen to carry out ovary transplantation? Long-term data have shown that a little bit more effectively the method works in III and IV larval instars. However that is more likely explainable by a better convenience of those stages for the ovary transplantation procedure than by some specific age influence on oogenesis in the graft.

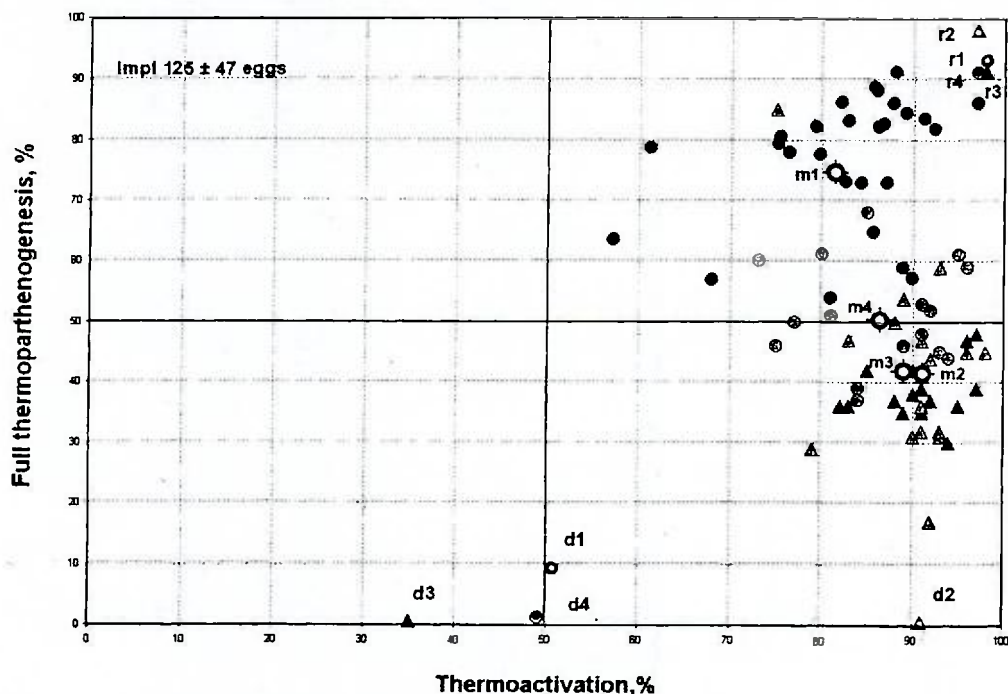


Fig. 1. Imparting ability for parthenocloning to breed S-5 by implantation its ovaries into parthenoclone P29 at larval stage.

(Results of different years are shown by different markings, impl – implant egg number; number of grafts is 73).

Fig. 1. Transmission de l'aptitude au parthénoclonage à la lignée S-5 par l'implantation de ses ovaires chez le parthénoclone P29 au stade larvaire.

(Les résultats des différentes années sont représentés par les différents marquages, impl - nombre d'oeufs implantés, le nombre de greffes est de 73)

During four years we repeated our experiments on parthenocloning S-5 by transplanting ovaries of this breed into P29 clone larvae (Fig.1). Though results differed depending on year, the increase in ability to parthenocloning is evident and can reach sometimes ca 90%. It should be noticed that even 20% (it is the minimal efficiency of the method) can suffice for many experiments with use of parthenocloning.

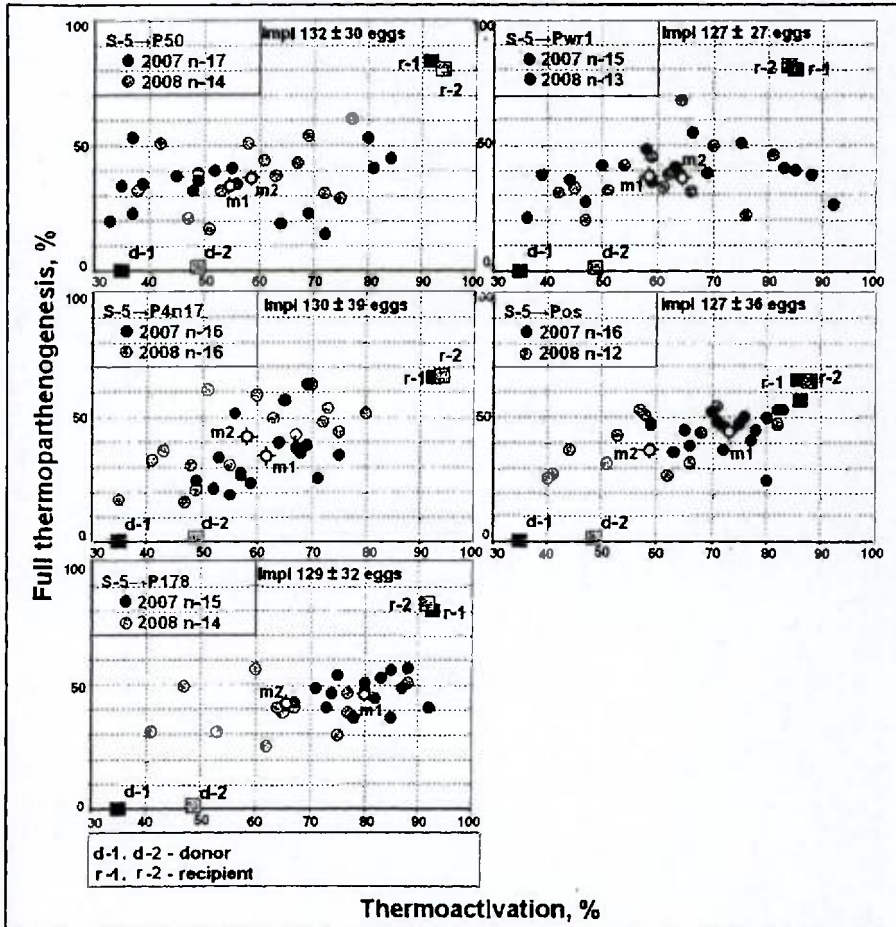


Fig. 2. Different clones-recipients in transferring their ability for parthenocloning to S-5 breed. (two years' data are given for each clone).

Fig. 2. Différents récepteurs de clones pour transférer leur aptitude au parthénoclonage à la lignée S-5 (deux années de données sont présentées pour chaque clone).

We have studied also dependence of the ovary transplantation effect on recipient clone. First of all, for this purpose we used other than P29 parthenocloning from the laboratory collection that have lower ability to thermoparthenogenesis (Fig.2). From two years' data presented separately for each clone can be seen that highest levels of acquired ability to parthenocloning, which never exceed the

recipient estimates, are lower than for P29 recipient. As clusters of data for one year are more loose horizontally than vertically we can conclude that the variation of thermoactivation is wider than variation of ability to parthenocloning. The deviations of these clusters from control values of the corresponding recipients appear different for different clones but practically all experimental points of the used donor (S-5) lie above 20% ability to full parthenogenesis that can be considered in the silkworm as sufficient for parthenocloning. In each diagram there is a significant amount of data above 50% level what can be considered as appreciable success if compared with the practicable selection for genetically determined ability to full thermoparthenogenesis. Of course, for the guaranteed increase in ability to cloning of line or breed genotypes we used clone P29 as the recipient.

In a separate experiment we estimated the influence of the ovary transplantation procedure on ability to parthenocloning. The data obtained can be considered as control to our series of experiments where the ovaries were transplanted between parthenoclones (Fig.3). We can say that disturbance of the natural processes of oogenesis as a result of the ovary implantation into the recipient of the same genotype causes some decrease in ability to parthenocloning; however, more correct estimates of this negative effect would require experimentations with more careful synchronization of the physiological conditions of the donor and the recipient chosen for ovary transplantation. We see (Fig.3) that at high levels of ability to parthenocloning (80-90 %), implantation of the ovaries from the "poorer" donor into the "better" recipient does not result in increase of the parameter in question, because from the reciprocal combination and the control one (P29 into P29) we can conclude that the evident negative effect of gonad transplantation is sufficient to suppress the increased donor ability to parthenocloning.

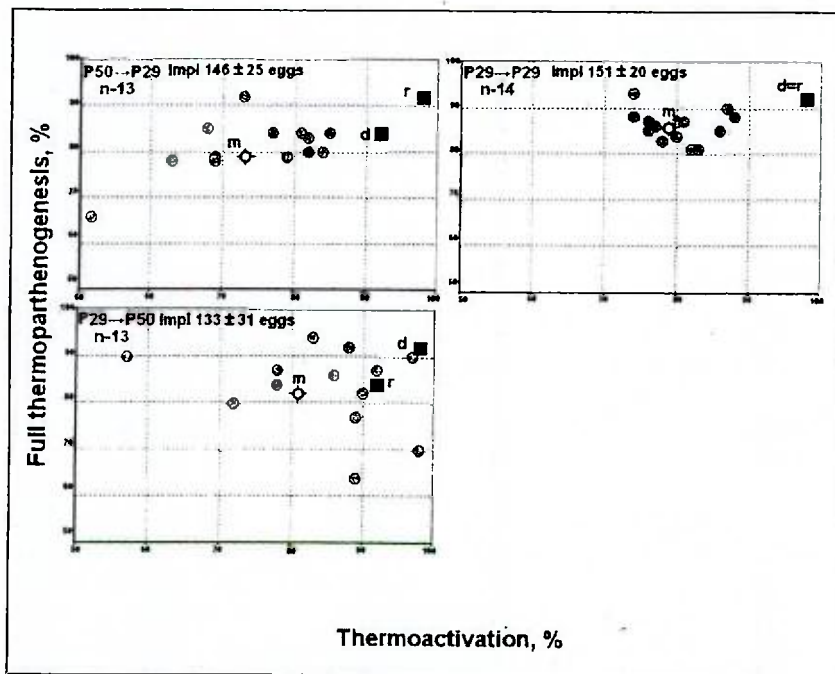


Fig. 3. Changes in the ability for parthenocloning after ovary transplantation between clones.

Fig. 3. Changements de l'aptitude au parthénoclonage après la transplantation des ovaires entre les clones.

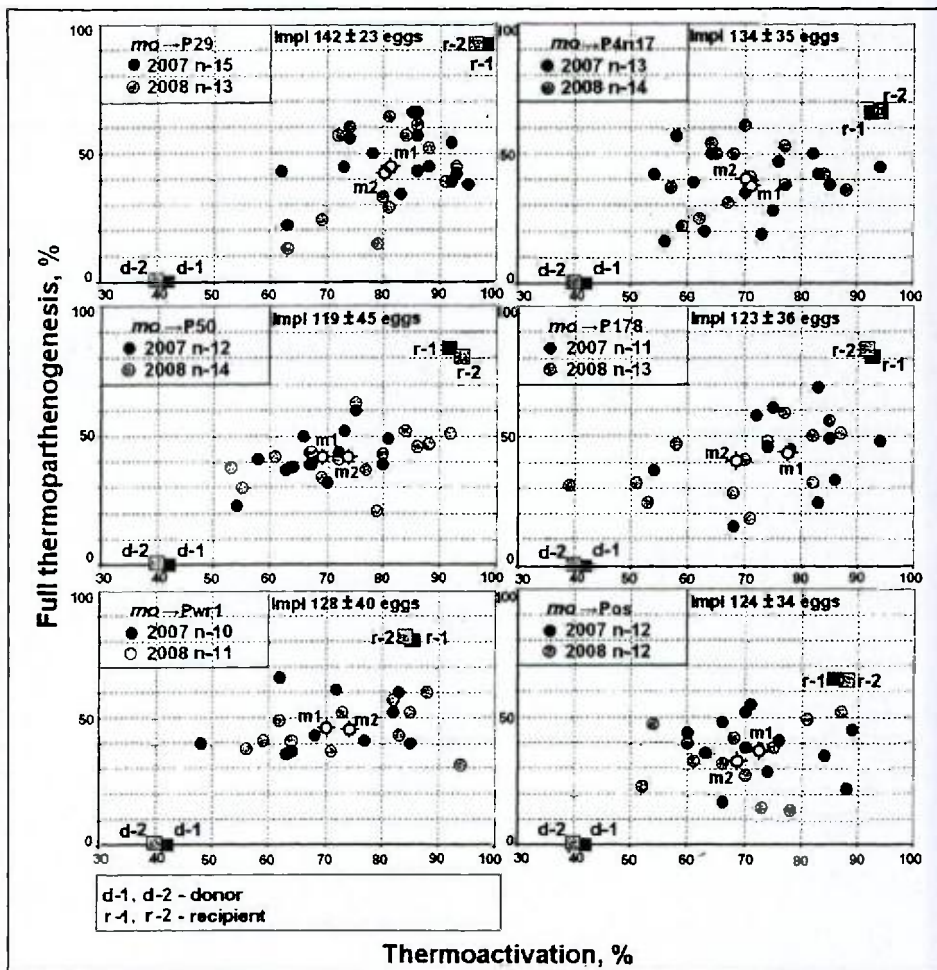


Fig. 4. Giving the ability for parthenocloning to inbred line *mo* (results of two year's experimentation).

Fig. 4. Transmission de l'aptitude au parthénoclonage à la lignée consanguine mo (ce sont les résultats de deux années d'expérimentation).

Unlike S-5 breed line-analyzer *mo* used in this study is much more inbred; nevertheless it is very stable, has high viability but does not possess ability to parthenocloning. Line *mo* is homozygous at not less than eight recessive marker loci. Six parthenocloning of the laboratory collection were used as recipients; experiments have been carried out twice in different years (Fig.4). The eggs of line *mo* do not pigment (*w*₂ - absence of the pigment), therefore successful thermoactivation was evaluated by percentage of not shriveled eggs. More important are the received estimations of full parthenogenesis, i.e. the ability to parthenocloning: in all recipients the overwhelming majority of the estimates (in case of Pwr1 - all) are above 30% level. Though the clones-recipients differ in their ability for thermoparthenogenesis (the difference between Pos and P29 averages about 30%) we could find in all cases the grafts in which the developed eggs showed hatching not less than 50%, what

figures in the diagrams as juxtaposition of the maximal estimates of graft cloning with control recipient data when the latter noticeably below than for P29 (Pos and P4n17). It also means that record parthenogenetic parameters of P29 clone have no special effect in giving *mo* line the ability to parthenocloning; on the other hand, we can guess that not all P29 clone potential, which provides giving to the graft some ability to parthenogenesis, was used in the approach presented here.

Naturally, there arises a question, whether parthenoclones are necessary for giving to a female genotype some ability to parthenocloning? Perhaps, it would be quite enough to implant donor's ovaries into females of the same line or a far distant one by origin (in the hope for cytoplasmic heterosis in donor's oocytes) to obtain from the graft some eggs capable to full thermoparthenogenesis?

In searching an answer to the question we can firstly address to the control experiments in which donor's ovaries were grafted in females of the same line or breed. In this case "zero" ability to cloning available in the donor breed (there is only partial egg pigmentation without hatching) becomes even less as far as the egg pigmentation is concerned (donors **d** in fig.1,2,4).

For understanding hereditary basis of the ability to parthenocloning of the graft oocytes we implanted clonal ovaries into females from the breeds without ability to full thermoparthenogenesis (Table I). Though in this case the ability to parthenocloning is appreciably lost, it remains above 50%; the same results being obtained when grafts were made into males of the breeds in question (Klymenko, Doroshenko, Zabelina, 2008).

Table I. Retention of the ability to parthenocloning at transplantation of clonal ovaries into females of the breeds (lines) that don't possess ability to full thermoparthenogenesis.

Tableau I. Rétention de l'aptitude au parthénoclonage lors de la transplantation d'ovaires clonaux chez les femelles des lignées qui ne possèdent pas d'aptitude à la thermoparthenogénèse complète.

N	Transplantation	Imago	Graft eggs (a)	Full parthenogenesis				
				Egg activation		Hatched larvae		
				n	%	n	% of	% of
				(b)			(a)	(b)
Parthénogénèse complète								
				Activation de l'oeuf		Larves écloses		
Œufs greffés (a)				n	%	n	% de	% de
				(b)			(a)	(b)
1	P29 → S-5 Female	34	5292	4763	90%	3386	71%	64%
2	Pl78 → S-5 Female	28	3243	2886	89%	1751	61%	54%
3	Pos → S-5 Female	29	3414	2629	77%	1707	65%	50%
4	P50 → S-5 Female	33	4297	3567	83%	2406	68%	56%
5	Pwr1 → S-5 Female	27	3911	3051	78%	1956	64%	50%
6	P29 → mo Female	26	3621	2897	80%	2390	83%	66%

Table II. Ability to parthenocloning after implantation "zero" donor ovary S-5 into "zero" recipient mo.

Tableau II. Aptitude au parthénoclonage après l'implantation de l'ovaire S-5 du donneur "zéro" dans le récepteur mo « zéro ».

	Full parthenogenesis				
Graft eggs (a)	Egg activation		I instar larvae		
Oeufs greffés (a)	Parthénogénese complète				
	Activation de l'oeuf		Larves du 1er âge		
	n (b)	%	n	% of (b)	% of (a)
94	33	35,1	0	0	0
96	36	37,5	0	0	0
108	23	21,3	0	0	0
143	100	69,9	1	1,0	0,7
58	17	29,3	0	0	0
109	37	33,9	0	0	0
87	31	35,6	0	0	0
115	99	86,0	1	1,0	0,9
67	28	41,7	0	0	0
36	14	38,8	0	0	0
143	36	25,1	0	0	0
135	32	23,7	0	0	0
102	31	30,3	0	0	0
87	41	47,1	1	2,4	1,2
51	17	33,3	0	0	0
122	43	35,2	0	0	0

The data obtained confirm that ability to full parthenogenesis is determined genetically and ontogenetically can be realized in the conditions of the developing implanted ovary even when the recipient genotype is not capable to parthenocloning. How, in this case, does zero ability of donor's eggs to parthenocloning grow up to an essential level after ovary culture in a recipient possessing this ability?

If the full autonomy of the ovary in formation of the ability to parthenogenesis took place, we would not obtain positive results in increasing the latter from zero level in this study. It is well-known that during oogenesis into the ovary and oocytes many substances come from the hemolymph. For now important is that into donor's oocytes from the recipient organism that possess the ability for thermal parthenogenesis, can enter some substances (proteins) that together with ones autonomously produced in the ovary and in the oocytes can give to the implant eggs a quite measurable ability to complete parthenogenesis. In a record parthenoclone these two protein systems (and, respectively, two gene systems: O, for the ovary genes whose products are inside of or enter the oocyte, and S, for the extraovary somatic genes that cause additional proteins come in the oocyte) effectively matched in the frame of the clonal genotype as the result of the previous prolonged selection. After implantation

of a parthenoclonal ovary into the "zero" recipient the donor genotype probably acts in its normal way and provides, in any case, not less than 50% of complete parthenogenesis and sometimes much more, when the recipient essentially fills up the composition of the donor oocyte with some of the proteins that are necessary for full parthenogenetic development. Another situation can be expected after implantation of zero donor's ovaries into a parthenoclone: the gene complex ($P=O+S$), which provides the full parthenogenesis to the recipient, cannot express in full outside the ovary and oocyte, only its part (S) participates, mostly through the hemolymph, in giving some ability to full parthenogenesis to the graft oocytes, whereas its main part (O) may be presented poorly in the donor ovary (O'), for example, mostly by the ineffective alleles. In our study the donor part O' of the genic complex (P) for full parthenogenesis was sufficient to provide, together with the part S of the recipient clone, a quite measurable increase in ability to parthenocloning but not up to level O+S of the recipient. If in donor part O' the "parthenogenetic" alleles are very rare, the level of parthenogenesis due to S may be not enough for cloning. Now we are in search for such genotypes, as we consider them necessary for further genetic and molecular analysis of the ability to complete thermal parthenogenesis.

Table III. Ability to parthenocloning after implantation "zero" donor ovary *mo* into "zero" recipient S-5.

*Tableau III. Aptitude au parthénoclonage après l'implantation de l'ovaire *mo* du donneur "zéro" dans le récepteur "zéro" S-5.*

Graft eggs (a)	Full parthenogenesis				
	Egg activation		I instar larvae		
	n (b)	%	n	% of (b)	% of (a)
<i>Parthénogénèse complète</i>					
Oeufs greffés (a)	Activation de l'oeuf		Larves du 1er âge		
	n (b)	%	n	% de (b)	% de (a)
81	26	32,1	1	3,8	1,2
39	16	41,0	0	0	0
56	9	16,1	0	0	0
100	30	30,0	0	0	0
93	13	14,0	0	0	0
121	40	33,1	0	0	0
66	18	27,3	0	0	0
174	141	81,0	2	1,4	1,1
48	17	35,4	0	0	0
77	25	32,4	0	0	0
63	18	28,5	0	0	0
76	14	18,4	0	0	0
120	93	77,5	1	1,1	0,8
52	19	36,5	0	0	0
88	19	21,6	0	0	0

It follows from the above that if the protein complex for full parthenogenesis (O+S) is not presented by effective alleles in the donor ovary, its implantation into a "zero" recipient may not add anything essential to the oocyte composition and, as a consequence, the level of full parthenogenesis in the implant progeny remains zero. Such results were obtained at ovary transplantations between the two breeds in our "zero" material (Table II, III).

Here in the reciprocal transplantations the results obtained are minimal, though they are, in efficiency, above the method used for cloning Dolly: a few I instar larvae have been produced for five various genotypes. It is worth noticing that in "successful" variants of this experiment we have rather high percentages of egg activation, with the graft egg numbers exceeding the average level. So far as the identity of the donor and recipient genotypes is excluded, the "success" of some graft combinations can be probably based on some more effective allelic combinations of the complex O+S, which provides the ability to full parthenogenesis. The increased quantity of eggs in "successful" grafts could denote a transplantational heterosis that was shown in the silkworm to correspond to the heterosis found at crossing the donor and recipient lines (Umeya, 1926). The correlation of the individual female heterozygosity with its ability to thermoparthenogenesis had been ascertained earlier (Altukhov, Klymenko, 1978) and now can be studied with use of the ovary transplantation method at the level of the soma and germ line interaction.

CONCLUSION

Though it would be prematurely to speak about the cloning of any female genotype in the silkworm, the results obtained in this study definitely show that certain expansion of the spectrum of cloned female genotypes is possible. We have observed for the first time many clones derived from some "zero" breeds; their continuous reproduction needs ovary implantation into a record parthenoclone, P29 being the best recipient. The transplantational cloning includes also an evident approach to molecular-genetic analysis of the mechanism underlying parthenocloning discovered by Astaurov. This work has already begun.

REFERENCES

- ALTUKHOV Y. P., KLYMENKO V.V. (1978) Positive correlation between level of individual heterozygosity and ability for complete thermal parthenogenesis in the silkworm. Dokl. Acad. Nauk USSR, 239(2), 460-462 (*in Russian, ER*).
- ASTAUROV B.L. (1940) Artificial parthenogenesis in the silkworm, *Bombyx mori* L., 240p, AN SSSR, Moscow-Leningrad (*in Russian, ER*).
- ASTAUROV B.L. (1973) Selection for ability for thermal parthenogenesis and production of silkworm clones improved for this character. Genetika (USSR), 9(9), 93-106 (*in Russian, ER*).
- KLYMENKO V.V., SPIRIDONOVA T.L. (1977) Transpolyploidal combinative variability in artificial parthenogenesis in the silkworm. Dokl. Acad. Nauk USSR, 236, 740-744 (*in Russian, ER*).
- KLYMENKO V.V. (1988) Parthenogenetic development of the silkworm. Dr. Biol. Sci., 348 p, Thesis. Leningrad. (*in Russian*)
- KLYMENKO V.V., VOROBIOVA L.I., SHAKHBAZOV V.G. (1980) Morphological trait penetrance control by temperature in silkworm parthenocloning. Dokl. Acad. Nauk USSR 252, 732-735 (*in Russian, ER*).
- KLYMENKO V.V. (2001) Parthenogenesis and cloning in the silkworm *Bombyx mori* L.: problems and prospects. J. Insect Biotechnol. Sericol. 70, 156-164.
- KLYMENKO V.V., SPIRIDONOVA T.L., FROLOVA N.M. (2006) Ooplasmic determinants of silkworm egg capability for complete thermic parthenogenesis. Biologicheskii vestnik (Ukraine), 10, 103-108.

- SPIRIDONOVA T.L., SHCHEGELSKAYA E.A., KLYMENKO V.V. (1987) Gonad transplantations in larval stages of Lepidoptera. *Izv. Akad. Nauk Moldavskoy SSR*. 2, 68-71. (*in Russian*)
- STRUNNIKOV V.A., LEZHENKO S.S., STEPANOVA N.L. (1982) Genetically identical copies of the mulberry silkworm.. *Theoret. Appl. Genet.* 63, 307-315.
- STRUNNIKOV V.A. (1971) Obtaining of sex-linked inheritance of characters controlled by autosomal genes in the mulberry silkworm. *Dokl. Acad. Nauk USSR*. 200, 1218-1222 (*in Russian, ER*).
- UMEYA Y. (1926) Experiments of ovarian transplantation and blood transfusion in silkworms, with special reference to the alternation of voltinism. *Bull. Govern. Sericult. Exp. Sta.* 1, 1-26.
- ZABELINA V., KLYMENKO V. (2008) Ovary transplantations in the silkworm *Bombyx mori* L.: parthenocloning by eggs produced in male recipient. *Sericologia*. 48, 123-128.

CLONAGE DE GENOTYPES FEMELLES DE *BOMBYX MORI* PAR L'IMPLANTATION D'OVAIRES DE DONNEURS CHEZ DES FEMELLES PARTHENOCLONALES

K. A. DOROSHENKO & V. V. KLYMENKO

V. N. Karazin Kharkov National University, Germ and Stem Cells Laboratory, Svobody Sq. 4,
Kharkov 61077, Ukraine.

Les oeufs produits dans les ovaires qui avaient été transplantés à partir de deux lignées consanguines (sans aptitude à la parthénogenèse thermique) dans des femelles parthénoclones s'avèrent avoir acquis le potentiel au parthénoclonage. Auparavant, la création de clones n'était possible qu'à un niveau élevé d'hétérozygotie de n'importe quel génotype à cloner. Les résultats obtenus dans cette étude montrent qu'il est assurément possible d'élargir le champ des génotypes femelles que l'on peut cloner. Nous avons observé pour la première fois des centaines de clones obtenus à partir de lignées zéro, leur reproduction clonale continue nécessitant l'implantation d'ovaires chez un parthénoclon record, P29, qui est le meilleur récepteur. On peut aussi utiliser cette approche pour chercher les gènes qui déterminent l'aptitude à la parthénogenèse thermique d'Astaurov.

INTRODUCTION

Le ver à soie *Bombyx mori* L. a été le premier animal, chez lequel on a réussi un clonage expérimental de génotypes, dépassant de beaucoup les réussites considérables du clonage transnucléaire chez les amphibiens et chez les mammifères (Astaurov, 1940, 1973). Ayant été reproduits pendant de nombreuses années, les parthénoclones du ver à soie ont montré de manière claire et convaincante la labilité ontogénique (plasticité) phénotypique, même si la mise au point d'individus clonés avait été synchronisée et avait eu lieu dans des conditions identiques. Ayant pris conscience des résultats du parthénoclonage chez le ver à soie, il est inévitable d'oublier l'identité phénotypique des individus d'un clone ainsi que les conditions « identiques » internes et / ou externes de développement individuel. Elles n'existent tout simplement pas (Klymenko, Spiridonova, 1978 ; Klymenko et coll., 1980 ; Klymenko, 2001).

Cependant, le clonage de génotypes chez le ver à soie au moyen de la parthénogenèse thermique présente certaines restrictions, d'abord bien entendu, c'est la restriction par le sexe femelle, s'il est question de parthénogenèse. Par ailleurs, dans les limites du sexe femelle, des restrictions essentielles au parthénoclonage existent car la création de clone n'est possible qu'à un niveau élevé d'hétérozygotie du génotype à cloner (Astaurov, 1940 ; Altukhov, Klymenko, 1978). A partir de là, on n'a pas obtenu de clones au sein des lignées et, surtout, au sein des lignées consanguines pendant plus de 70 ans ; en d'autres termes, aucun des génotypes femelles intéressants et uniques pour la recherche génétique, émergeant de manière spontanée ou induit à partir de matériel consanguin, n'aurait pu être cloné avec la méthode d'Astaurov.

On doit aussi remarquer que le clonage de génotypes mâles au moyen de l'androgenèse dispermique artificielle n'est possible que dans le cas d'un fondateur mâle absolument homozygote, chez qui n'importe lesquels de deux spermatozoïdes produits sont considérés comme génétiquement identiques (Strunnikov, Lezhenko, 1982). Le problème du sort du ver à soie dans le futur reste le clonage de n'importe quel génotype mâle. Dans ce travail, nous montrons l'opportunité du

parthénoclonage de génotypes femelles à partir de breeds et de lignées, où l'aptitude à la parthénogenèse complète et donc au clonage est absente. Des résultats positifs ont été obtenus par l'implantation, aux mêmes étapes de développement, d'ovaires des donneurs « zéro » chez des larves de parthénoclones stables de la collection du laboratoire. Nous avons supposé que pendant la culture *in vivo*, les composants de l'œuf mûr (les protéines) manquant au sein de l'organisme d'un parthénoclon « réussi » pour une parthénogenèse complète, entreraient dans les ovocytes du donneur pendant l'ovogenèse, en provenance de l'organisme récepteur, la composition de l'ovocyte, comme on le sait, se formant sensiblement en raison des protéines et d'autres composants synthétisés à l'extérieur des ovaires. Auparavant, nous avons montré avec les transplantations d'ovaires que certaines protéines de l'œuf du clone hétérozygote (récepteur), qui avaient été perdues chez les descendants consanguins (donneurs) revenaient dans les œufs mûrs de l'ovaire implanté en provenance du récepteur, en parallèle avec l'augmentation de la capacité du donneur au parthénoclonage, cette dernière diminuant au cours de la consanguinité (Klymenko, 1988, 2001, 2006).

MATERIELS ET METHODES

Dans l'étude, on utilise les lignées et les parthénoclones de la collection de vers à soie du laboratoire. La plus grande partie de notre expérience a été réalisée avec la lignée Sovietskaya-5 (S5), qui grâce aux œufs marqués au sexe, permet une séparation précoce des larves mâles et femelles, les œufs pigmentés donnant naissance à des femelles et les œufs non pigmentés à des mâles (Strunnikov, 1971). Des essais inefficaces de clonage de cette lignée avec la technique d'Astaurov ont été entrepris depuis de nombreuses années ; à présent, depuis que S-5 est passé par de nombreuses générations d'élevage consanguin et est devenue une lignée, la thermoactivation de ses œufs non fécondés, bien qu'elle donne parfois un nombre appréciable de pigmentation des œufs, qui indique un développement embryonnaire, n'atteint jamais le stade de l'éclosion. S-5 a souvent été utilisé comme le donneur zéro d'ovaires pour les transplantations. L'analyseur de lignée *mo*, une lignée de laboratoire avec de nombreux marqueurs récessifs à l'état homozygote est beaucoup plus consanguine, plus stable et viable que S-5, avec une aptitude zéro au parthénoclonage, des œufs qui ne se pigmentent pas au cours du développement normal (*w*₂) et dont on estime le nombre d'œufs non activés d'après le pourcentage d'œufs rétrécis (non pigmentés).

Le matériel récepteur utilisé dans cette étude inclut deux parthénoclones qui ont été sélectionnés il y a de nombreuses années par l'équipe d'Astaurov : P29 – le clone diploïde record avec près de 100 % de thermoparthénogenèse complète (Astaurov, 1973) et P4n17 – un clone tétraploïde avec une histoire de persistance presque centenaire. Les autres clones ont été créés plus tard par V. Klymenko, à la suite de son travail de sélection.

La méthode de transplantation des gonades, pendant la période de développement larvaire du ver à soie est assez simple et a été décrite en détail auparavant. Un ovaire du donneur est placé entre les ovaires du récepteur, on traite ensuite l'endroit de l'opération avec de l'alcool et la larve opérée est placée sur un morceau de papier stérile, à côté de feuilles fraîches. On dissèque les papillons au stade d'imago et on sépare les ovarioles greffées de celles du récepteur (Spiridonova et coll., 1987).

La procédure de préparation des œufs non fécondés des papillons pour le parthénoclonage, le nettoyage des cellules des ovarioles des œufs, l'induction thermique de la parthénogenèse améiotique sont décrits en détail dans les travaux classiques d'Astaurov (1940). Selon sa méthode, on excise les œufs des ovarioles d'un papillon et on les chauffe dans l'eau à 46° C pendant 18 min., l'aptitude à la thermoparthénogenèse (parthénoclonage) étant estimée d'après le pourcentage d'œufs qui ont formé une sereuse pigmentée (le pourcentage de pigmentation étant traditionnellement accepté chez le ver à soie comme une estimation d'activation réussie des œufs) et le pourcentage de larves ayant éclos sur les œufs pigmentés, c'est-à-dire sur les œufs activés, comme partie du grainage. Ce dernier est

considéré comme la mesure principale de l'aptitude individuelle au parthénoclonage. Sur les « parthénodiagrammes » de cette étude où les axes des coordonnées correspondent aux paramètres mentionnés, l'aptitude au clonage est représentée par un point séparé pour chaque ovaire implanté. Ainsi, l'augmentation de l'aptitude au parthénoclonage sera mise en lumière sur les diagrammes d'après la disposition des points expérimentaux (*m* signifiant moyennes des implants au poids) entre les valeurs témoins pour le donneur (*d* signifiant donneur) et pour le récepteur (*r* signifiant récepteur).

RESULTATS ET DISCUSSION

Il serait difficile d'évaluer l'efficacité de notre méthode sans prendre en compte le taux de survie du matériel opéré et des ovaires implantés. Sur quatre années d'expérimentation avec la lignée donneuse S-5 et le clone récepteur P29, 77 % des larves opérées survivent jusqu'au stade de l'imago, en moyenne, et 56 % survivent et contiennent l'ovaire implanté. Avec les autres récepteurs nous avons obtenu, au même moment, respectivement 68 % et 53 %. Les transplantations ont été réalisées pendant tous les stades larvaires, en commençant à partir du second stade larvaire. Le taux de survie des larves opérées et des greffes ne semble pas dépendre de l'âge auquel on procède à l'opération, mais les résultats obtenus semblent toujours meilleurs si, dans les limites du même âge, le donneur est un peu plus vieux que le récepteur.

Est-ce que l'augmentation de l'aptitude au parthénoclonage constatée dans cette étude dépend de l'âge larvaire choisi pour procéder à la transplantation des ovaires ? Les données à long terme ont montré que la méthode marche un peu plus efficacement pendant les 3^{ème} et 4^{ème} âges. Cependant, cela s'explique plus probablement, parce que ces âges conviennent mieux à la procédure de transplantation des ovaires qu'à une influence spécifique de l'âge sur l'ovogenèse dans la greffe.

Nous avons répété nos expériences sur le parthénoclonage de S-5 pendant quatre ans en transplantant les ovaires de cette lignée chez des larves du clone P29 (Fig. 1). Bien que les résultats diffèrent, en fonction de l'année, l'augmentation de l'aptitude au parthénoclonage est évidente et peut atteindre parfois presque 90 %. On doit noter que même 20 % (c'est l'efficacité minimale de la méthode) peuvent suffire pour de nombreuses expériences ayant recours au parthénoclonage.

Nous avons aussi étudié l'effet de dépendance de la transplantation de l'ovaire sur le clone récepteur. D'abord, dans ce but, nous avons utilisé d'autres parthénoclones que P29 de la collection du laboratoire, qui ont une aptitude plus faible à la thermoparthénogenèse (Fig. 2). D'après les données sur deux ans, présentées séparément pour chaque clone, on peut voir que les niveaux les plus élevés d'aptitude acquise au parthénoclonage, qui ne dépassent jamais les estimations pour le récepteur, sont plus faibles que pour le récepteur P29. Comme les groupes de données pour une année sont plus éparpillés horizontalement que verticalement, nous pouvons conclure que la variation de la thermoactivation est plus large que la variation de l'aptitude au parthénoclonage. Les écarts de ces groupes par rapport aux valeurs témoins des récepteurs correspondants semblent différents pour les différents clones, mais de manière pratique, tous les points expérimentaux du donneur utilisé (S5) dépassent le seuil de 20 % d'aptitude à la parthénogenèse complète, ce qui peut être considéré comme suffisant chez le ver à soie pour le parthénoclonage. Dans chaque diagramme, il y a une quantité significative de données au dessus du seuil de 50 %, ce que l'on peut considérer comme un succès appréciable par comparaison à la sélection praticable pour l'aptitude génétiquement déterminée à la thermoparthénogenèse complète. Bien sur, pour l'augmentation garantie de l'aptitude au clonage de génotypes de lignées ou de breeds, nous avons utilisé le clone P29 comme récepteur.

Dans une expérience séparée, nous avons estimé l'influence de la procédure de transplantation d'ovaires sur l'aptitude au parthénoclonage. Les données obtenues peuvent être considérées comme témoins par rapport à notre série d'expériences, où les ovaires ont été transplantés entre parthénoclones (Fig. 3). Nous pouvons dire que le dérangement des processus naturels de l'ovogenèse suite à l'implantation des ovaires chez le récepteur du même génotype, entraîne une certaine baisse

de l'aptitude au parthénoclonage ; cependant, des estimations plus correctes de cet effet négatif nécessiteraient des expérimentations avec une synchronisation plus attentive des conditions physiologiques du donneur et du récepteur, choisis pour la transplantation de l'ovaire. Nous observons (Fig. 3) qu'à des niveaux élevés d'aptitude au parthénoclonage (80 à 90 %), l'implantation des ovaires du donneur « le plus pauvre » chez le « meilleur » récepteur n'entraîne pas l'augmentation du paramètre en question, parce que d'après la combinaison réciproque et témoin (P29 dans P29), nous pouvons conclure que l'effet négatif évident de la transplantation des gonades est suffisant pour supprimer l'augmentation de l'aptitude du donneur au parthénoclonage.

A l'inverse de la lignée S-5, l'analyseur de lignée *mo* utilisé dans cette étude est beaucoup plus consanguin, néanmoins il est très stable, a une viabilité élevée, mais ne possède pas d'aptitude au parthénoclonage. La lignée *mo* est homozygote à non moins de huit loci marqueurs récessifs. On a utilisé six parthénoclones de la collection de laboratoire comme récepteurs, les expériences ont été réalisées deux fois pendant différentes années (Fig. 4). Les œufs de la lignée *mo* ne se pigmentent pas (w_2 – absence de pigment), on évalue donc la réussite de la thermoactivation par le pourcentage d'œufs non ridés. Plus importantes sont les estimations de parthénogenèse réussie obtenue, c'est-à-dire l'aptitude au parthénoclonage : chez tous les récepteurs, la majorité écrasante des estimations (dans le cas de Pwrl – toutes) sont au dessus du seuil de 30 %. Bien que les clones récepteurs diffèrent dans leur aptitude à la thermoparthénogenèse, (la différence entre les moyennes de Pos et de P29 tourne autour de 30 %), dans tous les cas, nous avons trouvé des greffes où les œufs qui se développent présentent une éclosion d'au moins 50 %, ce qui figure dans les diagrammes comme la juxtaposition des estimations maximales du clonage des greffes avec les données témoins pour les récepteurs, ces dernières étant remarquablement en dessous de celles de P29 (Pos et P4n17). Cela signifie aussi que les paramètres parthénogénétiques records du clone P29 n'ont pas d'effet spécial pour transmettre à la lignée *mo* l'aptitude au parthénoclonage ; d'autre part, nous pouvons deviner que tout le potentiel du clone P29, qui apporte quelque chose à l'aptitude de la greffe au parthénoclonage, n'est pas utilisé dans l'approche présentée ici.

Naturellement, une question se pose, est-ce que les parthénoclones sont nécessaires pour apporter à un génotype femelle une aptitude au parthénoclonage ? Il suffirait peut-être d'implanter les ovaires du donneur dans les femelles de la même lignée ou d'une autre plus éloignée par l'origine (dans l'espoir d'une hétérosis cytoplasmique dans les ovocytes du donneur) pour obtenir des oeufs aptes à une thermoparthénogenèse complète à partir de la greffe ?

Pour tenter de répondre à cette question, nous pouvons d'abord avoir recours aux expériences témoins dans lesquelles les ovaires du donneur sont greffés dans les femelles de la même lignée ou *breed*. Dans ce cas, l'aptitude « zéro » au clonage disponible chez la *breed* donneur (il y a seulement une pigmentation partielle de l'œuf sans éclosion) diminue encore en ce qui concerne la pigmentation des œufs (donneurs *d* dans les figs. 1, 2, 4).

Pour comprendre la part héréditaire de l'aptitude au parthénoclonage des ovocytes greffés, nous avons implanté des ovaires clonaux dans les femelles des *breeds* sans aptitude à la thermoparthénogenèse complète (Tableau I). Bien que dans ce cas, l'aptitude au parthénoclonage se perde sensiblement, elle reste au-dessus de 50 %. Les mêmes résultats ont été obtenus quand les greffes ont été réalisées chez les mâles des *breeds* en question (Klymenko, Doroshenko, Zabelina, 2008).

Les données obtenues confirment que l'aptitude à la parthénogenèse complète est déterminée génétiquement et ontogénétiquement et peut être réalisée dans les conditions de développement de l'ovaire implanté, même quand le génotype récepteur n'est pas apte au parthénoclonage. Comment, dans ce cas, l'aptitude zéro des œufs du donneur au parthénoclonage augmente à un niveau essentiel, après la culture de l'ovaire chez un récepteur possédant cette aptitude ?

Si l'autonomie complète de l'aptitude au parthénoclonage de l'ovaire en formation se produisait, nous n'obtiendrions pas dans cette étude de résultats positifs pour l'augmentation du niveau zéro. Il

est bien connu que pendant l'ovogenèse dans l'ovaire et dans les ovocytes, de nombreuses substances viennent de l'hémolymph. A présent, ce qui est important est que certaines substances (protéines) de l'organisme récepteur, qui possède l'aptitude à la parthénogenèse, peuvent entrer dans les ovocytes du donneur, qui avec celles qui sont produites de manière autonome dans l'ovaire et dans les ovocytes, peuvent donner aux œufs implantés une aptitude assez mesurable à la parthénogenèse complète. Chez un parthénoclone record, ces deux systèmes de protéines (et respectivement, ces deux systèmes de gènes : O pour les gènes de l'ovaire dont les produits sont à l'intérieur ou entrent dans l'ovocyte et S : pour les gènes somatiques extraordinaires qui font rentrer des protéines supplémentaires dans l'ovocyte) se fondent efficacement avec le cadre du génotype clonal suite à la sélection antérieure prolongée. Après l'implantation de l'ovaire parthénoclonal dans le récepteur « zéro », le génotype donneur agit probablement de manière normale et donne, de toute façon, pas moins de 50 % de parthénogenèse complète et parfois beaucoup plus, quand c'est essentiellement le récepteur qui remplit avec certaines des protéines, qui sont nécessaires au développement parthénogénétique complet, la composition de l'ovocyte du donneur. On peut s'attendre à une autre situation après l'implantation des ovaires du donneur « zéro » chez un parthénoclone : l'ensemble des gènes ($P = O + S$), qui apporte la parthénogenèse complète au récepteur, ne peut pas complètement s'exprimer en dehors de l'ovaire et de l'ovocyte, seule sa partie (S) participe, principalement par l'hémolymph à apporter une aptitude à la parthénogenèse complète aux ovocytes greffés, tandis que sa partie principale (O) pourrait être peu présente dans l'ovaire du donneur (O'), par exemple, principalement par des allèles inefficaces. Dans notre étude, la partie du donneur O' de l'ensemble génique (P) pour la parthénogenèse complète suffit à apporter, avec la partie S du clone récepteur, une augmentation assez mesurable de l'aptitude au parthénoclonage, mais pas au niveau O + S du récepteur. Si dans la partie O' du donneur les allèles « parthénogénétiques » sont très rares, le niveau de parthénogenèse dû à S pourrait ne pas être suffisant pour le clonage. Nous sommes maintenant à la recherche de génotypes de ce type, car nous les considérons nécessaires pour une analyse génétique et moléculaire supplémentaire de l'aptitude à la parthénogenèse complète.

Compte tenu de ce qui est précisé plus haut, si l'ensemble de protéines pour la parthénogenèse complète (O + S) n'est pas présenté par les allèles décisifs dans l'ovaire du donneur, son implantation chez un récepteur « zéro » pourrait ne rien ajouter d'essentiel à la composition de l'ovocyte et, par conséquent, le niveau de parthénogenèse complète dans la descendance implantée rester nul. De tels résultats ont été obtenus dans les transplantations d'ovaires entre les deux lignées dans notre matériel « zéro » (Tableaux II, III).

Ici, dans les transplantations réciproques, les résultats obtenus sont minimaux, bien qu'ils soient, en efficacité, au-dessus de la méthode utilisée pour cloner Dolly ; quelques larves du 1^{er} âge ont été produites pour cinq génotypes différents. Cela vaut la peine de souligner que chez les variants « réussis » dans cette expérience, nous avons des pourcentages plutôt élevés d'activation des œufs, avec le nombre d'œufs de la greffe dépassant le niveau moyen. Tant qu'on exclut l'identité des génotypes donneur et récepteur, on peut expliquer « le succès » de certaines combinaisons de greffe par des combinaisons alléliques plus efficaces de l'ensemble O + S, qui apportent l'aptitude à la parthénogenèse complète. L'augmentation de la quantité d'œufs dans les greffes « réussies » indique une hétérosis transplantationnelle qui s'avère correspondre chez le ver à soie à l'hétérosis que l'on rencontre quand on croise des lignées donneuse et receptrice (Umeya, 1926). On a déjà confirmé la corrélation entre l'hétérozygotie femelle individuelle et son aptitude à la thermoparthénogenèse (Altukhov, Klymenko, 1978) et on peut maintenant l'étudier en utilisant la méthode de transplantation d'ovaires au niveau de l'interaction entre la lignée somatique et germinale.

CONCLUSION

Bien qu'il soit prématuré de parler du clonage de n'importe quel génotype femelle chez le ver à soie, les résultats obtenus dans cette étude montrent assurément qu'un certain élargissement du champ des génotypes femelles que l'on peut cloner est possible. Nous avons observé pour la première fois de nombreux clones obtenus à partir de lignées « zéro » ; leur reproduction continue nécessite l'implantation d'un ovaire chez un parthénocloné record, P29, qui est le meilleur récepteur. Le clonage transplantationnel comprend aussi une approche évidente d'analyse moléculaire-génétique du mécanisme sous-tendant le parthénoclonage découvert par Astaurov. Ce travail a déjà commencé.

TESTING OF DIFFERENT BACKCROSS BREEDING GENERATIONS OF TROPICAL TASAR SILKWORM, *ANTHRAEA MYLITTA* DRURY

R. MANOHAR REDDY*, G. HANSDA, N. G. OJHA, N. SURYANARAYANA, SURESH RAI AND N. B. VIJAYAPRAKASH

P4 Division, Central Tasar Research and Training Institute, Central Silk Board, Ranchi [Jharkhand] - 835 303, India.

Testing of backcross breeding generations on recipient parents Jata, Raily with donor parent Daba of tropical tasar silkworm. Anthraea mylitta Drury revealed introgression of absolute silk yield (166.3 g) and filament denier (11.76) in Jata × Daba hybrid at BC2 level. Also, the shell weight (2.16 g), silk ratio (18.62 %), filament length (1554 m) have performed better, while the NBFL (non breakable filament length) decreased (189.7 m) over both donor (218.3 m) and recipient (301.3 m) parents. However, the absolute silk yield (35.87 g) was negative in Raily × Daba hybrid with no change in denier at BC2 level. But, the shell weight (2.36 g), silk ratio (18.96 %) and filament length (1394.3 m) have advanced. The superior performance of both the hybrids at F1 level, with higher absolute silk yield in Jata × Daba hybrid (152.3 g) and finer denier of filament in Raily × Daba hybrid (10.86) indicates their trait specific heterosis expression. The introgression of viability and superiority in terms of absolute silk yield and finer filament denier at BC2 level in Jata × Daba hybrid indicates the prospects of Jata and Daba ecoraces as material source for backcross breeding works in the direction of improving productivity and quality. The study suggest that the higher silk yield and finer silk filament traits can be attained in Jata by adopting backcross breeding with Daba ecorace.

Keywords: *Anthraea mylitta*, Divergent ecoraces, Backcross breeding, Silk associated traits

INTRODUCTION

Naturally occurring variation among wild relatives of domesticated insects was not exploited fully in breeding with particular reference to the economically important traits. Backcrossing is one of the effective methods to transgress desired traits into recipient parent from either domesticated or wild parent and however, the success depends on the selection of breeds with considerable genetic variation (Tazima, 1964, 1984; Kovalov, 1970; Maciejowski and Zieba, 1982; Falconer, 1985; Aruga, 1994; Zamir, 2001; Farooq *et al.*, 2002; Tzenov and Guzman, 2004; Moorthy *et al.*, 2007). In traditional backcross method, the recipient will reach almost near-isogenic by the end of 6th backcross generation from the donor parent (Babu *et al.*, 2005; Semagn *et al.*, 2006). The fecundity, cocoon weight and shell weight showed higher co-heritability, positive and significant correlations with the silk yield (Siddiqui *et al.*, 1989). The poor reelability of cocoon occurs when worms spin in the environment of high temperature and humidity (Singhvi and Bose, 1991). The breeding of silkworm parents with preferred traits using backcrossing followed by selection in subsequent generations can evolve superior varieties (Raju and Krishnamurthy, 1993). The out crossing with exotic races or repeated backcrossing could improve the commercial characters (Moghaddam *et al.*, 2005; Tuteja *et*

* E-mail: dr.manohar1959@rediffmail.com

et al., 2006) and introduction of polyvoltine traits into bi / vnivoltines is useful in developing resistant breeds (Das *et al.*, 2005). The introgressive hybridization has heterosis impact on silk quality with cumulative effect of genes and parental genetic diversity (Verma *et al.*, 2003). The desired characters in hybrids will reach that of the donor strain level in BC4 generation (Nakada, 1992; Chattopadhyay *et al.*, 2001). Better reeling performances were recorded in hybrids over pure races (Takabayashi *et al.*, 1994) and the cocoon weight is positively correlated with filament length and filament thickness is negatively correlated with filament length (Sekharappa *et al.*, 1999). The filament size deviation and expression of hybrid vigor in respect of post cocoon parameters were found varying under different temperature treatments (Kumar *et al.*, 1999, 2003; Rao *et al.*, 2003). The inadequacy of amenable genetic wealth in tasar silkworm compels to utilize applicable breeds and selection methods to improve silk related traits. The choosing of high shell weight and silk ratio of uni/bivoltine wild and high silk yield and low denier of bivoltine semi domesticated races and their permutation through repeated backcrossing to increase cocoon/silk yield and fineness of silk filament is the aspiration of present study.

MATERIAL AND METHODS

The three parental ecoraces Daba, Jata and Raily along with two each of F1, BC1 and BC2 hybrids raised using the semi domesticated Daba and wild Jata and Raily ecoraces of *Antheraea mylitta* D. were reared simultaneously in a randomized block design with three replications each during seed and commercial crops of 2006 and 2007 on the economic plantation of *Terminalia tomentosa* at field laboratory of Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi, India. The females of Jata and Raily ecoraces were crossed with males of Daba race to get F1 [Jata × Daba & Raily × Daba] and the females of F1 progenies were back crossed with Daba males to obtain BC1 hybrids and the females of BC1 progenies were back crossed with Daba males to obtain BC2 hybrids. During the course of breeding the parental cocoons were considered based on period of spinning, uniform shape and color, better shell weight and silk ratio, higher absolute silk yield in addition to better fecundity and hatching. Larvae of one Dfl in each parent as well as hybrid were considered as one replication during all the rearings and observations were recorded. The single shell weight, silk ratio percentages were calculated with equal number of random samples and absolute silk yield was calculated based on the average shell weight and cocoon yield per Dfl. The silk related technological characters like filament length, non breakable filament length (NBFL) and denier were studied on single cocoon basis among parents and F1, BC1 and BC2 hybrids at post cocoon technology division of the Institute. The data recorded on different parameters in the study were subjected to statistical analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

The variability in silk related traits under *in situ* conditions of the parental ecoraces (Table I), Daba, Jata and Raily indicates the superiority of wild races, Jata and Raily in all traits except for absolute silk yield and filament denier, where the semi domesticated Daba was superior. The performance levels of donor (Daba) and recipient (Jata & Raily) parents at field laboratory of the Institute at Ranchi, India (Table II) indicate better performances in commercial crop season (Sep-Nov) over the seed crop season (Jul-Aug). The variation was visible with better absolute silk yield and higher denier of commercial crop with low silk yield and finer denier of seed crop in respect of Daba and Jata, while it was vice versa and negligible in case of Raily race. The ANOVA (Table III) among three parents (one donor & two recipient) of two seasons in total six and six backcross hybrids (two each of F1, BC1 & BC2) indicate a significant variance (0.1% level) for the traits studied among parents, hybrids and parents versus hybrids except for silk ratio percentage among parents (5% level), denier among parents versus hybrids (5% level) and shell weight among hybrids (1% level). The

results of backcross hybrids over donor parent i.e. Daba (Table IV), show that the Jata × Daba at BC2 level recorded better performance in absolute silk yield followed by same hybrid at F1 level. However, no hybrid could surpass the donor parent in respect of denier and only nearer levels were attained by F1 hybrid of Raily × Daba followed by BC1 of Jata × Daba. The results of Jata × Daba backcross hybrids over the recipient parent i.e. Jata (Table IV), the highest absolute silk yield was recorded at BC2 level followed by same hybrid at F1 level. The lowest denier was recorded by Jata × Daba hybrid at BC1 level followed by BC2 over the recipient parent Jata. Among the hybrids of Raily × Daba, the denier was least at F1 level followed by BC1 and the absolute silk yield was insignificant and negative at all levels over the recipient parent, Raily. However, the Jata × Daba and Raily × Daba hybrids have recorded better performances at F1 and BC2 levels in respect of shell weight, silk ratio percentage and filament lengths compared to the parents and also the hybrids of BC1 level.

Table I. Variations in silk related traits of parental ecoraces Daba, Jata & Raily.

Tableau I. Variation des caractères liés à la soie chez les écoraces parentales Daba, Jata & Raily.

Parameter <i>Paramètre</i>	Daba		Jata		Raily	
	Range <i>Fourchette</i>	Ave. <i>Moyenne</i>	Range <i>Fourchette</i>	Ave. <i>Moyenne</i>	Range <i>Fourchette</i>	Ave. <i>Moyenne</i>
Shell weight (g) <i>Poids de la coque (g)</i>	1.25 - 2.36	1.80	1.60 - 2.34	2.05	1.97 - 2.82	2.23
Silk ratio (%) <i>Richesse soyeuse (%)</i>	14.13 - 16.28	15.07	15.94 - 18.95	17.45	15.67 - 19.67	18.66
Absolute silk yield (g) <i>Rendement absolu en soie (g)</i>	62.5 - 177.0	108.0	24.0 - 44.5	34.85	35.5 - 70.5	46.83
Filament length (m) <i>Longueur du filament (m)</i>	475 - 1240	962	840 - 1550	1184	570 - 1750	1385
Non breakable filament length [NBFL] (m) <i>Longueur du filament sans rupture (m)</i>	79 - 475	230	52 - 635	325	80 - 540	295
Denier (d) / Titre (d)	9 - 11	10	11 - 13	12	12 - 14	13

The selection of breeding methods is to develop a breed with stability and productivity in terms of quantity and quality of silk (Tazima, 1984) and for such an aspiration the apt method is repeated backcrossing (Tazima, 1964). The parental selection is always crucial and hence the variation in absolute silk yield and filament denier apart from varied shell weight, silk ratio percentage, filament length and non breakable filament length (NBFL) are the main reasons for selecting divergent wild and semi domesticated races for the present study.

Table II. Performance levels of donor [Daba (D)], recipient [Jata (R) & Raily (R)] parents during different seasons [values are mean and $\pm$ SE].

Tableau II. Niveaux de performance des parents donneur [Daba (D)], récepteur [Jata (R) & Raily (R)] pendant différentes saisons [les valeurs sont la moyenne $\pm$ l'écart type].

Race	Season	Shell weight (g)	Silk ratio (%)	Absolute silk yield	Filament length (m)	NBFL (m)	Denier (d)
	Saison	Poids de la coque (g)	Richesse soyeuse (%)	Rendement absolu en soie	Longueur du filament (m)		Titre (d)
Daba (D) (Donor Donneur)	Jul/Aug '06 Juillet./Août 06	1.56 $\pm$ 0.15	14.08 $\pm$ 1.18	96.23 $\pm$ 9.33	798.7 $\pm$ 86.24	218.3 $\pm$ 10.7	10.61 $\pm$ 0.17
Daba (D) (Donor Donneur)	Sep/ Nov '06	1.69 $\pm$ 0.05	15.44 $\pm$ 0.38	101.67 $\pm$ 3.93	871.7 $\pm$ 45.76	244.3 $\pm$ 10.9	10.87 $\pm$ 0.08
Jata (R) (Recipient Récepteur)	Jul/Aug '06 Juillet./Août 06	1.72 $\pm$ 0.09	15.63 $\pm$ 0.41	70.70 $\pm$ 2.95	1016.0 $\pm$ 79.00	301.3 $\pm$ 11.9	12.59 $\pm$ 0.36
Jata (R) (Recipient Récepteur)	Sep/Nov '06	1.87 $\pm$ 0.03	16.29 $\pm$ 0.14	101.17 $\pm$ 5.28	1093.3 $\pm$ 64.17	334.0 $\pm$ 25.7	12.76 $\pm$ 0.35
Raily (R) (Recipient Récepteur)	Jul/Aug '06 Juillet./Août 06	2.11 $\pm$ 0.09	15.30 $\pm$ 0.08	39.33 $\pm$ 3.16	1157.0 $\pm$ 83.17	218.3 $\pm$ 25.0	13.65 $\pm$ 0.39
Raily (R) (Recipient Récepteur)	Sep/ Nov '06	2.32 $\pm$ 0.13	16.72 $\pm$ 0.52	35.93 $\pm$ 5.98	1283.0 $\pm$ 33.78	261.3 $\pm$ 21.1	13.52 $\pm$ 0.270

NBFL: Non breakable filament length / Longueur du filament sans rupture.

Table III. ANOVA for six silk related traits among parents of seed crop (Jul-Aug) & commercial crop (Sep-Nov) seasons and F1, BC1 & BC2 hybrids.

Tableau III. ANOVA pour six caractères liés à la soie parmi les parents et les hybrides F1, BC1 et BC2 au cours des saisons de récolte de grainage (Juil- Août) et de récolte commerciale (Sept-Nov).

Source	Mean sum of squares						
Source of variation							
	DF	Shell weight (g)	Silk ratio (%)	Absolute silk yield (g)	Filament length (m)	NBFL (m)	Denier (d)
Source	Somme moyenne des carrés						
Source de variation	DL	Poids de la coque (g)	Richesse soyeuse (%)	Rendement absolu en soie (g)	Longueur du filament (m)		Titre (d)
Replicates / Répétitions	2	0.021	2.01	18.7	3000	345.9	0.275
Parents (P)	5	0.244***	2.48*	2795***	97600***	6511***	5.098***
Hybrids (H)	5	0.144**	6.35***	12194***	137817***	12917***	2.686***
P vs H	1	0.700***	75.57***	2962***	1477440***	10404***	1.117*
Error / Ecart	22	0.032	0.931	139.46	12789	709.1	0.226
Total	17	0.127	7.75	3943.7	144347	5369	1.180

NBFL: Non breakable filament length / Longueur du filament sans rupture.

* Significant at 5% / Significatif au seuil de 5 %.

** Significant at 1% / Significatif au seuil de 1 %

*** Significant at 0.1% / Significatif au seuil de 0,1 %

Table IV. Performance levels of Jata × Daba & Raily × Daba backcross hybrids at F1, BC1 & BC2 levels (values are mean, ± SE and % change over donor parent & recipient parent respectively).

Tableau IV. Niveaux de performance des hybrides de croisement de retour Jata × Daba & Raily × Daba aux niveaux F1, BC1 & BC2 (les valeurs sont la moyenne, ± l'écart type et le % de changement par rapport au parent donneur & au parent récepteur)

Combination	Season	Shell weight (g)	Silk ratio (%)	Absolute silk yield (g)	Filament length (m)	NBFL (m)	Denier (d)
Combinaison	Saison	Poids de la coque (g)	Richesse soyeuse (%)	Rendement absolu en soie (g)	Longueur du filament (m)		Titre (d)
Daba (D) Donor parent	Jul /Aug '06	1.56 ± 0.15	14.08±1.18	96.23 ± 9.33	798.7 ± 86.24	218.3 ± 10.7	10.61 ± 0.17
Jata (R) Recipient parent	Jul /Aug '6	1.72 ± 0.09	15.63±0.41	70.70 ± 2.95	1016.0±79.0	301.3 ±11.9	12.59 ± 0.36
Raily (R) Recipient parent	Jul /Aug 06	2.11 ± 0.09	15.30 ± 0.08	39.33 ± 3.16	1157.0 ± 83.17	218.3± 25.0	13.65 ± 0.39
Jata × Daba (F1)	Sep / Nov '06	2.09 ± 0.14 (+34.0) (+21.5)	18.61 ± 0.20 (+32.2) (+19.1)	152.3 ± 9.90 (+58.3) (+115.4)	1744.0 ± 48.8 (+118.4) (+71.7)	294.0 ± 8.3 (+34.7) (- 2.4)	12.32 ± 0.17 (+16.1) (- 2.1)
Raily × Daba (F1) Nov '06	Sep / Nov 05	2.47 ± 0.12 (+58.3) (+17.1)	20.74 ± 0.76 (+47.3) (+35.6)	35.01 ± 3.02 (- 63.6) (- 11.0)	1546.0 ± 39.7 (+93.6) (+33.6)	207.0 ± 14.0 (- 5.18) (- 5.2)	10.86 ± 0.40 (+2.4) (- 20.4)
Jata × Daba (BC1)	Jul / Aug '07	1.93 ± 0.06 (+23.7) (+12.2)	17.50 ± 0.47 (+24.3) (+12.0)	130.1 ± 5.27 (+35.2) (+84.0)	1234.7± 39.0 (+54.6) (+21.5)	294.0 ± 4.4 (+34.7) (- 2.4)	11.55 ± 0.27 (+8.9) (- 8.3)
Raily × Daba (BC1) Aug '07	Jul / Aug 07	1.95± 0.04 (+25.0) (- 7.6)	16.41± 0.37 (+16.5) (+7.3)	34.35 ± 4.93 (-64.3) (- 12.7)	1177.7 ± 46.8 (+47.5) (+1.8)	260.3± 9.9 (+19.2) (+19.2)	11.73 ± 0.18 (+10.6) (- 14.1)
Jata × Daba (BC2)	Sep / Nov '07	2.16± 0.07 (+38.5) (+25.6)	18.62± 0.12 (+32.2) (+19.1)	166.3 ± 12.8 (+72.8) (+135.2)	1554.0 ± 51.4 (+94.6) (+53.0)	189.7± 8.8 (-13.1) (-37.0)	11.76± .31 (+10.8) (-6.6)
Raily × Daba (BC2)	Sep / Nov '07	2.36± 0.15 (+51.3) (+11.8)	18.96 ±1.05 (+34.7) (+23.9)	35.87 ±3.28 (-62.7) (-8.8)	1394.3±98.1 (+ 74.6) (+ 20.5)	128.7 ± 12.4 (- 41.0) (- 41.0)	13.65 ± 0.12 (+ 28.7) (=0.00)

Donor parent / Parent donneur. Recipient parent / Parent récepteur. NBFL: Non breakable filament length / Longueur du filament sans rupture.

To introgress the silk associated commercial character of absolute silk yield and finer filament denier into Jata and Raily races, the backcrossing has been repeated with males of Daba race. The *ex-situ* evaluation of Jata race at Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi, India over two crop seasons revealed that the adaptability, susceptibility and low yields could be surpassed considerably, while the Raily race could retain only shell weight and silk ratio percentage traits. Unlike in mulberry silkworm *Bombyx mori*, the tropical tasar silkworm *Antheraea mylitta* undergoes pupal diapause in alternate generation in case of bivoltines and in every third generation in case of trivoltines, which needs comparison between the parents of both seasons as this breeding experiments involved divergent uni/bivoltine ecoraces. The role of the environment is to be considered for better interpretation of the results, as the genotype and environment ($G \times E$) interaction plays a key role on exhibition of silk associated phenotypic traits (Falconer, 1985; Kumar *et al.*, 2003; Srivastava *et al.*, 2004). Also, the existing tasar silkworm races are heterozygous as they undergo hybridization in the nature and live as ecoraces by acclimatizing to a particular ecozone or niche. Hence, the approach with repeated backcrossing was found meaningful as the ecoraces are selected based on their economic traits as recipients or donors. Further, for any ecorace while domesticated and acclimatized to *ex situ* condition, its performance levels will come down and the so called superior traits found in natural habitat will recede and may not be effective for their application as donor in introgressing the desired economic trait. In view of this, selection of any natural ecorace as recipient parent based on its superior characters to infuse additional compatible traits from semi domesticated race like Daba and induction of strict selection pressure for desired traits in the following generations was found logical in infusing the desired trait. Further, in the very first cross of F1 generation itself 50% of economic traits of natural grown ecoraces can be retained and the further stock maintenance and multiplication of F1, BC1 and so on generations will be easy as those progenies have 50%, 75% and so on of domesticated blood.

The significant variance in silk associated traits among parents (donor/ recipient), hybrids (F1, BC1 & BC2) and between parents and backcross hybrids indicates the genetic divergence among the chosen wild and semi domesticated parents from different ecozones like Jata from Orissa, Raily from Chhattisgarh and Daba from Jharkhand of India. Further, the other reasons might be the impact of repeated backcrossing and continuation of generations through seed and commercial crop rearing seasons. The induction of selection pressure on parents at every stage of breeding for desired traits and the repeated backcrossing resulted in the introgression of viability in terms of better absolute silk yield along with quality as finer filament denier into Jata race at BC2 level and the results are corroborating the observations made by Raju and Krishnamurthy, 1993; Das *et al.*, 1998; Das, 2005; Moghaddam *et al.*, 2005; Tuteja *et al.*, 2006. The improvement of the cocoon/silk yield with finer silk denier in Jata $\times$ Daba hybrid at BC2 level, indicates the introgression progress of the desired trait of economic importance in the desired direction. However, the decrease in NBFL over both recipient and donor parents might be due to improvement in silk filament denier as it is negatively correlated with filament length (Shekarappa *et al.*, 1999) and also due to change in the rearing climatic conditions and seasons (Kumar *et al.*, 1999, 2003; Rao *et al.*, 2003). The inversely proportional and opposite trends in respect of absolute silk yield, filament length and denier by the same hybrid at F1 and BC2 levels indicates the correlation between silk quantity and quality (Siddiqui *et al.*, 1989; Singhvi and Bose, 1991; Sekharappa *et al.*, 1999; Verma *et al.*, 2003). But in case of Raily race, the non improvement of silk yield and filament denier coincides with its performances under *ex situ* rearings indicating its non amenability and acclimatization to the changed environment and food plant, as it mainly survives under natural habitat and feeds on *Shorea robusta*. The major share of country's tasar raw silk production from the natural grown Raily cocoons indicate its production potential in the natural habitat. However, the improvement in shell weight, silk ratio percentage and filament length significantly at F1 and BC2 levels more than at BC1 of the Jata and Raily races, was found economically advantageous. The said improvement might be due to the heterotic effect, interaction

of high heterogeneity and introgressive hybridization (Verma *et al.*, 2003). The said improvement also might be due to better silk associated trait expressiveness of phenotype during commercial crop season with optimal genotype environment relations along with longer larval feeding period on better quality leaf (Falconer, 1985; Kumar *et al.*, 2003; Srivastava *et al.*, 2004).

CONCLUSION

The introgression of viability and denier in terms of absolute silk yield and filament fineness at BC2 level in Jata × Daba hybrid indicates the prospects of Jata and Daba ecoraces as material source for backcross breeding works in the direction of improving silk productivity and quality. The study suggests that the higher silk yield and finer silk filament traits can be attained in Jata by adopting backcross breeding with Daba ecorace.

REFERENCES

- ARUGA, H. (1994), Principles of Sericulture, Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd. New Delhi, Bombay, Calcutta, pp 99-111.
- BABU, R., NAIR, S.K., KUMAR, A., VENKATESH, S., SEKHAR, J.C., SINGH, N.N., SRINIVASAN, G., GUPTA, H.S. (2005), Two generations marker aided back crossing for rapid conversion of normal maize lines to quality protein maize (QPM), Theor. Appl. Genet., 111: 888-897.
- CHATTOPADHYAY, G.K., SENGUPTA, A.K., VERMA, A.K., SEN, S.K., SARATCHANDRA, B. (2001), Transgression of shell weight - a multigenic trait, through development of congenic breed in tropical silkworm, *Bombyx mori* L., *Sericologia*, 41: 33-42.
- DAS, S.K., CHATTOPADHYAY, G.K., VERMA, A.K., SENGUPTA, A.K., SARKAR, A. (2005), Development of high yielding silkworm breeds of *Bombyx mori* L. for Eastern India through congenic line breeding approach; in 20th Congress of the International Sericulture Commission, Bangalore Vol. I, 268-272.
- FALCONER, D.S., (1985), Introduction to quantitative Genetics, English language book society, Longman, London.
- FAROOQ, M., PUTTARAJU, H.P., DAR, H.U., SOFI, A.M. (2002), Heterosis in relation to genetic divergence in bivoltine silkworm, *Bombyx mori* L., Ind. J. Seric., 41(1): 10-18.
- KOVALOV, P.A., (1970), Silkworm breeding technique. Translated and published by Central Silk Board, Bombay, India.
- KUMAR, N.S., BASAVARAJA, H.K., NANJEGOWDA, B., JOGE, P.G., KALPANA, G.V., MALREDDY, N., KARIYAPPA, B.K. (2003), Effect of high temperature and high humidity on the post cocoon parameters of parents, foundation crosses, single and double hybrids of bivoltine silkworm, *Bombyx mori* L., Ind. J. Seric., 42(2): 162-168.
- KUMAR, N.S., KISHORE KUMAR, C.M., BASAVARAJA, H.K., MALREDDY, N., RAMESHBABU, M., DATTA, R.K. (1999), Comparative performance of robust and productive bivoltine hybrids of silkworm (*Bombyx mori* L.) under high temperature conditions, *Sericologia*, 39(4): 567-571.
- MACIEJOWSKI, J., ZIEBA, J. (1982), Genetics and Animal breeding, part-B, Stock improvement Methods, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Oxford, New York and PWN, Polish Scientific Publishers, Warszawa.
- MOGHADDAM, S.H.H., EMAM JOMEH, N., MIRHOSSEINI, S.Z., GHOLAMY, M.R. (2005), Genetic improvement of some traits in four strains of silkworm, *Bombyx mori* L., Int. J. Indust. Entomol., 10(2): 95-99.
- MOORTHY, S.M., DAS, S.K., KAR, N.B., RAJE, URS, S. (2007), Breeding of Bivoltine breeds of *Bombyx mori* L suitable for variable climatic conditions of the tropics, Int. J. Indust. Entomol., 14(2): 99-105.

- NAKADA, T. (1992), Sequence of some cocoon traits in the progeny tests after crossing between wild and domesticated silkworms. Wild silkmths '91, 1992, International Society for Wild Silkmths, Akai, H.; Kato, Y.; Kiuchi, M.; and Kobayashi, J. eds., pp 98-104.
- RAO, P.S., DATTA.R.K. BASAVARAJA.H.K., REKHA.M., VIJAYAKUMARI.K.M. (2003), Analysis of heterosis and combining ability of certain quantitative traits in silkworm, *Bombyx mori* L. under different temperature and humidity conditions, Ind. J. Seric., 42(2): 152-157.
- RAJU, P.J., KRISHNAMURTHY.N.B. (1993), Breeding of two Bivoltines, MG511 and MG512 of silkworm, *Bombyx mori* L. for higher viability and productivity, Sericologia, 33: 577-587.
- SEKHARAPPA, B.M., RADHAKRISHNA.P.G., KESHAVAREDDY.K.S., DANDIN.S.B. (1999), Breeding of bivoltine silkworm races with better survival and high shell content for tropics - Karnataka, Sericologia, 39(2): 205-210.
- SEMAGA, K., BJORNSTAD.A., NDJIONDJOP.M.N. (2006), Progress and prospects of marker assisted backcrossing as a tool in crop breeding programme, Afr. J. Biotec., 5(25): 2588-2603.
- SIDDQUI, A.A., SENGUPTA.A.K., DASMAHAPATRA.D.P., SENGUPTA.K. (1989), Co-heritability and correlation of different quantitative characters of *Antheraea mylitta* D., Sericologia, 29(2): 211-214.
- SINGHVI, N.R., BOSE.P.C. (1991), Sericin - A deciding factor for the quality of cocoons and raw silk, Indian Silk, 29(9): 26-28.
- SRIVASTAVA, A.K., NAQVI.A. H., SINHA.A.K., VISHWAKARMA.S. R., ROY.G.C. (2004), Genotype and environment interaction in *Antheraea mylitta* Drury and its implications, Persp. Cytol. Genet., 11: 219-224.
- TAKABAYASHI, C., HARIRAJ.G., TSUBOI.H., TSUGHE.M. (1994), Comparative studies between exploitation reeling tension and reeling performance of Indian pure and hybrid races, Sericologia, 34(2): 287-295.
- TAZIMA, Y., (1964), The genetics of the silkworm. Logos press, London, pp 253 & 421.
- TAZIMA, Y., (1984), Silkworm moths, In evolution of domesticated animals. I.L. Mason (ed.), Longman, London and New York, pp 416-424.
- TUTEJA, O.P., MAHENDAR SINGH., VERMA.S.K., KHADI.B.M. (2006), Introgressed lines as sources for improvement of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) genotypes for yield and fiber quality traits, Ind. J. Genet., 66(3): 251-252.
- TZENOV, P.I., GUZMAN.Z.I.D. (2004), Breeding the new Bulgarian sex-limited for larval markings silkworm *Bombyx mori* L. commercial hybrid ZE/4 and study on its performance in the Philippines and Bulgaria, Sericologia, 44(3): 297-312.
- VERMA, A.K., CHATTOPADHYAY.G.K., SENGUPTA.A.K., DAS.S.K., RAJE URS.S. (2003), Expression of heterotic genetic interaction among multivoltine recurrent backcross/congenic lines for higher shell weight of silkworm *Bombyx mori* L., Int. J. Indust. Entomol., 7: 21-27.
- ZAMIR, D. (2001), Improving plant breeding with exotic genetic libraries, Nature Reviews (Genetics), 2: 983-989.

TEST DE DIFFERENTES GENERATIONS DE RETROCROISEMENT POUR LE BREEDING DU VER A SOIE TASAR TROPICAL, *ANTHERAEA MYLITTA* DRURY

R.MANO HAR REDDY*, G. HANSDA, N. G. OJHA, N. SURYANARAYANA,
SURESH RAI & N. B. VIJAYAPRAKASH

P4 Division, Central Tasar Research and Training Institute, Central Silk Board, Ranchi
[Jharkhand] – 835 303, Inde.

*L'analyse des générations de rétrocroisement de breeding sur les parents récepteurs Jata, Raily avec le parent du ver à soie tasar tropical, *Antheraea mylitta* Drury donneur, Daba, révèle l'introgression du rendement absolu en soie (166,3g) et du titre du filament (11,76) chez l'hybride Jata × Daba au niveau BC2. Le poids de la coque (2,16 g), la richesse soyeuse (18,62 %), la longueur du filament (1554 m) sont également améliorés, tandis que le NBFL (la longueur du filament sans rupture) baisse (189,7 m) à la fois par rapport aux parents donneur (218,3 m) et récepteur (301,3 m). Le rendement absolu en soie (35,87 g) est négatif chez l'hybride Raily × Daba sans aucun changement du titre au niveau BC2. Mais, le poids de la coque (2,36g), la richesse soyeuse (18,96 %) et la longueur du filament (1394,3 m) progressent. La performance supérieure des deux hybrides au niveau F1, avec un rendement absolu en soie supérieur chez l'hybride Jata × Daba (152,3g) et un titre de filament plus fin chez l'hybride Raily × Daba indique l'expression de l'hétérosis spécifique aux caractères. L'introgression de la viabilité et de la supériorité en termes de rendement absolu en soie et de titre de filament plus fin au niveau BC2 chez l'hybride Jata × Daba montre les perspectives des écoraces Jata et Daba comme source pour des travaux de breeding par rétrocroisement en vue d'améliorer la productivité et la qualité. L'étude suggère qu'on peut obtenir les caractères de rendement en soie supérieur et de filament de soie plus fin chez Jata en adoptant un breeding par rétrocroisement avec l'écorace Daba.*

INTRODUCTION

La variabilité qui existe dans la nature parmi les parents sauvages des insectes domestiqués n'a pas été complètement exploitée dans le lignage, en particulier, pour les caractères importants sur le plan économique. Le rétrocroisement est l'une des méthodes efficaces pour transmettre les caractères désirés du parent domestiqué ou sauvage chez le parent récepteur et le succès dépend de la sélection de lignées avec une variabilité génétique considérable (Tazima, 1964, 1984 ; Kovalov, 1970 ; Maciejowski et Zieba, 1982 ; Falconer, 1985 ; Aruga, 1994 ; Zamir, 2001 ; Farooq et coll., 2002 ; Tzenov et Guzman, 2004 ; Moorthy et coll., 2007). Avec la méthode de rétrocroisement traditionnelle, le récepteur sera presque isogénique à la fin de la 6ème génération de rétrocroisement (Babu et coll., 2005 ; Semagn et coll., 2006). La fécondité, le poids du cocon et le poids de la coque présentent une co-hérabilité, des corrélations positives et significatives plus élevées avec le rendement en soie (Siddiqui et coll., 1989). La dévidabilité du cocon est mauvaise quand les vers filent dans un environnement de température et d'humidité élevées (Singhvi et Bose, 1991). Le breeding des vers à soie parents avec les caractères préférés en utilisant le rétrocroisement, suivi par la sélection des générations successives peut permettre de mettre au point des variétés supérieures (Raju et

* E-mail : dr.manohar1959@rediffmail.com

Krishnamurthy, 1993). L'allofécondation avec des races exotiques ou les rétrocroisements répétés ont pu améliorer les caractères commerciaux (Moghadam et coll., 2005 ; Tuteja et coll., 2006) et l'introduction de caractères polyvoltins chez les bi / monovoltins est utile pour mettre au point des lignées résistantes (Das et coll., 2005). L'hybridation introgressive a un impact hétérotique sur la qualité de la soie avec un effet cumulatif des gènes et de la diversité génétique parentale (Verma et coll., 2003). Les caractères désirés chez les hybrides atteindront le niveau de la souche du donneur à la génération BC4 (Nakada, 1992 ; Chattopadhyay et coll., 2001). On a enregistré de meilleures performances de dévidage chez les hybrides par rapport aux races pures (Takabayashi et coll., 1994) et le poids du cocon est positivement corrélé avec la longueur du filament et le titre du filament est négativement corrélé avec la longueur du filament (Sekharappa et coll., 1999). La régularité du titre du filament et l'expression de la vigueur hybride par rapport aux paramètres post-cocon varient avec les différents traitements de température (Kumar et coll., 1999, 2003 ; Rao et coll., 2003). Comme la richesse génétique du ver à soie tassar n'est pas maniable, cela oblige à utiliser des lignées et des méthodes de sélection applicables pour améliorer les caractères associés à la soie. Le but de cette étude est de choisir le poids de coque et la richesse soyeuse de mono / bivoltins sauvages élevés ainsi que le rendement en soie élevé et le titre faible des races semi-domestiquées bivoltines et de les permuter par des rétrocroisements répétés, afin d'augmenter le rendement en cocons / en soie et la finesse du filament de soie.

MATERIELS ET METHODES

On élève simultanément les trois écoraces parentales Daba, Jata et Raily avec deux de chacun des hybrides F1, BC1 et BC2 obtenus en utilisant les écoraces semidomestiquée Daba et sauvages Jata et Raily d'*Antheraea mylitta* D., selon une conception aléatoire en blocs, avec trois répétitions pendant les récoltes de grainage et commerciales de 2006 et 2007 sur la plantation économique de *Terminalia tomentosa* dans le laboratoire de terrain du *Central Tassar Research and Training Institute*, de Ranchi, Inde. On croise les femelles des écoraces Jata et Raily avec les mâles de la race Daba pour obtenir F1 [Jata × Daba & Raily × Daba] et on rétrocroise les femelles des descendance F1 avec les mâles Daba pour obtenir les hybrides BC1 ; les femelles des descendance BC1 sont rétrocroisées avec les mâles Daba pour obtenir les hybrides BC2. Au cours du breeding, on considère les cocons parentaux sur la base de la période de filage, de l'uniformité de la forme et de la couleur, des poids de coque et de richesse soyeuse les plus élevés, du rendement absolu en soie plus élevé ainsi que de meilleures fécondité et éclosion. On considère les larves d'une ponte saine chez chaque parent ainsi que chez l'hybride comme une répétition et on enregistre les observations. On calcule le poids d'une coque, la richesse soyeuse avec un nombre égal d'échantillons aléatoires et on calcule le rendement absolu en soie d'après le poids moyen de la coque et le rendement moyen en cocons par ponte saine. On étudie les caractères technologiques liés à la soie comme la longueur du filament, la longueur du filament sans rupture (NBFL) et le titre sur la base d'un cocon chez les parents et chez les hybrides F1, BC1 et BC2 au Département de Technologie Post-cocon de l'Institut. On soumet les données enregistrées pour les différents paramètres à l'analyse statistique.

RESULTATS ET DISCUSSION

La variabilité des caractères associés à la soie dans des conditions *in situ* chez les écoraces parentales (Tableau I), Daba, Jata et Raily indique la supériorité des races sauvages, Jata et Raily pour tous les caractères sauf pour le rendement absolu en soie et pour le titre du filament, pour lesquels la race semi-domestiquée Daba est supérieure. Les niveaux de performances des parents donneur (Daba) et récepteur (Jata et Raily) au laboratoire de terrain, de l'Institut à Ranchi, en Inde (Tableau II) indiquent les meilleures performances pour la saison de récolte commerciale (Sep-Nov) par rapport

à la saison de récolte de grainage (Juil-Août). La variation est visible avec un meilleur rendement absolu en soie et un titre plus élevé de la récolte commerciale et avec un faible rendement en soie et un titre plus fin de la récolte de grainage pour Daba et Jata, tandis que c'est le contraire chez la race Raily, mais cela est négligeable. L'ANOVA (Tableau III) parmi les trois parents (un donneur et deux récepteurs) pendant deux saisons et six hybrides de rétrocroisements (deux en F1, deux en BC1 et deux en BC2) indique une variance significative (au seuil de 0,1 %) pour les caractères étudiés chez les parents, les hybrides et entre les parents et les hybrides, sauf pour la richesse soyeuse entre les parents (au seuil de 5 %), pour le titre entre les parents par opposition aux hybrides (au seuil de 5 %) et pour le poids de la coque parmi les hybrides (au seuil de 1 %). Les résultats des hybrides de rétrocroisement par rapport au parent donneur, c'est-à-dire Daba (Tableau IV) montrent que Jata × Daba au niveau BC2 enregistre une meilleure performance pour le rendement absolu en soie, suivi par le même hybride au niveau F1. Cependant, aucun hybride ne peut surpasser le parent donneur pour le titre et seul l'hybride F1 Raily × Daba atteint des niveaux proches, suivi par Jata × Daba en BC1. Les résultats des hybrides de rétrocroisement Jata × Daba par rapport au parent récepteur, c'est-à-dire Jata (Tableau IV) montrent que le rendement absolu en soie le plus élevé est enregistré au niveau BC2, suivi par le même hybride au niveau F1. On enregistre le titre le plus faible pour l'hybride Jata × Daba au niveau BC1, suivi par BC2 par rapport au parent récepteur Jata. Parmi les hybrides Raily × Daba, le titre est le plus faible au niveau F1 suivi par BC1 et le rendement absolu en soie est non significatif et négatif à tous les niveaux par rapport au parent récepteur, Raily. Cependant, les hybrides Jata × Daba et Raily × Daba enregistrent de meilleures performances aux niveaux F1 et BC2 par rapport au poids de la coque, à la richesse soyeuse et aux longueurs de filament par comparaison aux parents et aussi aux hybrides au niveau BC1.

Le but des méthodes de breeding est de mettre au point une lignée stable et productive en matière de quantité et de qualité de la soie (Tazima, 1984) et, à cette fin, la méthode appropriée consiste en des rétrocroisements répétés (Tazima, 1964). La sélection parentale est toujours cruciale et les principales raisons de la sélection de races sauvages et semi-domestiquées divergentes dans cette étude sont la variation du rendement absolu en soie et du titre du filament, en plus de la variation du poids de leur coque, de la richesse soyeuse, de la longueur du filament et de la longueur du filament sans rupture (NBFL).

Pour introgresser les caractères commerciaux du rendement absolu en soie et du titre de filament plus fin chez les races Jata et Raily, on fait des rétrocroisements répétés avec les mâles de la race Daba. L'évaluation *ex-situ* de la race Jata au *Central Tasar Research and Training Institute*, de Ranchi en Inde pendant deux saisons de récolte montre qu'on peut considérablement dépasser l'adaptabilité, la sensibilité et le rendement faible, tandis que la race Raily ne peut retenir que les caractères du poids de la coque et de la richesse soyeuse. A la différence du ver à soie mûrier, *Bombyx mori*, le ver à soie tasar tropical *Antheraea mylitta* subit la diapause nymphale une génération sur deux chez les bivoltins et toutes les trois générations chez les trivoltins, qu'il faut comparer entre les parents des deux saisons puisque ces expériences de breeding impliquent des écoraces mono / bivoltines divergentes. Il faut prendre en compte le rôle de l'environnement pour une meilleure interprétation des résultats, puisque l'interaction génotype et environnement (G × E) joue un rôle clé dans la manifestation des caractères phénotypiques associés à la soie (Falconer, 1985 ; Kumar et coll., 2003 ; Srivastava et coll., 2004). Par ailleurs, les races de ver à soie tasar existantes sont hétérozygotes, puisqu'elles subissent l'hybridation dans la nature et vivent comme écoraces en s'acclimant à une écozone ou une niche particulière. L'approche avec des rétrocroisements répétés s'avère donc utile, puisque les écoraces sont sélectionnées d'après leurs caractères économiques comme récepteurs ou donneurs. Par ailleurs, pour n'importe quelle écorace qu'on domestique et qu'on acclimate à une condition *ex situ*, ses niveaux de performance diminueront et les caractères supérieurs que l'on trouve dans l'habitat naturel diminueront et pourraient ne pas être efficaces pour être appliqués en tant que donneur, pour introgresser le caractère économique désiré. Compte tenu de cela, la sélection de n'importe quelle

écorace naturelle comme parent récepteur d'après ses caractères supérieurs pour transmettre les caractères compatibles supplémentaires d'une race semi-domestiquée comme Daba et l'induction d'une pression de sélection stricte pour les caractères désirés dans les générations suivantes s'avère logique pour transmettre le caractère désiré. Par ailleurs, dans le tout premier croisement de la génération F1 elle-même, on peut retenir 50 % des caractères économiques des écoraces sauvages et le maintien ultérieur du stock et la multiplication des générations F1, BC1 et ainsi de suite seront faciles, puisque ces descendance ont 50 %, 75 % et ainsi de suite de sang domestiqué.

La variance significative des caractères associés à la soie parmi les parents (donneur / récepteur), les hybrides (F1, BC1 et BC2) et entre les parents et les hybrides de rétrocroisement indique la divergence génétique entre les parents sauvages et semi-domestiqués choisis dans différentes écozones comme Jata dans l'Orissa, Raily dans le Chhattisgarh et Daba dans le Jharkhand en Inde. Par ailleurs, les autres raisons pourraient être l'impact d'un rétrocroisement répété et la continuation des générations par l'élevage des récoltes de grainage et commerciale. L'induction de la pression de sélection sur les parents à chaque stade de breeding pour les caractères désirés et les rétrocroisements répétés entraînent l'introggression de la viabilité en termes de meilleur rendement absolu en soie et de qualité, puisqu'on obtient le titre plus fin de la race Jata au niveau BC2 et ces résultats confirment les observations faites par Raju et Krishnamurthy, 1993 ; Das et coll. ; 1998 ; Das, 2005 ; Moghaddam et coll., 2005 ; Tuteja et coll., 2006. L'amélioration du rendement en cocons / en soie, avec un titre de soie plus fin chez l'hybride Jata × Daba au niveau BC2, indique le progrès de l'introggression du caractère d'importance économique désiré dans la direction souhaitée. Cependant, la baisse du NBFL par rapport à la fois aux parents récepteur et donneur pourrait être due à l'amélioration du titre du filament de soie, puisqu'il est négativement corrélé avec la longueur du filament (Shekarappa et coll., 1999) et aussi au changement des conditions climatiques et des saisons d'élevage (Kumar et coll., 1999, 2003 ; Rao et coll., 2003). Les tendances inversement proportionnelles et opposées pour le rendement absolu en soie, la longueur du filament et le titre pour le même hybride aux niveaux F1 et BC2 indiquent la corrélation entre la quantité et la qualité de la soie (Siddiqui et coll., 1989 ; Singhvi et Bose, 1991 ; Sekharappa et coll., 1999 ; Verma et coll., 2003). Mais dans le cas de la race Raily, l'absence d'amélioration du rendement en soie et du titre du filament coïncide avec ses performances dans des élevages *ex situ*, ce qui indique son absence de maniabilité et d'acclimatation au changement d'environnement et de plante hôte, puisqu'elle survit principalement sous un habitat naturel et se nourrit sur *Shorea robusta*. La part principale de la production de soie grège tassar du pays à partir des cocons sauvages Raily indique son potentiel de production dans l'habitat naturel. Cependant, l'amélioration significative du poids de la coque, de la richesse soyeuse et de la longueur du filament aux niveaux F1 et BC2, plus qu'en BC1, chez les races Jata et Raily s'avère avantageux sur le plan économique. L'amélioration en question pourrait être due à l'effet hétérotique et à l'interaction d'une hétérogénéité et d'une hybridation introgressive élevées (Verma et coll., 2003). Cette amélioration pourrait aussi être due à la meilleure expression des caractères associés à la soie pendant la saison de la récolte commerciale, aux relations optimales du génotype avec l'environnement et à une durée de nourrissage larvaire plus longue sur de la feuille de meilleure qualité (Falconer, 1985 ; Kumar et coll., 2003 ; Srivastava et coll., 2004).

CONCLUSION

L'introggression de la viabilité et du titre en termes de rendement absolu en soie et de finesse du filament au niveau BC2 chez l'hybride Jata × Daba indique les perspectives des écoraces Jata et Daba comme source pour les travaux de breeding de rétrocroisement dans le but d'améliorer la productivité et la qualité de la soie. L'étude suggère que l'on peut obtenir des caractères de rendement supérieur en soie et de filament de soie plus fin chez Jata en adoptant le breeding de rétrocroisement avec l'écorace Daba.

SOCIO-ECONOMIC AND PERSONAL CORRELATES OF ADOPTION OF IMPROVED SERICULTURE PRACTICES

MOHAMMAD KARIM MOTAMED

Assistant professor, Department of Rural Development, Faculty of Agricultural sciences,
University of Guilan, Rasht - Iran

A study was conducted in twelve randomly selected villages of districts of Guilan state of Iran. The objective of the study was to identify the Socio-economic and personal factors affecting the adoption of improved sericulture practices. The data were collected from 360 randomly selected respondents. The study revealed that the correlation coefficient of 12 out of the 16 socio-economic and personal variables namely age, education, social participation, utilization of information source, mass media exposure, annual income, extension contact, economic motivation, marketing support, subsidy (Loan), technical support and socio-economic status were significant at 0.01 level of probability. Among them, the correlation of age with knowledge was negative, while all other correlations were positive. However, the correlations between family size, family type, land holding and occupation were found to be negative and non-significant. Further, the statistical tests using multiple regression analysis revealed that among the sixteen variables studied, only six variables viz. education, social participation, mass media exposure, extension contact, technical support and economic motivation were found to exhibit a positively significant contribution towards adoption gain of sericulture practices at 1 per cent level of probability.

Keywords: Socio-Economic, Adoption, Sericulture, technology adoption.

INTRODUCTION

Sericulture, a rural cottage industry is highly suitable for Iran considering its vast agricultural base and its role in providing rural employment, particularly to small and poor farmers. Though it is labor intensive, it offers relatively high returns for modest investments and can employ whole family including women. It can arrest migration of rural masses to urban slums and generate income to poor people. A number of cost effective technologies have been developed to increase silk productivity per unit area. It is essential to disseminate these technologies in the new areas. In this direction, joint efforts of the state and central machineries are needed to transfer these technologies to the farmers and train them appropriately. All these activities warrant better extension and technical support to motivate them to increase area of mulberry production and increase silkworm egg production and silk productivity. Socio-economic characteristics of growers directly influence the extent of adoption of new methods for production and productivity in sericulture. Siddaramaiah *et al.* (1995), Sarkar (1997), Singh and Das (1999) in their studies of adoption of improved Sericultural practices, reported that extent of adoption of sericulture practices by farmers was significantly associated with their socio-economic factors. Serna (2000) reported that there was positive association between the socio-economic characteristics of the farmers and extent of adoption of modern sericulture technologies. Srinivasa, *et al.* (2005) in their studies reported that age, education, size of holding, extension participation and economic motivation influenced the farmers to adopt multination silkworm breeds. Tippawan and Sirriporn (2007) revealed that there were highly significant differences in farmer age, land occupation, sericulture experience, number of mulberry plants/rai,

mulberry age, mulberry production, rearing cycle and cocoon production/year. In the present study, it has been attempted to investigate the relationships between socio-economic and personal characteristics of silkworm growers to assess the adoption of improved sericulture practices. The finding of the study will enable to solve some of the problems relating to adoption of improved sericulture practices by the sericulture growers and evaluate the relationship between socio-economic characteristics of growers and their extent of adoption of improved sericulture practices

MATERIAL AND METHODS

More than 65 percent cocoon production in Iran is produced in the Guilan state. The study was carried out in Asatane, Langeroud and Fouman cities of the Guilan state of Iran during April 2007 to September 2008. Each city has 2 districts and 6 blocks. Among blocks, 3 blocks randomly selected. From these selected blocks 12 villages were selected randomly, i.e. 12 villages were selected for the study.

For each selected village, a list of farmers practicing sericulture was obtained from Central Silk Board and 30 farmers from each village were randomly selected. Thus the sample for the study comprised of a total of 360 respondents. The study was carried out with 16 independent characteristics:

- | | |
|--------------------------------------|--|
| x ₁ = Age | x ₂ = Education |
| x ₃ = Family size | x ₄ = Family type |
| x ₅ = Land holding | x ₆ = Social participation |
| x ₇ = Occupation | x ₈ = Utilization of information source |
| x ₉ = Mass media exposure | x ₁₀ = Annual income |
| x ₁₁ = Extension contact | x ₁₂ = Economic motivation |
| x ₁₃ = Marketing support | x ₁₄ = Socio-economic status |
| x ₁₅ = Subsidy | x ₁₆ = Technical support |

And one dependent variable:

Y = Extent of adoption

For the measurement of socio-economic characteristics and other aspects of Sericulturists, a comprehensive schedule was developed and field tested before data collection. Personal interview, direct observation, meeting and discussion were the methods used for data collection. Statistical analysis was done with the help of SPSS 15.0 package. The following statistical analyses were performed in the study:

Pearson Product Moment Correlation Test:

Correlation coefficient was computed to know the relationship between selected Independent variables of farmers with dependent variable i.e. adoption of improved sericulture practices.

Multiple Regression Analysis:

It was employed to find out the effect and extent of influence of each Independent variable contributing significantly towards the dependent variable i.e. adoption of improved sericulture practices. The data collected were tabulated and analyzed. In order to ascertain extent of adoption of recommended sericulture practices, the responses of respondents were collected on 15 selected practices. Practice-wise responses were categorized into 3 levels of adoption

Adoption Pattern	Score
Non-adoption	0
Partial adoption	1
Complete adoption	2

The total score for a respondent is obtained by summing up the score obtained on each practices. The minimum score one could score was 0 and maximum score was 90. The adoption level of the respondents was measured by making use of adoption index developed by Karthikeyan (1994).

RESULTS AND DISCUSSION

1. Socio-economic profile of Seri culturists:

In order to know the background and socio-economic aspects of the respondents, it is important to analyze these characteristics in depth. In all 16 socio-economic variables were studied using appropriate tools. The relevant data, so collected, were analyzed and the results are presented as follows:

Majority (75.00%) of the respondents practicing sericulture were from middle age group (45-55 years). The maximum proportion of the respondents i.e., 39.00 per cent was educated up to middle school, whereas 20.00 per cent of them were illiterate. Majority of the respondents (53.00%) belonged to medium sized family (3-5 members). Average size of family was 4-6 members. Nearly two-third (62.00%) of the respondents had joint families. More than half of respondents (52.00%) were operating in small holdings (1.10-2.00 acres) and 25.00 per cent of them in marginal holdings (0.00-1.00 acres). Hundred per cent of the respondents were having participation in one organization and about 62.00 per cent were members in 3 organizations. Majority (63.00%) of the respondents had farming as their main occupation. Only 31.00 per cent had both farming and labor as their main occupation. As regards utilization of information sources, majority (67.00%) of the respondents had low level and only about 25.00 per cent had medium level. Majority (76.00%) of the respondents had medium exposure of mass-media. Almost one third of the respondents (33.00%) were having middle level of income (Rs. 4000-50000), followed by lower middle (Rs. 2000-40000) (25.00%). Majority (75.00%) of the respondents were having medium level of extension contact. About two-third (70.00%) of the respondents had medium level of economic motivation. Nearly half of the respondents (55.00%) were having medium socio-economic status, followed by low (40.00%). Majority (48.00%) of the respondents had medium level of marketing support, followed by low level (41.00%).

2. Extent of adoption of improved sericulture practices:

The responses were analyzed and the results are presented in Table I.

It is revealed from the data in Table I that large majority of the respondents (78.00%) had fully adopted the recommended high yielding seeds of silk worm, followed by timing of harvest of cocoon (75.00%), time of rearing of worm (68.00%), appropriate time of cutting mulberry tree and time of feeding silkworm (62.00%)

On the other hand, more than 50 per cent of respondents had partially adopted the recommendation, i.e., about method of feeding silk worm (52.00%), method of cleaning (51.00%), use of separate rearing house (49.00%) and time of transfer of eggs/insect (50.00%). Despite high level of adoption in case of several of the recommended practices in sericulture, there were some practices which were observed to be left out completely by the sericulturists. The most prominent being use of fertilizers in mulberry tree. This practice was not adopted by a large majority comprising 67.00 per cent of the respondents, followed by time of control of fungi, pests and diseases (60.00%), maintenance of temperature and relative humidity of rearing room (57.00%). The extent of adoption behavior of respondents in respect of improved sericulture practices was studied by adding individual scores received on different practices. According to the total score, they were categorized into three categories and the results are presented in Table II.

Table I. Practice- wise distribution of respondents according to extent of adoption.

Tableau I. Distribution des personnes interrogées en fonction des pratiques selon le degré d'adoption.

S.No.	Recommended improved sericulture practice	Percentage of respondents (N=360)	Full	Partial	Nil
No. de Série	Pratique séricicole améliorée recommandée	Pourcentage de personnes interrogées (N = 360)	Complète	Partielle	Nulle
1.	Time of cutting & pruning of mulberry tree <i>Période de bouturage & de taille des mûriers</i>		62.00	27.00	11.00
2.	Use of high yielding varieties <i>Utilisation de variétés à rendement élevé</i>		45.00	32.00	23.00
3.	Use of high yielding seeds of silkworm <i>Utilisation de graines de ver à soie à rendement élevé</i>		78.00	17.00	15.00
4.	Time of rearing silkworm <i>Période d'élevage des vers à soie</i>		68.00	20.00	12.00
5.	Time of feeding silkworm <i>Période d'alimentation des vers à soie</i>		62.00	25.00	13.00
6.	Time of harvesting cocoon / <i>Période de récolte des cocons</i>		75.00	15.00	10.00
7.	Time of transferring insects in tray <i>Période de transfert des insectes dans les claies</i>		30.00	50.00	20.00
8.	Chemicals used for disinfection <i>Produits chimiques utilisés pour la désinfection</i>		30.00	25.00	45.00
9.	Time of disinfecting equipments and rearing room <i>Période de désinfection des équipements et de la pièce d'élevage</i>		55.00	27.00	18.00
10.	Method of feeding silkworm <i>Méthode d'alimentation des vers à soie</i>		35.00	52.00	13.00
11.	Methods of bed cleaning <i>Méthodes de nettoyage des litières</i>		39.00	51.00	10.00
12.	Maintenance of temperatures and relative humidity of rearing room <i>Maintien de la température et de l'humidité relative de la pièce d'élevage</i>		29.00	19.00	57.00
13.	Use of fertilizers / <i>Utilisation d'engrais</i>		15.00	28.00	67.00
14.	Use of separate rearing house <i>Utilisation d'une magnanerie séparée</i>		22.00	49.00	29.00
15.	Time of control of fungi, pest and diseases of mulberry tree and silk worm <i>Période de lutte contre les champignons, les parasites et les maladies des mûriers et du ver à soie</i>		23.00	27.00	60.00

The data in Table II show that majority of the respondents (47.00 per cent) had medium level of adoption of improved sericulture practices. A negligible percentage of the respondents, i.e., 23.00 per cent and 30.00 per cent had high and low adoption level of improved sericulture practices respectively. The results suggest a need for greater extension effort to provide know how of the improved sericulture to the respondents so that their adoption level is enhanced.

Table II. Distribution of the respondents according to their adoption behaviour.**Tableau II. Distribution des personnes interrogées selon leur comportement d'adoption.**

S. No.	Adoption levels	Respondents and Percentage N = 360
No. de	Niveaux d'adoption	Personnes interrogées et pourcentage N = 360
1.	Low / Faible	30.00
2.	Medium / Moyen	47.00
3.	High / Elevé	23.00
	Total	360.00

Table III. Correlates of adoption of improved sericulture practices.**Tableau III. Corrélatés d'adoption des pratiques séricicoles améliorées.**

S. No.	Correlates	Coefficient of correlation (r)
No. de série	Corrélatés	Coefficient de corrélation (r)
1.	Age	-0.335**
2.	Education	0.704**
3.	Family size / Taille de la famille	-0.119
4.	Family type / Type de la famille	-0.072
5.	Land holding / Possession de terrains	-0.109
6.	Social participation / Participation sociale	0.921**
7.	Occupation / Emploi	0.049
8.	Utilization of information source Utilisation des sources d'information	0.699**
9.	Mass media exposure / Exposition aux media de masse	0.999**
10.	Annual income / Revenu annuel	0.424**
11.	Extension contact / Contacts de vulgarisation	0.899**
12.	Economic motivation / Motivation économique	0.911**
13.	Marketing support / Soutien économique	0.799**
14.	Socio-economic status / Situation socio-économique	0.015**
15.	Subsidy or loan / Subvention ou prêt	0.049
16.	Technical support / Soutien technique	0.900**

** Significant at 0.01 level of probability / Significatif à un seuil de probabilité de 0,01.

3. Correlates of adoption:

With the assumption that adoption is influenced by various socio-economic characteristics of the respondents, the relationship of various socio-economic variables with adoption of sericulture practices among respondents, coefficient of correlation between adoption and all 16 selected independent variables was computed and compared. The results are presented in Table III.

Table IV. Correlation coefficient and multiple regressions of independent variables with extent of adoption of sericulture practices.

Tableau IV. Coefficient de corrélation et régressions multiples des variables indépendantes avec le degré d'adoption des pratiques séricoles.

Variable Code	Independent Variable	t value	Non-standardized coefficient B	Standardized Coefficients Beta	t value
Code de la variable	Variable indépendante	Valeur t	Coefficient non standardisé B	Coefficients standardisés Beta	Valeur t
x1	Age	-0.335**	-0.002	-0.001	-0.071
x2	Education	0.704**	0.149**	0.156	1.939
x3	Family size / Taille de la famille	-0.119	-0.004	0.003	-0.069
x4	Family type / Type de famille	-0.072	-0.002	0.005	0.180
x5	Land holding / Possession de terrain	-0.109	0.029	0.028	0.861
x6	Social participation / Participation sociale	0.921**	0.105**	0.069	1.069
x7	Occupation / Emploi	0.005	-0.012	0.005	0.201
x8	Utilization of information source Utilisation des sources d'information	0.699**	-0.008	0.089	-0.043
x9	Mass media exposure / Exposition aux media de masse	0.999**	0.151	-0.019	3.881
x10	Annual income / Revenu annuel	0.424**	-0.008	0.049	0.055
x11	Extension contact / Contacts de vulgarisation	0.899**	0.129**	0.386	2.904
x12	Economic motivation / Motivation économique	0.911**	0.116**	0.182	2.255
x13	Marketing support / Soutien marketing	0.799**	0.035	-0.029	0.598
x14	Socio-economic status / Situation socio-économique	0.015**	-0.006	0.041	0.679
x15	Subsidy or loan / Subvention ou prêt	0.049	0.089	0.051	0.053
x16	Technical support / Soutien technique	0.900	0.009	0.087	0.053

$R^2 = 0.939$ ** Significant at 1 per cent level / Significatif au seuil de 1 %.

a = 4.622

It is observed from Table III that the correlation coefficients of 12 out of 14 variables, namely, age, education, social participation, utilization of information source, mass media exposure, annual income, extension contact, economic motivation, marketing support, subsidy or loan, technical support and socio-economic status were significant at 0.01 level of probability with adoption of improved sericulture practices. Among these, only age was found negatively correlated. Further, correlation coefficient of family size (-0.119), land holding (-0.109) and family type (-0.072) with extent of adoption was negative and non-significant, whereas occupation (0.005) was found positive but non-significant with adoption level of respondents at 0.01 level of probability. It is clear from the

above finding that there were significant correlations between majority of characteristics of respondents and extent of adoption of improved sericulture practices. The variables showing positive and significant relationship need greater attention on the part of extension agency to enhance adoption of sericulture technology in the area.

4. The regression analysis (Multiple regressions)

The multiple regression analysis was performed to find out the effect and extent of influence of each variable (fourteen independent variables) towards the level of adoption of improved sericulture practices. The results of analysis involving fourteen variables are presented and furnished in Table IV.

The equation has been given below:

$$Y_2 = 4.622 - 0.002x_1 + 0.149x_2 - 0.004x_3 - 0.029x_4 + 0.002x_5 + 0.105x_6 - 0.012x_7 - 0.008x_8 + 0.151x_9 - 0.008x_{10} + 0.129x_{11} + 0.116x_{12} + 0.035x_{13} - 0.006x_{14} + 0.089x_{15} + 0.009x_{16}$$

It could be concluded from the equation that out of sixteen variables taken for analysis of regression, six variables, viz., education (x_2), social participation (x_6), mass media exposure (x_9), extension contact (x_{11}), economic motivation (x_{12}) and Technical support (x_{16}) were found to have a significant contribution on the adoption gain of sericulture practices.

The positive and significant value of x_2 , x_6 , x_9 , x_{11} , x_{12} and x_{16} at one per cent level indicated that a unit increase in each of them resulted in increase of 0.149, 0.105, 0.151, 0.129, 0.116 and 0.009 units of adoption gain of improved sericulture practices.

With respect to other variables studied, their contribution towards adoption gain of improved sericulture practices could not be explained with full validity in regression analysis due to their non-significant contribution towards dependent variable.

5. Analysis of variance:

The coefficient of determination (R^2 value) was 0.939, which indicates that 0.939 per cent variation in the adoption gain of sericulture practices was explained by the sixteen independent variables selected for the study.

CONCLUSION

The study has revealed that twelve out of fourteen variables were significant at 0.01 level of probability with adoption of improved sericulture practices among sericulture growers. Six variables were found to contribute towards the growers' adoption of improved sericulture practices namely education, social participation, mass media exposure, extension contact, technical support and economic motivation. The growers of the region consider sericulture as a profitable enterprise and hence are economically motivated. Since they have showed a tendency for social participation, they need to be organized into small cooperative societies for promoting sericulture. Extension contact was also found to contribute significantly to the level of adoption of Sericulturists. Extension strategy should ensure that the extension workers are provided adequate training in participatory methods, communication skill, and advisory services to deal effectively with small and poor farmers to promote adoption.

REFERENCE

- DAS, K.K. (1999) Identification of factors influencing Sericultural productivity in Malda district of West Bengal Indian journal sericulture. Vol.38.No.1.17-213

- SARKAR, A. (1997) Adoption behavior of Silk worm-reares in relation to scientific Sericultural innovations. *Environment & Ecology* 15:855-859
- SIGH, M.P.R & SIGH. D.P (1999) Factors affecting adoption behavior of mustard growers current *Agriculture* 23: 1-2 87-92.
- SERNA, P.C (2000) Adoption of improved reeling technologies in traditional areas *Indian Journal of sericulture* 38: 2, 8386.
- SIDDARAMAIAH, B.S., VENKATA RANYE NOOLKA AND PRAKASH KUMAR, R. (1995). Adoption of improved sericultural practices of improved sericultural practices. *Indian journal of extension education* Vol XXIX, No 182.
- SRINIVASA, G., CHENGA PPA, P.G.M., KESHAVA, REDDY, LALITH ACHOTH, NAGARAJA, G.N., (2005). Socio economic determine of technology adoption in sericulture-and analysis. *Indian journal of Agriculture Economic* 25: 1-2 92-102.
- TIPPAWAN, LIMUNGGURA., SIRIPORN, BOONCHOO. (2007), Sericulture technology of farmers network on the community reeling factory. *KMTL Sericulture technology journal*. Vol. 7 No. S2.

CORRELATIFS SOCIO-ECONOMIQUES ET PERSONNELS DANS L'ADOPTION DE PRATIQUES SERICICOLES AMELIOREES

MOHAMMAD KARIM MOTAMED

Assistant Professor, Department of Rural Development, Faculty of Agricultural Sciences,
University of Guilan, Rasht – Iran.

On a réalisé une étude dans douze villages de districts de l'Etat de Guilan en Iran sélectionnés de manière aléatoire. L'objectif de cette étude est d'identifier les facteurs socio-économiques et personnels qui ont un effet sur l'adoption de pratiques sérícicoles améliorées. On recueille les données chez 360 personnes sélectionnées au hasard. L'étude révèle que le coefficient de corrélation de 12 variables socio-économiques et personnelles sur 16, c'est-à-dire l'âge, l'éducation, la participation sociale, l'utilisation de sources d'informations, l'exposition aux mass media, le revenu annuel, les contacts de vulgarisation, la motivation économique, le soutien marketing, les subventions (prêts), le soutien technique et la situation socio-économique est significatif au seuil de 0,01 de probabilité. La corrélation entre l'âge et les connaissances est négative, tandis que toutes les autres corrélations sont positives. Cependant, les corrélations entre la taille de la famille, le type de famille, la possession de terrain et le métier s'avèrent négatives et non significatives. Par ailleurs, les tests statistiques en utilisant l'analyse de régression multiple révèlent que parmi les seize variables étudiées, seules six variables, c'est-à-dire l'éducation, la participation sociale, l'exposition aux mass media, les contacts de vulgarisation, le soutien technique et la motivation économique s'avèrent présenter une contribution significative positive par rapport au gain apporté par l'adoption de pratiques sérícicoles au seuil de probabilité de 1 %.

INTRODUCTION

La séríciculture, une industrie artisanale rurale est très adaptée à l'Iran, compte tenu de sa base agricole et de son rôle dans l'apport d'un emploi rural, particulièrement pour les petits fermiers et les fermiers pauvres. Bien qu'elle nécessite l'emploi de beaucoup de main d'œuvre, elle offre des profits relativement élevés pour des investissements modestes et peut employer une famille entière y compris les femmes. Elle peut stopper la migration des masses rurales vers les quartiers urbains insalubres et générer des revenus pour les pauvres. Un certain nombre de technologies rentables a été mis au point pour augmenter la productivité de la soie par unité de surface. Il est essentiel de diffuser ces nouvelles technologies dans de nouvelles zones. A cet égard, les efforts conjoints de l'état et des rouages centraux sont nécessaires pour transférer ces technologies aux fermiers et les former de manière appropriée. Toutes ces activités réclament une amélioration de la vulgarisation et du soutien technique pour les inciter à augmenter la surface de mûriers produits, à augmenter la production d'œufs de vers à soie et la productivité de la soie. Les caractéristiques socio-économiques des cultivateurs influencent directement le degré d'adoption de nouvelles méthodes sérícicoles de production et de productivité. Dans leurs études sur l'adoption de pratiques sérícicoles améliorées, Siddaramaiah et coll., (1995) Sarkar (1997) Singh et Das (1999) ont signalé que le degré d'adoption des pratiques sérícicoles par les fermiers est significativement associé aux facteurs socio-économiques. Serna (2000) a signalé qu'il y a une association positive entre les caractéristiques socio-économiques des fermiers et le degré d'adoption des technologies de séríciculture modernes. Srinivasa et coll., (2005) ont rapporté dans

leurs études que l'âge, l'éducation, la taille du terrain, la participation à la vulgarisation et la motivation économique influencent l'utilisation de lignées de vers à soie internationales par les fermiers. Tippawan et Sirriporn (2007) ont révélé qu'il y a des différences très significatives dans l'âge des fermiers, dans l'occupation des terrains, dans l'expérience séricicole, dans le nombre de plants de mûriers / rai, dans la production de mûriers, dans le cycle d'élevage et dans la production de cocons / an. Dans cette étude, on a essayé d'étudier les relations entre les caractéristiques socio-économiques et personnelles des éleveurs de ver à soie pour évaluer l'adoption des pratiques séricoles améliorées. Les résultats de cette étude permettront de résoudre certains des problèmes liés à l'adoption des pratiques séricoles améliorées par les sériculteurs et d'évaluer la relation entre les caractéristiques socio-économiques des éleveurs et le degré d'adoption des pratiques séricoles améliorées.

MATERIELS ET METHODES

Plus de 65 % des cocons en Iran sont produits dans l'état de Guilan. L'étude a été réalisée dans les villes d'Asatane, de Langeroud et de Fouman dans l'état de Guilan en Iran d'avril 2007 à septembre 2008. Chaque ville est divisée en deux districts et 6 blocs. Parmi les blocs, on sélectionne 3 blocs de manière aléatoire. Sur ces blocs sélectionnés, on prend 12 villages sélectionnés de manière aléatoire, c'est-à-dire qu'on sélectionne 12 villages pour l'étude.

Pour chaque village sélectionné, on obtient une liste de fermiers pratiquant la sériculture auprès du Central Silk Board et on sélectionne 30 fermiers dans chaque village de manière aléatoire. L'échantillon pour l'étude comprend donc un ensemble de 360 personnes interrogées. On réalise l'étude avec 16 caractéristiques indépendantes.

x1 = Age	x2 = Education
x3 = Taille de la famille	x4 = Type de famille
x5 = Possession de terrain	x6 = Participation sociale
x7 = Métier	x8 = Utilisation de sources d'information
x9 = Exposition aux mass media	x10 = Revenu annuel
x11 = Contact de vulgarisation	x12 = Motivation économique
x13 = Soutien marketing	x14 = Situation socio-économique
x15 = Subventions	x16 = Soutien technique

Et une variable dépendante Y = degré d'adoption

Pour la mesure des caractéristiques socio-économiques et des autres aspects concernant les sériculteurs, on met au point un programme complet et on le teste sur le terrain avant le recueil des données. Pour le recueil des données, les méthodes utilisées sont les entretiens personnels, les observations directes, les rencontres et les discussions. On procède à l'analyse des données à l'aide d'un logiciel SPSS 15.0. On réalise les analyses statistiques suivantes :

Test de Corrélation Moment Produit de Pearson :

On calcule le coefficient de corrélation pour connaître la relation entre les variables indépendantes sélectionnées pour les fermiers et la variable dépendante, c'est-à-dire l'adoption des pratiques séricoles améliorées.

Analyse de régression multiple :

On l'emploie pour trouver la part significative de l'effet et du degré d'influence de chaque variable indépendante envers la variable dépendante, c'est-à-dire l'adoption des pratiques séricoles

améliorées. On tabule et on analyse les données recueillies. On recueille les réponses des personnes sur 15 pratiques sélectionnées, pour s'assurer du degré d'adoption des pratiques séricicoles recommandées. On classe les réponses en fonction des pratiques en 3 niveaux d'adoption.

Modèle d'adoption	Note
Non-adoption	0
Adoption partielle	1
Adoption complète	2

On obtient la note totale pour une personne interrogée en additionnant la note obtenue pour chaque pratique. La note minimale est de 0 et la note maximum de 90. On mesure le niveau d'adoption des personnes interrogées en utilisant un indice d'adoption mis au point par Karthikeyan (1994).

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Profil socio-économique des sériciculteurs :

Pour connaître le milieu et les caractéristiques socio-économiques des personnes interrogées, il est important d'analyser ces caractéristiques en profondeur. En tout, on étudie 16 variables socioéconomiques en utilisant des outils appropriés. Les données pertinentes, recueillies de cette manière et les résultats sont les suivants :

La majorité des personnes interrogées (75 %) pratiquant la sériciculture sont du groupe d'âge mûr (45—55ans). La plus grande part des personnes interrogées, c'est-à-dire 39 % a été éduquée jusqu'au premier cycle du secondaire, tandis que 20 % sont analphabètes. La plupart des personnes interrogées appartiennent à une famille de taille moyenne (3 à 5 membres). La taille moyenne de la famille est de 4 à 6 membres. Près des deux tiers (62 %) des personnes interrogées ont des familles regroupées. Plus de la moitié des personnes interrogées (52 %) travaillent sur de petits terrains (1,10 à 2 acres) et 25 % d'entre elles sur des terrains de taille marginale (0 à 1 acre). Cent pourcent des personnes interrogées participent à une organisation et environ 62 % sont membres de 3 organisations. L'agriculture est l'occupation principale de la majorité (63 %) des personnes interrogées. Seulement 31 % ont à la fois l'agriculture et le travail en tant que main d'œuvre, comme occupation principale. En ce qui concerne l'utilisation des sources d'informations, pour la majorité (67 %) des personnes interrogées, elle est faible et pour seulement 25 % elle est moyenne. La majorité (76 %) des personnes interrogées a une exposition moyenne aux media de masse. Près d'un tiers des personnes interrogées (33 %) a un niveau moyen de revenus (4000—50 000 Rs.), suivi par un niveau moyen inférieur (2000—40 000 Rs) (25 %). La majorité (75 %) des personnes interrogées a un niveau moyen de contacts de vulgarisation. Environ deux tiers (70 %) des personnes interrogées ont un niveau moyen de motivation économique. Près de la moitié des personnes interrogées (55 %) a une situation socio-économique moyenne, suivie par inférieure (40 %). La majorité (48 %) des personnes interrogées a un niveau moyen de soutien marketing, suivi par un niveau faible (41 %).

2. Degré d'adoption des pratiques séricicoles améliorées :

On analyse les réponses et les résultats sont présentés dans le Tableau I.

Les données du Tableau I montrent qu'une grande majorité des personnes interrogées (78 %) a pleinement recours à l'utilisation de graines de ver à soie à rendement élevé, suivie par la synchronisation des récoltes de cocons (75 %), par la pratique de l'élevage des vers à la période recommandée (68 %), et par la réalisation des boutures des mûriers et par l'alimentation des vers à soie (62 %) au moment approprié.

D'autre part, plus de 50 % des personnes interrogées ont partiellement adopté les recommandations, c'est-à-dire la méthode d'alimentation des vers à soie (52 %), la méthode de nettoyage (51 %), l'utilisation d'une magnanerie séparée (49 %) et la période de transfert des œufs / des insectes (50 %). Malgré un niveau élevé d'adoption des pratiques séricicoles recommandées, certaines pratiques sont complètement mises à l'écart par les sériciculteurs. La plus importante est l'utilisation d'engrais chez le mûrier. Cette pratique n'est pas adoptée par une grande majorité qui comprend 67 % des personnes interrogées, suivie par la période de lutte contre les champignons, les parasites et les maladies (60 %), le maintien de la température et de l'humidité relative dans la pièce d'élevage (57 %). On a étudié le degré d'adoption des pratiques séricicoles améliorées des personnes interrogées en ajoutant les notes individuelles reçues pour les différentes pratiques. Selon la note totale, on les a classées en trois catégories et les résultats sont présentés dans le Tableau II.

Les données du Tableau II montrent que la majorité des personnes interrogées (47 %) a un niveau moyen d'adoption des pratiques séricicoles améliorées. Un pourcentage négligeable des personnes interrogées, c'est-à-dire 23 % et 30 % a respectivement un niveau élevé et faible d'adoption des pratiques séricicoles améliorées. Les résultats suggèrent la nécessité d'efforts de vulgarisation plus importants pour transmettre le savoir-faire en matière de sériciculture améliorée aux personnes interrogées, de manière à augmenter leur niveau d'adoption.

3. Corrélatifs d'adoption :

En tenant compte de la supposition selon laquelle l'adoption est influencée par les différentes caractéristiques socioéconomiques des personnes interrogées, on calcule et on compare la relation entre les différentes variables socioéconomiques et l'adoption des pratiques séricicoles chez les personnes interrogées, ainsi que le coefficient de corrélation entre l'adoption et les 16 variables indépendantes sélectionnées. Les résultats sont présentés dans le Tableau III.

On observe d'après le Tableau III que les coefficients de corrélation de 12 variables sur 14, à savoir, l'âge, l'éducation, la participation sociale, l'utilisation des sources d'informations, l'exposition aux mass media, les revenus annuels, les contacts de vulgarisation, la motivation économique, le soutien marketing, les subventions ou les prêts, le soutien technique et la situation socioéconomique sont significatifs au seuil de probabilité de 0,01 par rapport à l'adoption des pratiques séricicoles améliorées. Parmi celles-ci, seul l'âge s'avère corrélé négativement. Par ailleurs, le coefficient de corrélation entre la taille de la famille (-0,119), les possessions de terrain (-0,109) et le type de famille (-0,072) avec le degré d'adoption est négatif et non significatif, tandis que le métier (0,005) s'avère positif mais non significatif avec le niveau d'adoption des personnes interrogées à un seuil de probabilité de 0,01. Il est clair d'après les résultats ci-dessus qu'il y a des corrélations significatives entre la majorité des caractéristiques des personnes interrogées et le degré d'adoption des pratiques séricicoles améliorées. Les organismes de vulgarisation doivent accorder une plus grande attention aux variables présentant une relation positive et significative afin d'améliorer l'adoption des technologies séricicoles dans la zone.

4. Analyse de régression (régressions multiples) :

On procède à l'analyse de régression multiple pour trouver l'effet et le degré d'influence de chaque variable (quatorze variables indépendantes) envers le niveau d'adoption des pratiques séricicoles améliorées. Les résultats de l'analyse impliquant quatorze variables sont présentés dans le Tableau IV.

L'équation est présentée ci-dessous :

$$Y_2 = 4.622 - 0.002x_1 + 0.149x_2 - 0.004x_3 - 0.029x_4 + 0.002x_5 + 0.105x_6 - 0.012x_7 - 0.008x_8 + 0.151x_9 - 0.008x_{10} + 0.129x_{11} + 0.116x_{12} + 0.035x_{13} - 0.006x_{14} + 0.089x_{15} + 0.009x_{16}$$

On peut conclure à partir de l'équation que sur seize variables prises pour l'analyse de régression, six variables, c'est-à-dire l'éducation (x_2), la participation sociale (x_6), l'exposition aux mass media (x_9), les contacts de vulgarisation (x_{11}), la motivation économique (x_{12}) et le soutien technique (x_{16}) présentent une contribution significative envers le gain dû à l'adoption des pratiques séricicoles.

La valeur positive et significative de x_2 , x_6 , x_9 , x_{11} et x_{16} à un seuil de 1 % indique qu'une augmentation d'une unité de chacune d'elles entraînerait une augmentation de 0,149 ; 0,105 ; 0,151 ; 0,129 ; 0,116 et de 0,009 unités du gain lié à l'adoption des pratiques séricicoles améliorées.

Par rapport aux autres variables étudiées, on ne peut pas complètement expliquer avec justesse leur contribution envers le gain dû à l'adoption des pratiques séricicoles améliorées dans l'analyse de régression, en raison de leur contribution non significative envers la variable dépendante.

5. Analyse de variance :

Le coefficient de détermination (valeur R^2) est de 0,939, ce qui indique que 0,939 % de la variation du gain dû à l'adoption des pratiques séricicoles est expliqué par les seize variables indépendantes sélectionnées pour l'étude.

CONCLUSION

L'étude a révélé que douze variables sur quatorze sont significatives au seuil de 0,01 de probabilité par rapport à l'adoption des pratiques séricicoles améliorées par les sériciculteurs. Six variables s'avèrent contribuer à l'adoption des pratiques séricicoles améliorées par les sériciculteurs, à savoir l'éducation, la participation sociale, l'exposition aux mass media, les contacts de vulgarisation, le soutien technique et la motivation économique. Les éleveurs de la région considèrent la sériciculture comme une entreprise rentable et ils sont donc motivés sur le plan économique. Puisqu'ils ont montré une tendance à la participation sociale, ils ont besoin d'être organisés en petites sociétés coopératives pour promouvoir la sériciculture. On a aussi constaté que les contacts de vulgarisation contribuent de manière significative au niveau d'adoption par les sériciculteurs. La stratégie de vulgarisation devrait s'assurer que les personnes impliquées dans la vulgarisation ont reçu une formation adéquate dans les méthodes participatives, dans les techniques de communication et dans la diffusion de conseils afin qu'elles s'occupent efficacement des petits fermiers pauvres et puissent promouvoir l'adoption.

STUDIES ON OVIPOSITIONAL BEHAVIOUR AND PREFERENCE OF ERI SILKWORM, *SAMIA CYNTHIA RICINI* BOISDUVAL UNDER SEMI ARID TROPICS OF INDIA

P. JAYA PRAKASH*, R. S. JAIKISHAN SINGH, B.V. SANJEEVA RAO & M. VIJAY KUMAR

Eri Silkworm Seed Production Centre, Central Silk Board, Warangal, Andhra Pradesh - 506 001, India.

Observations on ovipositional behaviour of eri silkmoth, Samia Cynthia ricini Boisduval, revealed that mated female moth survived for 6.36 days on an average with continuous egg laying upto 5.25 days. Gravid female laid 424.28 (94.00%) of eggs during first 05 days of its longevity whereas the commercial realized fecundity of 391.48 (86.73%) was obtained during the first 03 days of oviposition. Realized fecundity per moth was recorded as 230.85 (51.14%), 128.23 (28.41%) and 32.40 (7.18%) during first, second and third day of laying period, respectively. The average egg laying coefficient was 86.78% during five grainage seasons and ranged from 83.82 to 88.07%.

Among all the ovipositional devices tested so far, egg laying sheet with cellule device was preferred by moths for securing high realized fecundity (424.40), potential fecundity (455.00) and coefficient of egg laying (93.26%) in this tropical region. Other devices like card board box, nylon net bag and earthen cup stood in descending order of preference of egg laying when compared to control traditional device, khorikas. Further, laying sheet with cellule device is more economical for man power utilization in breeding programme, mother moth examination and reaping rich harvest of realized fecundity on large scale seed production.

Keywords: Cellule, Oviposition, Khorikas, Eri silk moth, gravid female)

INTRODUCTION

Southern plateau and hill region is one of the 15 agro climatic regions of India which includes 35 districts of Andhra Pradesh, Karnataka and Tamilnadu states. The entire region is considered as semi arid zone where dry land farming is being practiced in 81% of the area and cropping intensity is 111% (Khanna, 1989). The annual rainfall ranges from 676 to 1000 mm, maximum occurs from June to September.

Most of the Telangana districts of Andhra Pradesh fall under this zone where castor (*Ricinus communis* L.) a primary host plant of eri silkworm is grown in more than 85% of the area under rainfed conditions for castor seed production (Jaya Prakash *et al.*, 2003). Eri silkworm Seed Production Centre (ESSPC) Warangal was established to supply disease free layings (Dfl) to rearers of Telangana region. Except traditional practices, a major breakthrough has not been achieved so far in seed production technology of ericulture. Oviposition is one of the core aspects of seed production technology which needs direct attention (Dubey *et al.*, 1993 and Singh, 1998).

Several workers had contributed much to ovipositional behavior in field of mulberry and non-mulberry sectors for the last two decades (Dash and Nayak, 1992; Dubey *et al.*, 1994, and Debaraj

* (for correspondence : p-jayaprakash@hotmail.com)

et al., 1994 & 2003). However, information on egg laying preference of eri silk moth under semi arid conditions is scanty. The present investigation is aimed to focus on ovipositional behaviour and preference of eri silk worm, *Samia Cynthia ricini* B. (Saturniidae: Lepidoptera) under semi arid conditions (where evaporation exceeds precipitation) for maximizing the seed production on commercial level so as to reduce the gap between demand and supply of seed in Andhra Pradesh, India.

MATERIALS AND METHODS

In order to achieve the objective of the present study, following experiments were conducted with a stock of 2000 disease free seed cocoons processed for uninterrupted supply of mated females during every study season of five consecutive seasons of 2006-07 at ESSPC, Warangal, Andhra Pradesh, India. Optimum temperature (24°-26°C), relative humidity (85-90%) and semi dark conditions were maintained in separate oviposition chambers meant for experimentation.

I. Ovipositional behaviour:

Mated healthy females were separated from the stock in the late evening hours. They were allowed to urinate and the wings were clipped before placing on a egg laying paper sheet (35 × 30 cm) consisting of 20 square blocks (6.5 × 6.5 cm). Each female was placed on each square and covered with a black cone shaped cellule (bottom dia. 5.5 cm; top dia. 4.00 cm; height 4.5 cm). Two such sheets with a total of 40 females were spread on a wooden tray (90 × 60 × 10 cm) and kept in an isolated chamber for recording daily fecundity and life span of female. The dead moths were dissected for unlaied eggs, if any retained in ovaries, and were counted as unrealized fecundity. As in usual commercial grainages, the realized fecundity was accounted for no. of eggs laid during the first three days of oviposition. No. of eggs per gram weight and weight of one Dfl were also assessed for each season. The egg laying co-efficient was computed as per the following formula.

$$\text{Egg laying co-efficient (\%)} = \frac{\text{No. of eggs laid during 72 hrs}}{\text{Total no. of eggs (laid + unlaied)}} \times 100$$

II. Ovipositional preferences :-

Following 5 devices were tested in an isolated chamber for observing the female egg laying preference and avoiding the chances of further mating with males of stock culture during five seasonal studies.

T1 = Perforated card board boxes (12× 10 × 5 cm)

T2 = Nylon net bags (20 × 16 cm)

T3 = Egg laying sheets with cellules

T4 = Perforated Earthen cups (6 cm dia. and 4 cm height)

T5 (control) = Khorikas – a traditional device made up of straw bundle (20 × 2 cm) curved at one end

A sample of 40 gravid females per treatment were randomly selected from general stock and released (@ one female per device) with wings partially clipped. Similar set of mated females were tied (@1 female per khorika) as such to a khorikas (control) with a string passing under the articulation point of right wing. Each treatment was replicated four times in Randomized Block Design. Khorikas and nylon bags were hanged separately on coir rope at a distance of 10-15 cm in between each device. The other devices were spread at equal distances in wooden trays piled up in chambers. Merits and demerits of each device were determined by observing time and labor consumed in releasing of moths for egg laying and harvesting of 100 layings. Observations on moth longevity, realized, unrealized and potential fecundity were recorded to assess treatment wise co-efficient of egg laying.

RESULTS

Observations on ovipositional behaviour and preferences were statistically analyzed and presented in Tables I, II and III. Female and male moth life span lasted in the range of 5.25-7.00 and 4.00-6.00 days, respectively. The mean adult longevity was estimated for female (6.36 days) and male (4.75 days). Females used to prefer vertical position to lay eggs under normal conditions. Fertilized females started depositing ovoidal and candid white eggs in clusters on inner surface of the walls of device maximum during night and minimum during day times. An average oviposition period was recorded as 5.25 days during the study. Realized fecundity during the first five days of oviposition was recorded to 424.28 (94.00%) whereas 391.48 (86.73%) fecundity obtained in first three days only. The egg laying rate declined gradually to the mean of 32.80 (7.27%) eggs from 4th to 6th days of oviposition (Table I). Besides, 27.10 (6.00%) eggs were unlaied and retained in ovarioles by female in her life span. Hence, 13.27% of eggs were discarded for rearing which indicated 86.73% eggs recovered during first three days, which is of commercial importance owing to their viability.

Table I. Egg laying pattern of eri silkworm *Samia cynthia ricini* B.

Tableau I. Structure de ponte des oeufs du ver à soie eri *Samia Cynthia ricini* B.

Sl. No	Parameters	Mean	Range
No. de Paramètres	série	Moyenne	Fourchette
1.	No. of eggs laid on day of oviposition / Nbre d'oeufs pondus le jour de la ponte		
	- 1 st day / 1 ^{er} jour	230.85 (51.14%)	174.00 - 330.70
	- 2 nd day / 2 ^{ème} jour	128.23 (28.41%)	66.50 - 166.50
	- 3 rd day / 3 ^{ème} jour	32.40 (7.18%)	09.00 - 68.70
2.	Realized fecundity (No/moth) <i>Fécondité obtenue (Nbre / papillon)</i>	391.48 (86.73%)	336.98 - 400.90
3.	Eggs laid after third day of oviposition <i>Oeufs pondus après le 3^{ème} jour de ponte</i>	32.80 (7.27%)	06.760 - 65.78
4.	Realized fecundity during reproductive span (No.) <i>Fécondité obtenue pendant la durée de reproduction (Nbre)</i>	424.28 (94.00%)	334.94 - 430.28
5.	Unlaied eggs (No) / <i>Oeufs non pondus (Nbre)</i>	27.10 (6.00%)	10.96 - 56.60
6.	Potential fecundity (Eggs laid + unlaied) <i>Fécondité potentielle (Oeufs pondus + non pondus)</i>	451.38 (100.00%)	380.00 - 486.00
7.	Co-efficient of egg laying (%) / <i>Coefficient de ponte d'oeufs (%)</i>	86.78	83.82 - 88.07
8.	Adult longevity (days) / <i>Longévité adulte (jours)</i>		
	Male / <i>Mâle</i>	4.75	4.00 - 6.00
	Female / <i>Femelle</i>	6.36	5.25 - 7.00
9.	No. of eggs per gram / <i>Nbre d'oeufs par gramme</i>	588.20	566.00 - 645.00
10.	Average weight of dfl (g) / <i>Poids moyen d'une ponte saine (g)</i>	0.65	0.60 - 0.76

Table II. Ovipositional preference of eri silk moth *Samia cynthia ricini* B. for different devices under semi arid conditions of Andhra Pradesh

Tableau II. Préférence de ponte du papillon eri Samia Cynthia ricini B. pour différents systèmes dans les conditions semi-arides de l'Andhra Pradesh.

Sl. No.	Treatments	Realized fecundity (No/Moth)	Eggs retained (No/Moth)	Potential fecundity (No/Moth)	Co-efficient of egg laying (%)	Female moth longevity (days)	Time required for	
							Releasing of 100 moths (min.)	Harvesting of 100 layings (min.)
No. de série	Traitements	Fécondité obtenue (Nbre / papillon)	Oeufs retenus (Nbre / papillon)	Fécondité potentielle (Nbre / papillon)	Coefficient de ponte des oeufs (%)	Longévité du papillon femelle (jours)	Temps nécessaire pour	
							la libération de 100 papillons (min)	recueillir 100 pontes (min.)
T1	Card board boxes <i>Boîtes en carton</i>	380.52	41.46	421.98	90.24	6.00	27.00	25.33
T2	Nylon net bag <i>Sacs en maille de nylon</i>	332.04	64.02	396.06	83.84	6.90	39.33	25.30
T3	Egg laying sheet with cellule <i>Feuille de ponte cellulaire</i>	424.40	30.60	455.00	93.26	7.00	27.00	17.30
T4	Earthen cup / <i>Tasse en faïence</i>	266.36	76.38	342.74	78.00	6.50	28.00	35.66
T5	Khorika (control / <i>témoin</i>)	310.00	64.02	374.02	82.88	6.00	64.00	18.33
	F-Test / <i>Test-F</i>	73.906**	11.3957**	6.502**	19.305**	—	—	—
	CD at 5% / <i>DC à 5 %</i>	21.376	16.604	43.670	4.097	—	NS	NS
	CD at 1% / <i>DC à 1 %</i>	29.456	22.877	59.343	5.645	—	NS	NS

** Highly significant at 1% level / *Très significatif au seuil de 1 %.*

Table III. Analysis of variation for different reproductive traits of eri silk moth under different seasons.**Tableau III. Analyse de la variation pour différents caractères reproductifs du papillon eri pendant différentes saisons.**

Cropping period	Realized Fecundity No/Moth	Eggs retained (No/Moth)	Potential Fecundity (No/Moth)	Co-efficient of egg laying (%)	Number of eggs/g	Weight of df/g
<i>Période de récolte</i>	<i>Fécondité obtenue Nbre / papillon</i>	<i>Oeufs retenus (Nbre / papillon)</i>	<i>Fécondité potentielle (Nbre / papillon)</i>	<i>Coefficient de ponte des oeufs (%)</i>	<i>Nbre d'oeufs / g</i>	<i>Poids d'une ponte saine / g</i>
August / Août	341.20	65.78	406.98	83.82	572	0.68
September / Septembre	334.94	52.62	387.56	86.42	610	0.60
October / Octobre	400.90	54.30	455.20	88.07	645	0.66
November / Novembre	336.98	48.24	385.26	87.47	566	0.76
December / Décembre	346.88	55.54	402.38	86.21	605	0.67
Treatments / Traitements	76.134**	10.84**	36.21**	26.057**	NS	NS
Season / Moth	1.5123NS	0.3520NS	3.01NS	1.950NS	NS	NS
Saison / Papillon						
Month × Treat	1.9134*	1.552	1.213*	1.351NS	NS	NS
Mois × Trait.						
Error / Erreur	946.8312	470.52	1049.83	27.67	—	—

NS = Non significant / Non significatif

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

* = Significant at 5% level / Significatif au seuil de 5 %

Ovipositional parameters varied significantly at 1% level for various devices. Fecundity realized was observed maximum in egg laying sheet (424.40) with cellule followed by card board boxes (380.52), nylon net bag (332.04), Khorikas (310.00) and earthen cups (266.66) devices. Eggs retained per female was noticed in ascending order of preference for egg laying sheet (30.60) card board box (41.46) nylon bag/Khorikas (64.02) earthen cup (76.38). As far as the potential fecundity and egg laying coefficient are concerned, laying sheet with cellule is found the best device among others for oviposition. Earthen cups were least preferred by female moth for having recorded the lowest realized fecundity (266.36), potential fecundity (342.74) and egg laying coefficient (78.00%). No significant difference was observed in time consumption for release of 100 moths and harvesting of 100 layings in these devices except in laying sheet with cellule which claimed time much lesser than any other devices (Table II).

Observations on different reproductive traits during different months of seasons were subjected to ANOVA test and presented in Table III. Significant variation at 1% level was observed among all the treatments for ovipositional indices i.e., realized and potential fecundity, coefficient of egg laying etc. Significant variation at 5% level in between months and treatments was observed only for realized and potential fecundity. Realized fecundity during first three days ranged from 334.94 (September) to 400.90 (October). The potential fecundity of each moth in its life span ranged from 387.56

(September) to 455.20 (October). The eggs per gram and weight of one dfl ranged from 566 to 645 and 0.60 to 0.76 g, respectively.

DISCUSSION

Like other semelparous adults of Saturniidae family, eri moths lived for shorter duration only to copulate and lay eggs without seeking food till death. During the study, wings of mated females were clipped to prevent flying and lay eggs all over the chambers resulting in wastage of seed. Reports on ovipositional behavior of non-mulberry (Truman and Riddiford 1971) and mulberry (Yamaoka and Hirao 1973) silkmths confirm the present findings that sperms in spermatheca of mated females stimulated the brain through spermathecal factor to release ovipositional hormone which affects activity of abdominal ganglion to fly and oviposit eggs on suitable substratum. Rate and percent involvement of eri gravid moth in oviposition were found higher in first 3 days and lower in consecutive days of present study. It is reported that the females of *Bombyx mori* L. (Trag *et al.*, 1988) and *Antheraea paphia* (Dash and Nayak 1992) oviposited maximum (90%) eggs on first day itself. Debaraj *et al.*, (1994) recorded 82.10% (386.65) of realized fecundity and 80.30% of egg laying co-efficient for eri silkmth in North East India. However, Govindan *et al.*, (1981) recorded average fecundity (280.55) of eri silkmth in Karnataka state of South India, which is 29.65% lesser to the realized fecundity of present investigation.

Various devices are being tested for determining the ovipositional preferences in non-mulberry silkworm grainages. During the present study, laying sheet with cellule was found mostly preferred than card board boxes, nylon bags, Khorikas and earthen cups for egg laying under tropical conditions of Andhra Pradesh. However, these devices are having their own merits and demerits in utilization. Card board boxes, preferred next to laying sheet with cellule device, can not be reused after disinfection which incurs additional expenditure for procuring new ones. Plastic cellules and nylon net bags with longer durability can be reused after disinfection. Vertical positions of devices were more preferred than horizontal plane for egg laying by eri moth. Fujimoto (1951) and Jolly *et al.*, (1964) reported that topography of substratum and slightly inclined plane of oviposition site leads to higher fecundity in *Bombyx mori* L. The smooth surface of egg laying sheet with cellule and card board boxes might have influenced the tendency to lay maximum eggs when compared to rough surfaces of other devices. Present results of ovipositional preference are at par with those of Legay (1989), Gupta *et al.*, (1990), Manjula Kumari and Geethabali (1991) and Singh (1998) in *Bombyx mori* L. The present findings are contradictory to those of Debaraj *et al.*, (2003) who concluded that the texture of substratum did not influence the laying preference of eri silkmth under temperate conditions of North East India.

It may be inferred that laying sheet with cellule is mostly preferred and convenient for oviposition, mother moth examination by Chinese pricking method, release of moths and harvesting of layings which saves time and labor. Five egg laying sheets with 20 gravid females each covered under cellules can be spread in a wooden tray (90 × 60 × 10cm). 20 such trays can be accommodated in a iron rack in oviposition chamber (6 × 4.50 m) having space to accommodate 8 racks for commercial seed production. It minimize the space requirement and egg loss that often occurred due to egg falling on the ground while handling the traditional device Khorikas. This device could be more accurate and appropriate for conducting parental stock maintenance and breeding programme.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Dr G. P. Mahobia, Scientist – C, RTRS, Jagadapur, Chattisgarh, India for his kind cooperation in preparing the manuscript.

REFERENCES

- DASH A.K. & NAYAK B.K. (1992) Studies on some oviposition behaviour of Goda Modal ecorace of Indian wild tasar silkmoth *Antheraea paphia* Linn. (Lepidoptera: Saturniidae): In: *Wild Silkmoth '91. International Society for Wild Silkmths.*, H. Akai, Y. Kato, M. Kiuchi and Kobayashi (Eds.) Pp. 78-81
- DEBARAJ Y., CHALAPATHI M.V., SINHA R.K. & NOAMANI M.K.R. (1994) Ovipositional behaviour and relationship between the body weight and fecundity in *Antheraea proylei* J. (Saturniidae: Lepidoptera). *Indian J. Seric.* 33(1): 33-42.
- DEBARAJ Y., SARMAH M.C & SURYANARAYANA N. (2003) Seed technology in Eri silkmoth – Experimenting with other oviposition devices. *Indian J. Seric.* 42(2): 118-121.
- DUBEY O.P., BAJPEYI C.M., OJHA N.G. & THANGAVELU, K. (1993) Oviposition – A vital aspect in silkworm rearing, *Indian Silk.*, 31(11): 29-31.
- DUBEY O.P., OJHA N.G., JAYASWAL J & THANGAVELU K. (1994) Studies on oviposition behavior in tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D *Indian J. Seric.*, 33(2): 176-177.
- FUJIMOTO N. (1951). Laying of eggs on the inclined plane in the silkworm moth. *J.Seric. Sci. Jpn.*, 20(3), 258
- GOVINDAN R., DEVAIAH M.C., THIPPESWAMY C & RANGASWAMY H.R. (1981) Ovipositional behaviour of eri silkmoth, *Samia Cynthia ricini* Boisd. under Dharwad conditions. *Proc. Seric. Symp. Seminars*, (T.S. Muthu Krishnan and S.R. Sree Ranga Swamy (Eds.) T.N.A.U. Coimbatore, India. Pp. 35-38.
- GUPTA B.K., KHAROO V.K & SAHANI N.K. (1990) Effect of different laying sheets on number of eggs laid by silkworm (*Bombyx mori*). *Bioved.*, 1(1):79-80.
- JAYA PRAKASH P., RAO, B.V.S., RAO K.V., RAO J.V.K & SINHA B.R.R.P. (2003) Re-introduction of Ericulture in Andhra Pradesh; Hopes galore. *Indian Silk.*, 41(12): 19-20.
- JOLLY M.S., SUBBA RAO S & KRISHNASWAMI S. (1964). Effect of plane of inclination on egg laying by *Bombyx mori* L. *Indian J. Expt. Biol.*, 2, 165 – 166
- KHANNA S.S. (1989) Farm Planning – The agro climatic approach. THE HINDU. Survey of Indian Agriculture. Pp. 28-35.
- LEGAY J.M. (1989) Contribution to the typological analysis of the laying behaviour in *Bombyx mori* L., *Sericologia.*, 29(2): 163-166.
- MANJULA KUMARI D & GEETHABALI. (1991) Ovipositional response of *Bombyx mori* L. to different textures of the substratum. *Entomon.*, 16(1): 11-15.
- SINGH T. (1998) Behavioural aspects of oviposition in the silkworm *Bombyx mori* – A review. *Indian J. Seric.*, 37(2): 101-108
- TRAG A.R., SHAHEEN A., NABI G., AHMAD F & BINDROO B.B. (1988) Studies on the oviposition rate in fertilized univoltine females of *Bombyx mori* L. *Procs. International Congress on Tropical Sericulture Practices.*, February 18-23, Bangalore, India, Part VI, Pp. 7-10.
- TRUMAN J. W & RIDDIFORD L.M. (1971) Role of Corpora Cardiac in the behaviour of Saturniidae moths II. Oviposition. *Biol. Bull.*, 40, 8 -14)
- YAMAOKA K & HIRAO T. (1973). Releasing signals of oviposition behaviour in *Bombyx mori* L. *J. Insect physiol.*, 19, 2215 – 2223.

ETUDES SUR LE COMPORTEMENT ET SUR LA PREFERENCE DE PONTE DU VER A SOIE ERI, *SAMIA* *CYNTHIA RICINI* BOISDUVAL DANS LES CONDITIONS TROPICALES SEMI-ARIDES DE L'INDE

P. JAYA PRAKASH*, R. S. JAIKISHAN SINGH, B. V. SANJEEVA RAO &
M. VIJAY KUMAR

Eri Silkworm Seed Production Centre, Central Silk Board, Warangal,
Andhra Pradesh – 506 001, Inde.

Les observations sur le comportement de ponte du papillon eri, Samia cynthia ricini Boisduval, révèlent que le papillon femelle accouplé survit pendant 6,36 jours en moyenne avec une ponte continue d'œufs jusqu'à 5,25 jours. La femelle gestante pond 424,28 (94 %) œufs au cours des cinq premiers jours de sa longévité, tandis qu'on obtient une fécondité commerciale de 391,48 (86,73 %) pendant les trois premiers jours de l'oviposition. La fécondité enregistrée par papillon est de 230,85 (51,14 %), 128,23 (28,41 %) et de 32,40 (7,18 %) respectivement pendant les premier, deuxième et troisième jours de la période de ponte. Le coefficient de ponte moyen est de 86,78 % pendant les cinq saisons de grainage et est compris entre 83,82 et 88,02 %.

Parmi tous les systèmes de ponte testés jusqu'à présent, la feuille de ponte avec le système cellulaire est celui que préfèrent les papillons, elle permet d'obtenir une fécondité (424,40), une fécondité potentielle (455,00) et un coefficient de ponte d'œufs (93,26 %) élevés dans cette zone tropicale. Les autres systèmes tels que la boîte en carton, le sac en maille de nylon et la tasse en faïence se classent dans un ordre décroissant de préférence pour la ponte des œufs, par comparaison au système traditionnel témoin, les khorikas. Par ailleurs, la feuille de ponte avec le système cellulaire est plus économique en main d'œuvre dans les programmes de lignage, pour l'examen du papillon mère et pour s'assurer d'une fécondité abondante dans la production de graines à grande échelle.

INTRODUCTION

Le plateau et la région vallonnée du sud est l'une des 15 régions agroclimatiques de l'Inde, qui comprend 35 zones dans les états de l'Andhra Pradesh, du Karnataka et du Tamil Nadu. On considère toute la région comme une zone semi-aride, où on pratique l'agriculture de terres sèches sur 81 % de la zone et où l'intensité de culture est de 111 % (Khanna, 1989). Les précipitations annuelles sont comprises entre 676 et 1000 mm, et elles sont à leur maximum entre juin et septembre.

La plupart des districts de Telangana dans l'Andhra Pradesh entrent dans la zone où le ricin (*Ricinus communis* L.), une plante hôte primaire du ver à soie eri est cultivée sur plus de 85 % de la surface dans des conditions sans irrigation pour la production de graines de ricin (Jaya Prakash et coll., 2003). Le Centre de Production de Graines du Ver à Soie Eri (ESSPC) de Warangal a été créé pour fournir des pontes saines aux éleveurs de la région de Telangana. A l'exception des pratiques traditionnelles, aucune découverte principale n'a été réalisée, jusqu'à présent, en matière de technologie de production de grainage dans l'élevage de l'eri (Dubey et coll., 1993 et Singh, 1998).

* Auteur auquel adresser la correspondance :E-mail : dr.manohar1959@rediffmail.com

Plusieurs chercheurs ont largement contribué à l'étude du comportement de ponte dans les secteurs mûrier et non-mûrier au cours des deux dernières décennies (Dash et Nayak, 1992 ; Dubey et coll., 1994 et Debaraj et coll., 1994 et 2003). Cependant, les informations sur les préférences en matière de ponte du papillon eri dans les conditions semi-arides sont rares. Cette étude est destinée à analyser le comportement et la préférence de ponte du ver à soie eri, *Samia cynthia ricini* B. (Saturniidés : Lépidoptères) dans les conditions semi-arides (où l'évaporation dépasse les précipitations) pour maximiser la production de graines au niveau commercial, de manière à réduire l'écart entre l'offre et la demande en graines dans l'Andra Pradesh en Inde.

MATERIELS ET METHODES

Pour atteindre l'objectif de cette étude, les expériences suivantes ont été réalisées avec un stock de 2000 cocons sains traités pour une offre ininterrompue en femelles accouplées pendant chaque saison d'étude, pendant cinq saisons consécutives de 2006-07 à l'ESSPC, Warangal, dans l'Andhra Pradesh, en Inde. On maintient la température optimale (24°-26° C), l'humidité relative (85-90 %) et les conditions de semi-obscurité dans des pièces de ponte séparées pour l'expérience.

1. Comportement de ponte :

On sépare les femelles saines accouplées du stock à la fin de la soirée. On les laisse uriner et on coupe leurs ailes, avant de les placer sur une feuille de ponte en papier (35 × 30 cm), constituée de 20 cases carrées (6,5 × 6,5). On place chaque femelle sur chaque case et on la recouvre avec un cône cellulaire noir (diamètre du bas 5,5 cm ; diamètre du haut 4 cm ; hauteur 4,5 cm). On dispose deux feuilles de ce type avec un total de 40 femelles sur une claie en bois (90 × 60 × 10 cm) et on les conserve dans une pièce isolée pour enregistrer la fécondité quotidienne et la durée de vie des femelles. On dissèque les papillons morts pour observer s'il y a des œufs non pondus retenus dans les ovaires et on les compte en tant que fécondité non obtenue. Comme dans les grainages habituels, la fécondité obtenue est représentée par le nombre d'œufs pondus pendant les trois premiers jours de l'oviposition. On évalue aussi le nombre d'œufs par gramme de poids et le poids d'une ponte saine pour chaque saison. On calcule le coefficient de ponte d'après la formule suivante :

$$\text{Coefficient de ponte (\%)} = \frac{\text{Nb're d' oeufs pondus pendant 72h}}{\text{Nb're total d' oeufs (pondus + non pondus)}} \times 100$$

2. Préférences de ponte :

On a testé les 5 systèmes suivants dans une pièce isolée pour observer les préférences de ponte des femelles et éviter les risques d'accouplement supplémentaires avec les mâles du stock d'élevage pendant les cinq études saisonnières.

T1 = Boîtes en carton perforées (12 × 10 × 5 cm)

T2 = Sacs en maille de nylon (20 × 16 cm)

T3 = Feuilles de ponte cellulaires

T4 = Tasses perforées en faïence (diamètre de 6 cm et hauteur de 4 cm)

T5 (témoin) = Khorikas – un système traditionnel fait à partir d'une botte de paille (20 × 2 cm) arrondi à une extrémité

On sélectionne de manière aléatoire un échantillon de 40 femelles gestantes par traitement sur le stock général et on les libère (à raison d'une femelle par système) avec les ailes partiellement coupées. On attache un lot similaire de femelles accouplées (à raison d'une femelle par khorika) aux khorikas (témoin) avec une ficelle passant en dessous du point d'articulation de l'aile droite. On répète chaque

traitement quatre fois, selon une conception aléatoire en blocs. On suspend séparément les sacs en maille de nylon et les khorikas sur une corde en coco avec un espacement de 10-15 cm entre chaque système. On dispose les autres systèmes à des distances égales sur des claies en bois superposées dans des pièces. On évalue les mérites et les démérites de chaque système en observant le temps et la main d'œuvre utilisés pour libérer les papillons pour la ponte des œufs et pour récolter 100 pontes. On enregistre les observations sur la longévité des papillons, sur la fécondité obtenue, non obtenue et potentielle pour évaluer le coefficient de ponte en fonction des traitements.

RESULTATS

Les observations sur le comportement et les préférences de ponte sont présentées dans les Tableaux I, II et III. La durée de vie du papillon femelle et mâle est de respectivement 5,25 à 7 et de 4 à 6 jours. On estime la longévité adulte moyenne pour la femelle (6,36 jours) et le mâle (4,75 jours). Les femelles préfèrent la position verticale pour pondre les œufs dans des conditions normales. Les femelles fécondées commencent à déposer des œufs blancs ovoïdes et clairs en grappe sur la surface intérieure des parois du système, avec un maximum pendant la nuit et un minimum pendant le jour. Pendant l'étude, on enregistre une période moyenne de ponte de 5,25 jours. On enregistre une fécondité pendant les cinq premiers jours de ponte de 424,28 (94 %), tandis que pendant seulement les trois premiers jours, on obtient une fécondité de 391,48 (86,73 %). Le taux de ponte baisse progressivement jusqu'à une moyenne de 32,80 (7,27 %) du 4^{ème} au 6^{ème} jour de ponte (Tableau I). Par ailleurs, 27,10 œufs (6 %) ne sont pas pondus et restent dans les ovarioles de la femelle pendant sa durée de vie. On perd donc 13,27 % d'œufs dans l'élevage, ce qui indique un taux de recouvrement d'œufs de 86,73 % pendant les trois premiers jours, ce qui a une importance commerciale en raison de leur viabilité.

Les paramètres de ponte varient de manière significative au seuil de 1 % avec les différents systèmes. La fécondité obtenue est maximum avec les feuilles de ponte cellulaires (424,40), suivies par les boîtes en carton (380,52), le sac en maille de nylon (332,04), les Khorikas (310,00) et les tasses en faïence (266,66). On remarque que pour les oeufs retenus par femelle l'ordre croissant de préférence est le suivant : feuille de ponte (30,60), boîte en carton (41,46), sac en nylon / khorikas (64,02) et la tasse en faïence (76,38). En ce qui concerne la fécondité potentielle et le coefficient de ponte, la feuille de ponte cellulaire s'avère le meilleur système par rapport à tous les autres. Les tasses en faïence sont le système le moins préféré par les papillons femelles, puisqu'on enregistre la fécondité obtenue (266,36), la fécondité potentielle (342,74) et le coefficient de ponte (78,00 %) les plus faibles. On n'observe pas de différence significative par rapport à la durée de temps utilisé pour libérer 100 papillons et pour récolter 100 pontes avec ces systèmes, sauf pour la feuille de ponte cellulaire qui demande beaucoup moins de temps que les autres systèmes (Tableau II).

On soumet les observations sur les différents caractères reproductifs pendant les différents mois des saisons au test ANOVA, qui est présenté dans le Tableau III. On observe une variation significative au seuil de 1 % entre tous les traitements pour les indices de ponte, c'est-à-dire la fécondité obtenue et potentielle, le coefficient de ponte des œufs, etc.. On n'observe une variation significative au seuil de 5 % entre les mois et les traitements que pour la fécondité obtenue et potentielle. La fécondité obtenue pendant les trois premiers jours est comprise entre 334,94 (septembre) et 400,90 (octobre). La fécondité potentielle de chaque papillon pendant sa durée de vie est comprise entre 387,56 (septembre) et 455,20 (octobre). Le nombre d'œufs par gramme et le poids d'une ponte saine sont compris respectivement entre 566 et 645 et 0,60 à 0,76 g.

DISCUSSION

Comme tous les autres adultes sémelpares de la famille des Saturnidés, les papillons eri vivent pendant une durée courte uniquement pour s'accoupler et pour pondre des œufs, sans chercher de nourriture, jusqu'à leur mort. Pendant l'étude, on coupe les ailes des femelles accouplées pour les empêcher de voler et de pondre des œufs dans toutes les pièces, ce qui entraînerait un gaspillage des graines. Les rapports sur le comportement de ponte des papillons non-mûriers (Truman et Riddiford, 1971) et mûriers (Yamaoka et Hirao, 1973) confirment nos résultats, selon lesquels le sperme dans les spermathèques des femelles accouplées stimule le cerveau par le facteur spermathécal pour libérer l'hormone de ponte qui affecte l'activité du ganglion abdominal pour le vol et pour la ponte des œufs sur le substrat adapté. Dans cette étude, le taux et le pourcentage d'implication du papillon eri gisant dans la ponte s'avèrent plus élevés pendant les 3 premiers jours et plus faibles les jours suivants. On a signalé que les femelles de *Bombyx mori* L. (Trag et coll., 1988) et d'*Antheraea paphia* (Dash et Nayak, 1992) pondent le maximum d'œufs (90 %) le premier jour. Debaraj et coll., (1994) ont enregistré une fécondité obtenue de 82,10 % (386,56) et un coefficient de ponte de 80,30 % pour le papillon eri dans le nord-est de l'Inde. Cependant, Govindan et coll., (1981) ont enregistré une fécondité moyenne (280,55) du papillon eri dans l'état du Karnataka dans le sud de l'Inde, ce qui est 29,65 % de moins que la fécondité obtenue dans cette étude.

Plusieurs systèmes ont été testés pour déterminer les préférences de ponte dans les grainages de ver à soie non-mûrier. Pendant cette étude, la feuille de ponte cellulaire est le système préféré par rapport aux boîtes en carton, aux sacs en maille de nylon, aux Khorikas et aux tasses en faïence pour la ponte des œufs dans les conditions tropicales de l'Andhra Pradesh. Cependant, ces systèmes ont leurs propres mérites et démérites. Les boîtes en carton, qui sont le système préféré après les feuilles de ponte cellulaires ne peuvent pas être utilisées après la désinfection, ce qui entraîne des dépenses supplémentaires pour s'en procurer de nouvelles. Les cellules en plastique et les sacs en nylon dont la durabilité est plus longue peuvent être réutilisés après la désinfection. Le papillon eri préfère les positions verticales des systèmes par rapport au plan horizontal pour la ponte des œufs. Fujimoto (1951) et Jolly et coll., (1964) ont signalé que la topographie du substrat et le plan légèrement incliné du lieu de ponte entraînent une fécondité supérieure chez *Bombyx mori* L. La surface lisse des feuilles de ponte cellulaires et des boîtes en carton pourraient avoir influencer la tendance à pondre le maximum d'œufs, par comparaison aux surfaces rugueuses des autres systèmes. Les résultats obtenus sur la préférence de ponte sont les mêmes que ceux de Legay (1989), Gupta et coll., (1990), de Manjula Kumari et Geethabali (1991) et Singh (1998) chez *Bombyx mori* L. Nos résultats sont en contradiction avec ceux de Debaraj et coll., (2003) qui ont conclu que la texture du substrat n'influence pas la préférence de ponte du papillon eri dans les conditions tempérées du nord-est de l'Inde.

On peut en déduire que la feuille de ponte cellulaire est le système préféré et est adaptée pour la ponte, pour l'examen du papillon mère par la méthode chinoise de piqûre, pour la libération des papillons et pour la récolte des pontes, elle fait aussi économiser du temps et de la main d'œuvre. Cinq feuilles de ponte avec 20 femelles gestantes recouvertes chacune par des cellules peuvent être disposées sur une claie en bois (90 × 60 × 10 cm). Vingt claies de ce type peuvent être placées sur une grille en fer dans une pièce de ponte (6 × 4 m), ce qui permet d'avoir suffisamment d'espace pour disposer 8 casiers pour la production commerciale de graines. Cela minimise le besoin en espace et la perte d'œufs, qui survient souvent lorsque les œufs tombent sur le sol pendant la manipulation du système traditionnel des Khorikas. Ce système pourrait mieux convenir et être plus approprié pour procéder au maintien de la souche parentale et à des programmes de lignage.

DEVELOPMENT OF INTENSITY OF LEAF SPOT (*PHLOEOSPORA MACULANS*), DISEASE OF MULBERRY IN RELATION TO ABIOTIC FACTORS

TASNEEM N. TANKI, N. A. MUNSHI, M. A. ZARGAR, K. A. SAHAF & T. A. RAJA

Division of Sericulture, S.K. University of Agricultural Sciences and Technology, Mirgund,
P. Box No. 674; GPO-Srinagar, 190 001(J&K), India.

*The Jammu and Kashmir State plays an important role in the silk production at national level but unfortunately despite congenial climatic conditions the silk production in the state has drastically declined during last three decades. One of the factors attributed to decline in silk production is silkworm and mulberry diseases. Leaf spot disease of mulberry is one of the major foliar diseases caused by *Phloeospora maculans* (Bereng.) Allesch. A study was conducted to ascertain its peak period in response to abiotic factors*

*The correlation co-efficient between the response variable leaf spot disease intensity and abiotic factors were calculated in three varieties of mulberry viz., Botetul (*Morus indica*), Serpentine (*M. alba*) and Limoncina (*M. alba*). The rate of disease intensity has shown positive correlation with maximum and minimum temperature with varying degree of p-value. The relative humidity was statistically significant in all the three varieties. The disease intensity has shown negative correlation with rainfall. It is observed that intensity of disease increases from May to August in Botetul and Serpentine as both minimum and maximum temperature increase up to August. In Limoncina, intensity of disease increases up to September. After September and onwards the disease intensity slowed down. The disease intensity in Botetul increased from (3.91% to 43.66%), in Serpentine increased from (2.74 % to 59.45%) and intensity in Limoncina increased from (2.67% to 44.91%) with increase in temperature both minimum (10.80 to 17.00° C) and maximum (24.20 to 30.00° C) and relative humidity (66.00 to 74.00 %). The rainfall decreased from April to August (63.50 to 0.10 mm).*

Keywords: Abiotic factors, Mulberry, *Phloeospora maculans*,

INTRODUCTION

Leaf spot disease of mulberry (*Morus* spp.) caused by *Phloeospora maculans* (Bereng.) Allesch.(= *Septogloium mori*. Briosi and Cavera) has been one of the major problems in all the mulberry growing countries. Ivanof as early as 1926, reported that the disease causes severe injury to the leaves of black mulberry (*Morus nigra*) from Bulgaria. Later the disease was reported from Tashkent and Italy (Zaprometoff, 1928 and Masera,1933). Subsequently, the disease was studied in detail and was found to be prevalent in eastern United States, Great Britain, France, Germany and Australia (Wolf, 1935). In Western Australia first record of the disease was given and later the detail investigations on leaf spot disease of mulberry were conducted (Stewart, 1950).

The disease also stands reported from Harwan area of Kashmir by E. J. Butler as early as 1909 on *Morus alba*, which is also the first record of disease from India (Bilgrami *et al.*, 1979). Subsequently the disease has been reported by other workers (Munshi, 1986., Panday and Singh, 1989 and Tasneem, 2001). The survey conducted in the valley of Kashmir during 1999 revealed that the disease was prevalent in all districts with variable degree of disease incidence and intensity. The disease appears

in the month of May reaches its peak in August, decreases September onwards. Mean disease incidence and intensity for the valley is estimated as 41.44 and 24.41 percent respectively (Tanki *et al.*, 2004).

Various studies have been conducted by different workers on leaf spot disease of mulberry caused by *Cercospora moricola* (Cook.) its development and severity in relation to environmental factors under tropical conditions (Siddaramiah and Hedge, 1989). But, so far no systematic study has been conducted to correlate the disease development in relation to abiotic factors under temperate conditions prevailing in the Kashmir valley. Hence, an attempt has been made to study the influence of abiotic factors in relation to the severity of *P. maculans* prevailing in the mulberry fields. This information will be of help over all to pathologists as well as to rearers in formulating the control strategies of this disease in advance and will definitely help to minimize the crop loss.

MATERIAL AND METHODS

Fortnightly observations were recorded on three mulberry varieties viz., Botetul (*M. indica*), Serpentine (*M. alba*) and Limoncina (*M. alba*) in the field at Division of Sericulture, SKUAST-K. The observations were recorded for the seasonal occurrence right from leaf sprouting to leaf fall during the year 1998. The disease intensity was recorded on field plantation under natural inoculum from the month of April to November. From each genotype, three random samples, each consisting of three dwarf plants (10 year old) representing replications were selected and leaves from all branches were observed for intensity of disease. Assessment units were grouped into 0-V grade scale as per number of spots per leaf (Munshi *et al.*, 1987). The grades include, 0 = no infection, I = 1-5 spots, II = 6-10 spots III = 11-15 spots, IV = 16-20 spots and V = 21-coalesce spotting. The percent disease intensity was calculated as per the following formula:-

$$PDI = \frac{\sum \text{numerical values} \times \text{grades}}{\text{Total number of observations}} \times \frac{100}{\text{Maximum grade}}$$

In order to predict the leaf spot disease infestation we took three different varieties of mulberry viz., Botetul, Serpentine and Limoncina to ascertain influence of abiotic factors during April to October, a multiple regression has been fitted in the form of $y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_4 x_4$ where x_1 = maximum temperature, x_2 = minimum temperature, x_3 = relative humidity and x_4 = rainfall whereas, β_0 =constant and $\beta_1, \beta_2, \beta_3$, and β_4 are regression co-efficients.

RESULTS AND DISCUSSION

The monthwise meteorological data regarding maximum temperature (° C), minimum temperature (° C), relative humidity (%) and rainfall (mm) from April to October along with the intensity of leaf spot disease in three different varieties of mulberry are presented in Table I, Table II and Table III. It is observed that intensity of disease increases from May to August in Botetul and Serpentine as both minimum and maximum temperature increase up to August. In Limoncina intensity of disease increases up to September. After September and onwards the disease intensity slowed down. The disease intensity in Botetul increased from (3.91% to 43.66%), in Serpentine increased from (2.74 % to 59.45%) and intensity in Limoncina increased from (2.67% to 44.91%) with increase in temperature both minimum (10.80 to 17.00° C) and maximum (24.20 to 30.00° C) and relative humidity (66.00 to 74.00 %). The rainfall decreased from April to August (63.50 to 0.10 mm).

Table I. Seasonal occurrence of leaf spot disease of mulberry var. Botetul (*M. indica*) in relation to abiotic factors during 1998.

Tableau I. Présence saisonnière de la maladie de la tache de la feuille du mûrier sur la var. Botetul (*M. indica*) par rapport aux facteurs abiotiques en 1998.

Month	Intensity (y)	Max. Temp. (°C) x ₁	Min. Temp. (°C) x ₂	Relative humidity (%) x ₃	Rainfall (mm) x ₄
Mois	Intensité (y)	Temp. Max (°C) x ₁	Temp. Min. (°C) x ₂	Humidité relative (%) x ₃	Précipitations (mm) x ₄
April / Avril	0.00	19.70	6.70	69.00	156.60
May / Mai	3.91	24.20	10.80	66.00	63.50
June / Juin	13.34	27.20	13.30	65.00	38.20
July / Juillet	25.54	30.50	17.90	70.00	46.40
August / Août	43.66	30.00	17.00	74.00	0.10
September / Septembre	41.43	26.80	12.90	73.00	18.60
October / Octobre	28.35	23.80	6.30	72.00	16.40

Correlation co-efficient of Leaf spot disease rate with abiotic factors.

Coefficient de corrélation du taux de maladie de la tache de la feuille avec les facteurs abiotiques

Abiotic factors <i>Facteurs abiotiques</i>	Corr. Coefficient <i>Coefficient de corrélation</i>	p value <i>valeur p</i>
Max. Temp.	0.676	0.096
Min. Temp.	0.504	0.249
Relative humidity / <i>Humidité relative</i>	0.831	0.020
Rainfall / <i>Précipitations</i>	-0.816	0.25

Multiple regression line. / *Droite de regression multiple*

$$y = -77.96 + (-.115)x_1 + (0.262)x_2 + (0.599)x_3 + (-.573)x_4$$

$$R = 92.40\% \quad F = 19.855 \quad p = 0.047$$

The correlation co-efficient between the response variable leaf spot disease intensity and abiotic factors was calculated in all the three varieties. The rate of disease intensity has shown positive correlation with maximum temperature and minimum temperature with varying degree of p-value in all the three varieties, (any p-value less than 0.05 was taken to be statistically significant). The relative humidity was statistically significant in all the three varieties. The disease intensity has shown negative correlation with rainfall. The correlation was negative and statistically significant in Botetul and Serpentine.

The multiple regression analysis between intensity of leaf spot disease and abiotic factors showed a positive correlation in all the three varieties of Botetul, Serpentine and Limoncina. The correlation was statistically significant in Botetul ($F = 19.855$, $p = 0.047$) and Serpentine ($F = 58.33$, $p = 0.047$) while as in Limoncina it was ($F = 7.756$, $p = 0.194$). The co-efficient of determination (R) was recorded

to be 92.40 %, 97.50 % and 87.80 %, in Botetul, Serpentine and Limoncina respectively. The values being moderately high indicates that a prediction on leaf spot disease intensity can be made from prevailing abiotic conditions. Thus on the basis of multiple regression equation with respect to maximum temperature, minimum temperature, relative humidity and rainfall, it will certainly help in forecasting leaf spot disease infestation and hence implementation of its management practice at right period will help to save the Sericulture industry from this menace.

Table II. Seasonal occurrence of Leaf spot disease of mulberry var. Serpentine (*M. alba*) in relation to abiotic factors during 1998.

Tableau II. Présence saisonnière de la maladie de la tache de la feuille sur la var. de mûrier Serpentine (*M. alba*) par rapport aux facteurs abiotiques en 1998.

Month	Intensity (y)	Max. Temp. (° C) x ₁	Min. Temp. (° C) x ₂	Relative humidity (%) x ₃	Rainfall (mm) x ₄
Mois	Intensité (y)	Temp. Max. (° C) x ₁	Temp. Min. (° C) x ₂	Humidité relative (%) x ₃	Précipitations (mm) x ₄
April / Avril	0.00	19.70	6.70	69.00	156.60
May / Mai	2.74	24.20	10.80	66.00	63.50
June / Juin	14.52	27.20	13.30	65.00	38.20
July / Juillet	40.24	30.50	17.90	70.00	46.40
August / Août	59.45	30.00	17.00	74.00	0.10
September / Septembre	48.65	26.80	12.90	73.00	18.60
October / Octobre	33.25	23.80	6.30	72.00	16.40

Correlation co-efficient of Leaf spot disease rate with abiotic factors. / Coefficient de corrélation de la maladie de la tache de la feuille avec les facteurs abiotiques.

Abiotic factors/ Facteurs abiotiques	Corr. Coefficient Coefficient de corr.	p-value Valeur p
Max. Temp.	0.766	0.047
Min. Temp.	0.601	0.153
Relative humidity / Humidité relative	0.830	0.021
Rainfall / Précipitations	-0.776	0.040

Multiple regression line / Droite de régression multiple

$$y = -337.12 + (.463) x_1 + (-.017) x_2 + (0.633) x_3 + (-0.169) x_4$$

$$R = 97.50 \quad F = 58.331 \quad p = 0.017$$

Table III. Seasonal occurrence of leaf spot disease of mulberry var. Limoncina (*M. alba*) in relation to abiotic factors during 1998.

Tableau III. Présence saisonnière de la maladie de la tache de la feuille sur la variété de mûrier Limoncina (*M. alba*) en rapport avec les facteurs abiotiques en 1998.

Month	Intensity (y)	Max. Temp. (° C) x ₁	Min. Temp. (° C) x ₂	Relative humidity (%) x ₃	Rainfall (mm) x ₄
Mois	Intensité (y)	Temp. max. (° C) x ₁	Temp. min. (° C) x ₂	Humidité relative (%) x ₃	Précipitations (mm) x ₄
April / Avril	0.00	19.70	6.70	69.00	156.60
May / Mai	2.67	24.20	10.80	66.00	63.50
June / Juin	8.69	27.20	13.30	65.00	38.20
July / Juillet	27.96	30.50	17.90	70.00	46.40
August / Août	44.91	30.00	17.00	74.00	0.10
September / Septembre	37.36	26.80	12.90	73.00	18.60
October / Octobre	23.66	23.80	6.30	72.00	16.40

Correlation co-efficient of Leaf spot disease rate with abiotic factors. / Coefficient de corrélation du taux de maladie de la tache de la feuille avec les facteurs abiotiques.

Abiotic factors / Facteurs abiotiques	Corr. Coefficient Coefficient de corr.	p-value
Max. Temp.	0.518° C	0.234
Min. Temp.	0.421° C	0.346
Relative humidity / Humidité relative	0.770° C	0.043
Rainfall / Précipitations	- 0.634° C	0.126

Multiple regression line / Droite de régression multiple

$$Y = -101.005 + (-1.531) x_1 + (1.343) x_2 + (0.615) x_3 + (-0.839) x_4$$

$$R = 87.80 \quad F = 7.756 \quad p = 0.194$$

The observations recorded revealed that disease manifests itself from the month of May and reached its maximum intensity during the month of August with 43.66, 59.45 and 44.91 percent in mulberry varieties Botetul, Serpentine and Limoncina respectively, thereafter, there was a slight decrease in intensity in all the three varieties. This indicated that disease has followed normal growth curve and significantly high weather conditions prevailing during the months of August and September viz., high temperature and high humidity favours high disease intensity. The positive correlation with maximum temperature and minimum temperature under Kashmir conditions is contrary to the findings under tropical conditions where a negative correlation has been observed with maximum temperature but positive correlation with minimum temperature (Siddaramaiah and Hedge, 1989). Significantly high correlation with relative humidity are encouraging results as these

findings are supported by the similar studies conducted on leaf spot disease under tropical conditions (Siddaramaiah and Hedge, 1989). Rainfall has shown negative correlation with all the three varieties, however it plays a major role in leaf spot disease dissemination of conidia by rain splash especially during the month of April and May (Sukumar and Ramalingam, 1981).

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are thankful to Vice-Chancellor SKUAST-K for his constant encouragement and to the Head of the Division of Sericulture for providing the facilities to Professor M.A. Khan Head Division of forestry for guidance during the present studies

REFERENCES

- BILGRAMY K.S., JAMALUDDIN & RIZWI M. A.(1979) Fungi of India.Part-1.Today and Tomorrows Printers & Publishers, New Delhi, pp.467.
- IVANOF B. (1926). Cryptogamic parasites of cultivated plants recorded in the course of the last five years (1921-1925).Agricultural Information Periodical Bulletin,Sofia7(3):14-17.
- MASERA E.(1934). Observation on the mulberry 'Scourge'. Ann. Tech. Agrar., Rome, 6: 178-184.
- MUNSHI N. A., TANKI T. N.,ZARGAR M. A.,DAS B. C.(1987). Field evaluation of fungicides against leaf spot disease of mulberry in Kashmir. Ind. J. Seri. 26(2) 86- 89. PANDAY P .C and SUJAN SINGH.(1989). Three important diseases of mulberry in India. Ind. J. Fores. 12(4): 255- 258.
- SIDDARAMIAH A.L. and HEGDE R.K. (1989). Development of severity of *Cercospora* leaf spot disease of mulberry in relation to Environmental factors. Mysore J. Agric. Science. 23: 327-331.
- STEWART R. E (1950). Investigation on the leaf spot disease of black mulberries caused by *Septogloeum mori* (Briosi and Cavera). Jour. Royal Society Western Australia 34: 87-104.
- SUKUMAR J & RAMALINGAM A. (1981).Splash dispersal in *Cercospora moricola*. Science and Culture. 47:173-175.
- TASNEEM K. (2001).Studies on the leaf spot disease of mulberry (*Morus spp.*). Thesis submitted to SKUAST-Kfor the award of Ph.D p-119.
- TANKI, T.N., MUNSHI, N.A. & KHAN, M.A (2004) Seasonal occurrence of leaf spot disease (*Phloeospora maculans* (Bereng) Allesch. of mulberry (*Morus spp*) in Kashmir *SKUAST-J Res.* 6:194-199. (2004).
- WOLF F.A.(1935). The perfect stage of leaf spot fungus on Red Mulberry.Jour. Elisha Michell Scie. Society. 1;163-166.
- ZAPROMETOFF N. G. & MIKHAILOFF E. N.(1937). Mulberry diseases.Trans. Central-Asian Scie. Reas Inst. Seri. Tashkent. 14: 50 p.

DEVELOPPEMENT DE L'INTENSITE DE LA MALADIE DE LA TACHE DE LA FEUILLE (*PHLOEOSPORA MACULANS*) DU MURIER EN FONCTION DES FACTEURS ABIOTIQUES

TASNEEM N. TANKI, N. A. MUNSHI, M. A. ZARGAR, K. A. SAHAF & T. A. RAJA

Division of Sericulture, S. K. University of Agricultural Sciences and Technology, Mirgund,
P. Box no. 674 ; GPO – Srinagar, 190 001 (J & K), Inde.

*L'Etat du Jammu et Cachemire joue un rôle important dans la production de soie au niveau national, mais malheureusement malgré des conditions climatiques propices, la production de soie dans l'état a radicalement diminué au cours des trois dernières décennies. L'un des facteurs auquel on attribue le déclin de la production de soie sont les maladies du ver à soie et du mûrier. La maladie de la tache de la feuille du mûrier est l'une des principales maladies foliaires provoquées par *Phloeospora maculans* (Bereng.) Allesch. Une étude a été réalisée pour évaluer la période où elle atteint son intensité maximum en réponse aux facteurs abiotiques.*

*On a calculé le coefficient de corrélation entre l'intensité de la maladie de la tache de la feuille et les facteurs abiotiques chez trois variétés de mûrier, c'est-à-dire Botetul (*Morus indica*), Serpentine (*M. alba*) et Limoncina (*M. alba*). Le taux d'intensité de la maladie montre une corrélation positive avec la température maximum et minimum, à un degré différent pour la valeur p. L'humidité relative est significative sur le plan statistique chez les trois variétés. L'intensité de la maladie présente une corrélation négative avec les précipitations. On observe que l'intensité de la maladie augmente de mai à août chez Botetul et Serpentine, alors que la température minimum et maximum augmentent jusqu'en août. Chez Limoncina, l'intensité de la maladie augmente jusqu'en septembre. A partir de septembre, l'intensité de la maladie diminue. L'intensité de la maladie chez Botetul augmente de 3,91 % à 43,66 %, chez Serpentine de 2,74 à 59,45 % et chez Limoncina de 2,67 % à 44,91 % avec l'augmentation de la température minimum (10,80 à 17° C) et maximum (24,20 à 30° C) et de l'humidité relative (66 à 74 %). Les précipitations baissent d'avril à août (63,50 à 0,10 mm).*

INTRODUCTION

La maladie de la tache de la feuille du mûrier (*Morus* spp.) provoquée par *Phloeospora maculans* (Bereng.) Allesch. (= *Septogloium mori* Briosi et Cavera) est l'un des principaux problèmes dans tous les pays qui cultivent le mûrier. Dès 1926, Ivanof a signalé que la maladie entraîne des lésions sévères aux feuilles du mûrier noir (*Morus nigra*) de Bulgarie. Plus tard, on a signalé la maladie à Tashkent et en Italie (Zaprometoff, 1928 et Masera, 1933). Par la suite, la maladie a été étudiée en détail et elle est courante dans l'est des Etats-Unis, en Grande-Bretagne, en France, en Allemagne et en Australie (Wolf, 1935). On a enregistré le premier signalement de la maladie dans l'ouest de l'Australie et plus tard des études détaillées ont été réalisées sur la maladie de la tache de la feuille du mûrier (Stewart, 1950).

La maladie a aussi été signalée dans la zone d'Harwan dans le Cachemire par E. J. Butler dès 1909 sur *Morus alba*, qui est aussi le premier signalement de la maladie en Inde (Bilgrami et coll., 1979). Plus tard, d'autres chercheurs ont signalé la maladie (Munshi, 1986 ; Panday et Singh, 1989 et Tasneem, 2001). L'étude réalisée dans la vallée du Cachemire en 1999 a révélé que la maladie est répandue dans toutes les zones, avec un degré variable d'incidence et d'intensité. La maladie apparaît

pendant le mois de mai, atteint son pic en août et baisse à partir de septembre. On estime l'incidence et l'intensité moyennes de la maladie pour la vallée à respectivement 41,44 et 24,41 % (Tanki et coll., 2004).

Diverses études ont été réalisées par différents chercheurs sur la maladie de la tache du mûrier provoquée par *Cercospora moricola* (Cook), sur son développement et sa sévérité en rapport avec les facteurs environnementaux dans des conditions tropicales (Siddaramiah et Hedge, 1989). Mais, jusqu'à présent aucune étude systématique n'a été réalisée pour corréler le développement de la maladie aux facteurs abiotiques dans les conditions tempérées qui règnent dans la vallée du Cachemire. On a donc essayé d'étudier l'influence des facteurs abiotiques en rapport avec la sévérité de *P. maculans*, qui est présente dans les muraies. Ces informations aideront les pathologistes ainsi que les éleveurs à formuler des stratégies de lutte contre cette maladie à l'avance et contribueront assurément à minimiser les pertes de récolte.

MATERIELS ET METHODES

On enregistre les observations tous les quinze jours sur les trois variétés de mûrier, c'est-à-dire Botetul (*M. indica*), Serpentine (*M. alba*) et Limoncina (*M. alba*) sur le terrain à la Section de Sériciculture du SKUAST-K. On enregistre les observations pour la présence saisonnière dès le débourrage des feuilles jusqu'à la chute des feuilles, pendant l'année 1998. On enregistre l'intensité de la maladie sur la plantation de terrain sous un inoculum naturel, du mois d'avril à novembre. On sélectionne trois échantillons aléatoires pour chaque génotype, constitués chacun de trois plants nains (de dix ans) représentant les répétitions et on observe les feuilles de toutes les branches par rapport à l'intensité de la maladie. On regroupe les unités évaluées selon l'échelle de classement de 0 à V d'après le nombre de taches par feuille (Munshi et coll., 1987). Les classements comprennent 0 = pas d'infestation, I = 1 à 5 taches, II = 6 à 10 taches, III = 11 – 15 taches, IV = 16-20 taches et V = 21 taches regroupées.

On calcule le pourcentage d'incidence de la maladie d'après la formule suivante :

$$PDI = \frac{\sum \text{Valeurs numériques} \times \text{classements}}{\text{Nbre total d' observations}} \times \frac{100}{\text{Classement maximum}}$$

Pour prédire l'infestation par la maladie de la tache de la feuille, nous avons pris trois variétés de mûrier différentes, c'est-à-dire Botetul, Serpentine et Limoncina afin d'évaluer l'influence des facteurs abiotiques d'avril à octobre ; nous avons mis en place une régression multiple sous la forme $y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_4 x_4$ où x_1 = température maximum, x_2 = température minimum, x_3 = humidité relative et x_4 = précipitations tandis que β_0 = constante et β_1 , β_2 , β_3 et β_4 sont les coefficients de régression

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données météorologiques mensuelles concernant la température maximum (° C), la température minimum (° C), l'humidité relative (%) et les précipitations (mm) d'avril à octobre et l'intensité de la maladie de la tache de la feuille chez les trois différentes variétés de mûrier sont présentées dans les Tableaux I, II et III. On observe que l'intensité de la maladie augmente de mai à août chez Botetul et Serpentine, alors que la température minimum et maximum augmentent jusqu'en août. Chez Limoncina l'intensité de la maladie augmente jusqu'en septembre. A partir de septembre, l'intensité de la maladie ralentit. L'intensité de la maladie chez Botetul augmente de 3,91 à 43,66 %,

chez *Serpentine* de 2,74 à 59,45 % et chez *Limoncina* de 2,67 % à 44,91 % avec l'augmentation de la température minimum (10,80 à 17° C) et maximum (24,20 à 30° C) et de l'humidité relative (66 à 74 %). Les précipitations baissent d'avril à août (63,50 à 0,10 mm).

On calcule le coefficient de corrélation entre la variable de réponse de la maladie de la tache de la feuille et les facteurs abiotiques chez les trois variétés. Le taux d'intensité de la maladie montre une corrélation positive avec la température maximum et minimum, avec un degré variable de la valeur p chez les trois variétés (on considère que n'importe quelle valeur p inférieure à 0,05 est significative sur le plan statistique). L'humidité relative est statistiquement significative chez les trois variétés. L'intensité de la maladie présente une corrélation négative avec les précipitations. La corrélation est négative et significative sur le plan statistique chez *Botetul* et *Serpentine*.

L'analyse de régression multiple entre l'intensité de la maladie de la tache de la feuille et les facteurs abiotiques montre une corrélation positive chez les trois variétés *Botetul*, *Serpentine* et *Limoncina*. La corrélation est significative sur le plan statistique chez *Botetul* ($F = 19,855$, $p = 0,047$) et *Serpentine* ($F = 58,33$, $p = 0,047$), tandis que chez *Limoncina* elle est de $F = 7,756$, $p = 0,194$. On enregistre que le coefficient de détermination (R) est de 92,40 %, 97,50 % et de 87,80 % chez respectivement *Botetul*, *Serpentine* et *Limoncina*. Comme les valeurs sont modérément élevées, cela indique qu'on peut prédire l'intensité de la maladie de la tache de la feuille à partir des conditions abiotiques ambiantes. Ainsi, sur la base de l'équation de régression multiple par rapport à la température maximum, à la température minimum, à l'humidité relative et aux précipitations, il sera possible de prévoir l'infestation par la maladie de la tache de la feuille et donc de mettre en place des pratiques de lutte à la bonne période, ce qui contribuera à préserver l'industrie séricicole de cette menace.

Les observations enregistrées révèlent que la maladie se manifeste à partir du mois de mai et atteint son intensité maximum pendant le mois d'août avec 43,66 %, 59,45 et 44,91 % chez respectivement les variétés de mûrier, *Botetul*, *Serpentine* et *Limoncina*, ensuite il y a une légère baisse de l'intensité chez les trois variétés. Cela indique que la maladie a suivi une courbe de croissance normale et les conditions climatiques significativement élevées qui sont présentes pendant le mois d'août et de septembre, c'est-à-dire la température élevée et l'humidité élevée favorisent l'intensité élevée de la maladie. La corrélation positive avec la température maximum et la température minimum dans les conditions du Cachemire est contraire aux observations dans les conditions tropicales, où on observe une corrélation négative avec la température maximum, mais une corrélation positive avec la température minimum (Siddaramaiah et Hedge, 1989). La corrélation significativement élevée avec l'humidité relative est un résultat encourageant, puisque ce résultat est confirmé par des études similaires réalisées sur la maladie de la tache de la feuille dans des conditions tropicales (Siddaramaiah et Hedge, 1989). Les précipitations donnent une corrélation négative avec les trois variétés, cependant, elles jouent un rôle principal dans la dissémination des conidies par les éclaboussures de la pluie, surtout pendant les mois d'avril et de mai (Sukumar et Ramalingam, 1981).

EFFECT OF COCOON COOKING CONDITIONS ON REELING PERFORMANCE AND QUALITY CHARACTERISTICS OF RAW SILK OF INDIAN BIVOLTINE HYBRID COCOONS

SUBHAS V. NAIK^{*1}, PRAKASH Y NAIK¹, HANUMANTH NAIK²,
B. M. MAHADEVIAH³ AND S. T. VENU³

1. Silk Conditioning Testing House, CSTRI, Central Silk Board, Near Govt. Cocoon Market, Dharmavaram – 515671, Andhra Pradesh, India
2. Govt. Sri Krishnarajendra Silver Jubilee Technological Institute, K. R. Circle, Bangalore – 560 001
3. Central Silk Technological Research Institute, Central Silk Board, BTM Layout, Bangalore – 560 068.

The influence of cocoon cooking conditions for floating, semi-sunken and sunken system of reeling on reeling performance and quality characteristics of raw silk of Bivoltine hybrid cocoons has been studied using pressurized circular cocoon cooking machine of CSTRI. It is observed that cocoon cooking condition has a significant influence on both reeling performance and quality characteristics of raw silk. Cocoon cooking for sunken system of reeling has resulted in significantly better reelability, raw silk recovery and quality of silk viz. neatness, cleanness and elongation as compared to the other two conditions of cocoon cooking. From the results it is observed that cocoon cooking for floating system of reeling has affected the reelability, raw silk recovery, neatness, cleanness, elongation of raw silk. Results indicate that cocoon cooking parameters have a significant influence on water absorption by the cocoon, cocoon shell and cocoon cooking condition, which in turn influences reeling performance and quality characteristics of raw silk.

Keywords: Floating, Semi-sunken, Sunken system, Reelability, Neatness, Cleanness

INTRODUCTION

Cocoon cooking is an important process in raw silk reeling which plays a decisive role on reeling performance of cocoons and quality of raw silk. In order to achieve uniform swelling and softening of Sericin of all the filament layers of cocoon shell, cocoon cooking is carried out in six stages. Cocoon cooking process decides the water absorption in the cocoon and cocoon cooking condition. Studies have been conducted in Japan (Shimazaki, 1961, 1962; Yoshiro Masogo, 1968) on cocoon cooking with Bivoltine hybrid cocoons of Japanese origin. Takabayashi (1985) has suggested optimum values of cocoon cooking degree and water content in the cocoon shell for Bivoltine hybrid cocoons of Japanese origin. However, information on the influence of cocoon cooking conditions on floating, semi-sunken and sunken systems of reeling on reeling performance and quality of raw silk, particularly with reference to Indian Bivoltine hybrid cocoons is scanty.

The present study has focused on the effect of cocoon cooking conditions for floating, semi-sunken and sunken systems of reeling on cocoon cooking degree, reeling performance and quality characteristics of raw silk of Indian Bivoltine hybrid cocoons.

* Author to whom correspondence may be addressed

MATERIALS AND METHODS

Raw Material:

Bivoltine hybrid cocoons (CSR₂ × CSR₄) purchased from the Government. Cocoon markets were used for the studies.

Experimental design:

The experimental design varied cooking conditions viz. open pan and pressurized cooking.

Cocoon drying conditions:

Cocoons were hot air dried to the optimum level using a temperature profile of 115°C to 55°C for four and half hours in a batch type drier.

Cocoon Cooking:

Cocoon cooking was carried out using open single pan and CSTRI batch type pressurized circular cocoon cooking machine for floating, semi-sunken, sunken system of reeling as per the design of experiment.

Cocoon cooking for floating system of reeling:

In order to achieve cocoon cooking conditions for floating system of reeling, the cocoons were cooked in a single pan at 95° C temperature for about 3 minutes.

Cocoon cooking for semi-sunken and sunken system of reeling:

In order to achieve cocoon cooking conditions for semi-sunken system and sunken system of reeling the cocoons were cooked in the CSTRI batch type pressurized circular cocoon cooking machine. The temperature and duration adopted was as below.

	Semi-sunken system		Sunken system	
	Temp. (° C)	Duration (min)	Temp. (° C)	Duration (min)
i. Retting condition	75	1.0	75	1.5
ii. High temperature (steam) treatment	90	1.5	90	3.0
iii. Low temperature water permeation treatment	75	1.0	75	1.5
iv. Steam cooking	96	1.0	97	3.0
v. Adjustment treatment profile				
Initial water temperature	96	1.0	97	1.0
Gradual reduction in water temperature	96 to 75	4.0	97 to 75	5.0
vi. Finishing treatment	35	0.5	35	1.0

Brushing :

Cooked cocoons were brushed in hot water at 80°C.

Reeling conditions:

The cocoons were reeled on CSTRI Multiend reeling machine adopting 100 mtrs/min reeling speed, 8 cms croissure length, 40° C basin water temperature and 250µ hole CSTRI reeling buttons.

Re-reeling:

Small reels were soaked in water using small reel vacuum permeation chamber and then re-reeled on CSTRI closed type re-reeling machine with re-reeling speed of 225 rpm, 40°C temperature and 45% RH in re-reeling machine.

Water quality:

Water having 7.2 pH, 85 ppm Hardness and 36 ppm Alkalinity was used for the study.

Cocoon cooking degree:

In order to evaluate the cocoon cooking conditions the water content in the cooked cocoons and cocoons shell was measured using the following formulae

$$\text{Cocoon cooking degree} = \frac{\text{Cooked cocoon weight}}{\text{Dry cocoon weight}}$$

$$\text{Water absorption in cocoons shell (\%)} = \frac{\text{Cooked shell weight} - \text{Dry shell weight}}{\text{Dry shell weight}} \times 100$$

Degumming loss of raw silk:

In order to evaluate the gum loss, Raw silk samples were subjected to boil - off loss test following CSTRI standard procedure.

Raw silk testing:

The raw silk samples were tested for Cleanness, Neatness, Low Neatness characteristics using Seriplane tester and Tenacity and Elongation of raw silk were tested using Serigraph adopting ISA procedure.

Data Analysis:

The data collected were statistically analysed.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Reeling characteristics:

The average results of cocoon cooking conditions on cocoon cooking degree, water content in cocoon shell and reeling characteristics are presented in Table I and II and Figure 1 to 3.

Reelability and Non-broken filament length:

From the results (Table I & II) it is observed that cocoon cooking condition has a significant (at 1 % level) influence on reelability and non-broken filament length of cocoons. Cocoon cooking conditions for sunken and semi-sunken system of reeling have resulted in significantly better reelability and non-broken filament length of cocoons (Table I) as compared to cocoon cooking conditions for floating system of reeling and this is attributed to better and uniform softening and

swelling of sericin of all cocoon filament layers of cocoon shell whereas reduction in reelability and non-broken filament length of cocoons in the other case is attributed to under cooking of cocoons.

It is to be noted that swelling and softening of sericin is caused by a combination of heat and the amount of water absorbed by the cocoon layers in water permeation treatment of cocoon cooking and properties of water used.

After the entry of suitable quantity of water into the cocoon and the cocoon shell in the pre-treatment zone of cocoon cooking, required heat energy is very essential in the cooking zone to cook the cocoons shell layers uniformly. Otherwise cooking will tend to be under or uneven. Thus in cocoon cooking for floating system of reeling (often known as single pan cooking), there will be no water permeation into the cocoons before cocoon cooking treatment as cocoons are directly treated at one temperature alone. In the case of pressurized cooking of cocoons, cocoons are cooked following cocoon cooking principle using six treatments of cocoon cooking to achieve conditions for semi-sunken and sunken system. Due to this sericin of all the filament layers of cocoon shell is swollen and softened uniformly to the required level leading to better reelability and hence higher non-broken filament length of cocoons.

In the case of cocoon cooking for sunken system of reeling, the cocoons are completely filled with water and tend to sink in the reeling basin water while reeling. Due to this swollen and softened condition of the sericin is maintained throughout the process of reeling and unwinding of cocoon filament length is very smooth with minimum cocoon filament unwinding tension (Takabayashi, 1996) leading to better reelability.

Table 1. Influence of cocoon cooking conditions on reeling characteristics (Average results).

Tableau 1. Influence des conditions de cuisson des cocons sur les caractéristiques de dévidage (résultats moyens).

Reeling characteristics	Floating System	Semi-sunken System	Sunken System
<i>Caractéristiques de dévidage</i>	<i>Système Flottant</i>	<i>Système semi-immergé</i>	<i>Système immergé</i>
Reelability / Dévidabilité	82.5	86.8	89.4
Average filament length (m) <i>Longueur moyenne du filament (m)</i>	953	996	994
Non broken filament length (m) <i>Longueur du filament sans rupture (m)</i>	782	862	876
Renditta / Rendement à la bassine	5.9	5.6	5.5
Raw silk recovery (%) / Rentrée de soie grège (%)	76.6	79.9	81.8
Waste % on silk weight <i>% de déchets par rapport au poids de la soie</i>	12.1	9.4	9.3
Single pelade waste (g) / Déchets d'une pèlette	0.19	0.017	0.016

Table II. Anova – Cocoon Cooking Degree and Reeling characteristics.**Tableau II. Anova – Degré de cuisson des cocons et caractéristiques de dévidage.**

		Sum of Square	Degree of freedom	Mean square	F Value	Sig.
		<i>Somme des Carrés</i>	<i>Degrés de liberté</i>	<i>Carré moyen</i>	<i>Valeur F</i>	
Cocoon cooking degree <i>Degré de cuisson des cocons</i>	Between groups <i>Entre les groupes</i>	108.72	2	54.361	54.191	0.00
Water absorption by cocoon shell <i>Absorption de l'eau par la coque soyeuse</i>	Between groups <i>Entre les groupes</i>	350907.76	2	175453.882	28.9	0.00
Reelability (%) <i>Dévidabilité (%)</i>	Between groups <i>Entre les groupes</i>	97.68	2	48.84	7.26	0.01
Average filament length (m) <i>Longueur moyenne du filament (m)</i>	Between groups <i>Entre les groupes</i>	4660.67	2	2330.33	15.65	0.00
Non broken filament length (m) <i>Longueur du filament sans rupture (m)</i>	Between groups <i>Entre les groupes</i>	20373.17	2	10186.58	38.27	0.00
Renditta / Rendement à la bassine	Between groups <i>Entre les groupes</i>	0.29	2	0.14	7.16	0.01
Raw silk recovery (%) <i>Rentrée de soie grège (%)</i>	Between groups <i>Entre les groupes</i>	56.63	2	28.32	6.96	0.01
Waste % on silk wt <i>% de déchets par rapport au poids de la soie</i>	Between groups <i>Entre les groupes</i>	20.13	2	10.07	18.85	0.00

It may be observed that cocoon cooking degree and water absorption in the cocoon shell is significantly better in the case of sunken and semi-sunken system of cocoon cooking as compared to floating system (Figures 1 and 2).

Average filament length of cocoons:

Results indicate that (Table I) cocoon cooking conditions for sunken and semi-sunken system of reeling have resulted in better filament length of cocoons as compared to the conditions for floating system of reeling. Influence of cocoon cooking condition on average filament length of cocoons is significant at 1 % level (Table II).

Better filament length of cocoons in the case of cocoon cooking conditions for sunken and semi-sunken system of reeling is attributed to uniform cooking of cocoons to the required level leading to less waste generation during cooking leading to better filament length.

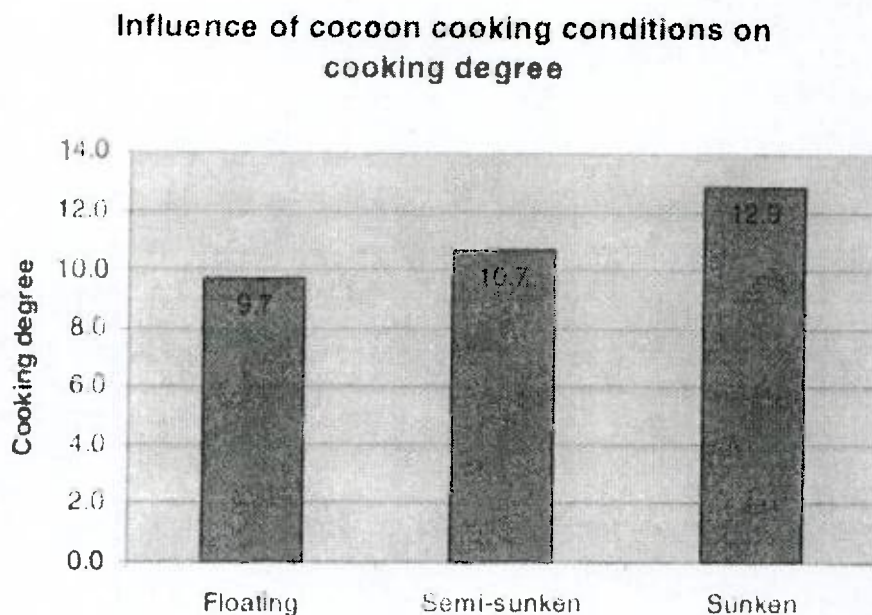


Fig. 1. Influence of cocoon cooking conditions on cocoon cooking degree.

Fig. 1. Influence des conditions de cuisson des cocons sur le degré de cuisson des cocons.

Raw silk recovery, renditta and waste %:

It is observed that (Table II) cocoon cooking condition has a significant (at 1% level) influence on raw silk recovery, renditta (raw silk yield) and generation of waste. Results (Table I) indicate that cocoon cooking conditions for sunken system of reeling has resulted in significantly better raw silk recovery and hence less renditta and brushing and picking waste as compared to other two cooking conditions, semi-sunken system being better than the floating system.

It may be observed (Figure 3) that degumming loss % of raw silk is highest in case of floating system followed by semi-sunken and least in the case of sunken system. This leads us to the point that Sericin dissolution is more (by about 2%) during cooking for sunken system of reeling as compared to that floating system. In spite of this, raw silk recovery is better in the case of cocoon cooking for sunken system of reeling as compared to that of floating system and this can be attributed to significantly less cooking and reeling waste generation in the case of sunken system.

Better raw silk recovery and hence less renditta in the case of sunken and semi-sunken systems is attributed to uniform cooking of all the filament layers of cocoon shell to the required level. Uniform cooking of cocoons has resulted in to better reelability and reduced waste % and pelade waste (Table I). Significant reduction in raw silk recovery and increase in renditta and waste % in the case of floating system is attributed to under and uneven cooking of cocoons. It may be observed (Table I) that pelade waste is significantly higher in the case of floating system of cocoon cooking as compared to the other two systems.

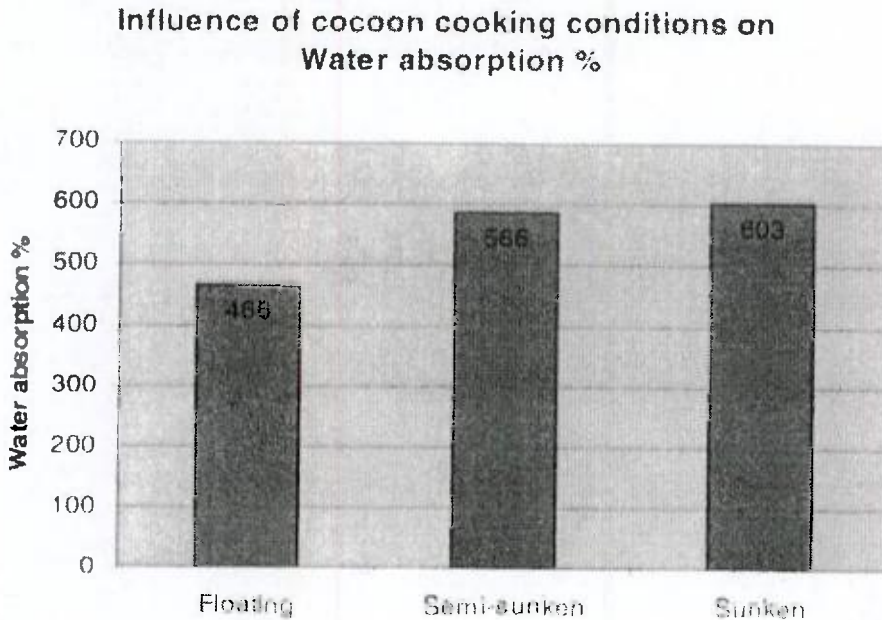


Fig. 2. Influence of cocoon cooking conditions on water absorption by the cocoon shell.

Fig. 2. Influence des conditions de cuisson des cocons sur l'absorption de l'eau par la coque soyeuse.

Quality Characteristics:

The average results of influence of cocoon cooking condition on quality characteristics of raw silk are presented in Table III to IV.

Neatness, Low-Neatness and Cleanness of raw silk:

It is observed (Table III) that cocoon cooking conditions for sunken system and semi-sunken system of reeling have resulted in significantly better neatness, low-neatness and cleanness of raw silk as compared to floating system. Results (Table III) indicate that cocoon cooking for floating system of reeling has affected neatness, low-neatness and cleanness of raw silk significantly. Influence of cocoon cooking conditions on neatness and low-neatness of raw silk is significant at 1% level, whereas the same on the cleanness of raw silk is significant at 5% level. (Table IV).

From the multiple comparison analysis (Table V) it is observed that difference in the neatness, low-neatness and cleanness of raw silk between the cocoon cooking conditions for floating and semi-sunken system, floating and sunken system of reeling is significant at 1% level. Further, the difference in these characteristics of raw silk between semi-sunken and sunken system is insignificant.

Table III. Influence of cocoon cooking condition on quality characteristics of raw silk (Average results)**Tableau III. Influence des conditions de cuisson des cocons sur les caractéristiques de qualité de la soie grège (résultats moyens).**

Cocoon cooking condition	Neatness (%)	Low neatness (%)	Cleanness (%)	Tenacity g/d	Elongation (%)
<i>Condition de cuisson des cocons</i>	<i>Netteté (%)</i>	<i>Netteté minimum (%)</i>	<i>Propreté (%)</i>	<i>Résistance (g/d)</i>	<i>Allongement (%)</i>
Floating system / <i>Système flottant</i>	89	87	94	3.9	20
Semi-sunken system / <i>Système semi-immergé</i>	95	93	97	3.9	22
Sunken system / <i>Système immergé</i>	97	95	98	3.9	23

Table IV. Anova – Quality characteristics of raw silk.**Tableau IV. Anova – Caractéristiques de qualité de la soie grège.**

		Sum of Squares	Degree of freedom	Mean Square	F Value	Significance
		<i>Somme des carrés</i>	<i>Degrés de liberté</i>	<i>Carré moyen</i>	<i>Valeur F</i>	<i>Signification</i>
Neatness / <i>Netteté</i>	Between groups / <i>Entre les groupes</i>	112.17	2	56.083	9.946	0.01
Low neatness / <i>Netteté minimum</i>	Between groups / <i>Entre les groupes</i>	123.17	2	61.583	13.275	0.00
Cleanness / <i>Propreté</i>	Between groups / <i>Entre les groupes</i>	26.00	2	13	4.875	0.04

Significantly better neatness, low-neatness and cleanness of raw silk in the case of sunken system and semi-sunken system is attributed to the uniform cooking of all the filament layers of cocoons shell to the required level.

Significant reduction in neatness, low-neatness and cleanness of raw silk in the case of floating system is attributed to under/uneven cooking of cocoons. It is to be noted that under cooking leads to insufficient softening of the cocoon filament layers, particularly at the cross over points leading to occurrence of neatness and cleanness defects in the yarn (Subhas *et al.*, 2003).

Table V. Statistical analysis of multiple comparisons.

Tableau V. Analyse statistique des comparaisons multiples.

Dependent Variable	Cocoon cooking condition (I)	Cocoon cooking condition (J)	Mean Difference (I - J)	Std error	Significance
<i>Variable dépendante</i>	<i>Condition de cuisson des cocons (I)</i>	<i>Conditions de cuisson des cocons (J)</i>	<i>Différence moyenne (I-J)</i>	<i>Ecart type</i>	<i>Signification</i>
Neatness (%) <i>Netteté (%)</i>	Floating system <i>Système flottant</i>	Semi-sunken system <i>Système semi-immergé</i>	- 5.25**	1.679	0.012
	Floating system <i>Système flottant</i>	Sunken system <i>Système immergé</i>	- 7.25**	1.679	0.002
	Semi-sunken system <i>Système semi-immergé</i>	Sunken system <i>Système immergé</i>	- 2	1.679	0.264
Low neatness (%) <i>Netteté minimum (%)</i>	Floating system <i>Système flottant</i>	Semi-sunken system <i>Système semi-immergé</i>	- 5.75**	1.523	0.004
	Floating system <i>Système flottant</i>	Sunken system <i>Système immergé</i>	- 7.50**	1.523	0.001
	Semi-sunken system <i>Système semi-immergé</i>	Sunken system <i>Système immergé</i>	- 1.75	1.523	0.28
Cleanness (%) <i>Propreté (%)</i>	Floating system <i>Système flottant</i>	Semi-sunken system <i>Système semi-immergé</i>	- 2.5	1.155	0.059
	Floating system <i>Système flottant</i>	Sunken system <i>Système immergé</i>	- 3.50**	1.155	0.014
	Semi-sunken system <i>Système semi-immergé</i>	Sunken system <i>Système immergé</i>	- 1.	1.155	0.409
Tenacity (g/d) <i>Résistance (g / d)</i>	Floating system <i>Système flottant</i>	Semi-sunken system <i>Système semi-immergé</i>	- 0.075	0.05	0.168
	Floating system <i>Système flottant</i>	Sunken system <i>Système immergé</i>	- 0.025	0.05	0.629
	Semi-sunken system <i>Système semi-immergé</i>	Sunken system <i>Système immergé</i>	0.05	0.05	0.343
Elongation (%) <i>Allongement (%)</i>	Floating system <i>Système flottant</i>	Semi-sunken system <i>Système semi-immergé</i>	- 1.25	0.736	0.124
	Floating system <i>Système flottant</i>	Sunken system <i>Système immergé</i>	- 2.75**	0.736	0.005
	Semi-sunken system <i>Système semi-immergé</i>	Sunken system <i>Système immergé</i>	- 1.5	0.736	0.072

* Significant at 5% level / *Significatif au seuil de 5 %*. ** Significant at 1% level / *Significatif au seuil de 1 %*.

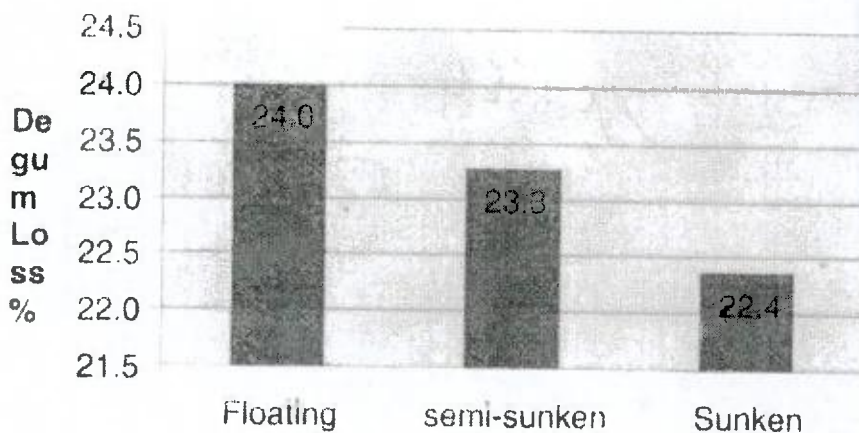


Fig. 3. Influence of cocoon cooking conditions on Degumming loss %.

Fig. 3. Influence des conditions de cuisson des cocons sur le % de perte au décreusage.

Tenacity and Elongation:

From the results (Table III and V) it is observed that cocoon cooking conditions have no significant influence on tenacity of raw silk. Tenacity of the raw silk is found to be good in all the cases.

Results (Table III & V) indicate that cocoon cooking condition has a significant influence (at 1% level) on the elongation of raw silk. Sunken and semi-sunken systems have resulted in significantly better elongation of raw silk as compared to the floating system. It is observed that (Table V) difference in the elongation of raw silk between floating and sunken systems is significant, whereas, that between semi-sunken and sunken system is insignificant.

Better elongation of raw silk in the case of sunken and semi-sunken system is attributed to uniform swelling and softening of Sericin of cocoon filament at cross over points and all the filament layers of cocoon shell to the required level. Reduction in elongation of raw silk in the case of floating system is attributed to under cooking of cocoons. It is to be noted that cocoon cooking condition has a significant influence on cocoon filament unwinding tension and if the cocoons are under cooked, cocoon filament unwinding tension will be higher leading to increase in total reeling tension (Takabayashi, 1996). It is known that higher tension during reeling will reduce the elongation of raw silk.

While reeling the cocoons reeling tension was measured in all the cases. Reeling tension was found to be in the range of 0.45g/d, 0.33g/d and 0.29 g/d in the case of floating, semi-sunken and sunken systems, respectively.

CONCLUSION

From the results it is inferred that the cocoon cooking parameters influence significantly the water absorption in the cocoon and cocoon shell and hence cocoon cooking condition, which in turn influence the reeling performance of cocoons and quality of raw silk. Results clearly indicate that by cooking the cocoons for sunken system or semi-sunken system of reeling using pressurized cooking

machine and with required cooking parameters, better reeling performance and superior grade raw silk can be achieved.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank the technical staff of reeling division of CSTRI, Bangalore for their active support.

REFERENCES

- SHIMAZUKI.A, SELRIJIMA M.(1961) "Studies on pretreatment of cocoon cooking. Part I J.Silk Si.Tech. Japan , 11, 1-8.
- SHIMAZUKI.A, YAMAMOTO A (1962) "Studies on pretreatment of cocoon cooking", Part-II, J.Silk Sci Tech, Japan, 12, 4-7.
- YOSHIRO MASAGO, SHIRO ONO, FUSAKICHI NAKAGAWA(1968) " On the rheological properties of raw silk in various condition for silk reeling, Report of silk science research institute, Japan, No.16, 47-62.
- TAKABAYASHI.C AND HOSOKAWA A. (1985) "Measurement and control of the Experimental condition of cooked cocoons in the silk producing process", Bull. Seric. Exp. Stn., Tsukuba, 29(5), 563-615.
- TAKABAYASHI.C, SUBHAS.V.NAIK AND H.TSUBOI (1996) "Influence of cocoon cooking conditions on variation of cocoon filament exfoliation tension" J.Seric.Sci., Jpn, .65, No.4, 278-285. SUBHAS V. NAIK AND T. H. SOMASHEKAR (2003) "Studies on bivoltine cocoon cooking -Part II : Effect of retting temperature and permeation treatment condition on quality characteristics of raw silk of Indian bivoltine hybrid cocoons" Sericologia 43(2), 235-244.

EFFET DES CONDITIONS DE CUISSON DES COCONS SUR LA PERFORMANCE DE DEVIDAGE ET LES CARACTERISTIQUES DE QUALITE DE LA SOIE GREGE DES COCONS HYBRIDES BIVOLTINS INDIENS

SUBHAS V. NAIK^{*1}, PRAKASH Y. NAIK¹, HANUMANTH NAIK²,
B. M. MAHADEVIAH³ & S. T. VENU³

1. Silk Conditioning Testing House, CSTRI, Central Silk Board, Near Govt. Cocoon Market, Dharmavaram – 515671, Andhra Pradesh, Inde.
2. Govt. Sri Krishnarajendra Silver Jubilee Technological Institute, K. R. Circle, Bangalore – 560 001, Inde.
3. Central Silk Technological Research Institute, Central Silk Board, BTM Layout, Bangalore – 560 068, Inde.

On a étudié l'influence des conditions de cuisson des cocons pour les systèmes de dévidage flottant, semi-flottant et immergé sur la performance de dévidage et les caractéristiques de qualité de la soie grège des cocons hybrides bivoltins en utilisant une machine de cuisson des cocons circulaire pressurisée du CSTRI. On observe que les conditions de cuisson des cocons ont une influence significative à la fois sur la performance de dévidage et sur les caractéristiques de qualité de la soie grège. La cuisson des cocons avec le système de dévidage immergé entraîne une dévidabilité, une rentrée de soie grège et une qualité de soie, c'est-à-dire une netteté, une propreté et un allongement significativement meilleurs par comparaison aux deux autres conditions de cuisson des cocons. D'après les résultats, on observe que la cuisson des cocons avec le système de dévidage flottant a affecté la dévidabilité, la rentrée de soie grège, la netteté, la propreté, l'allongement de la soie grège. Les résultats indiquent que les paramètres de cuisson des cocons ont une influence significative sur l'absorption de l'eau par le cocon et par la coque soyeuse et sur les conditions de cuisson des cocons, qui à leur tour influencent la performance de dévidage et les caractéristiques de la soie grège.

INTRODUCTION

La cuisson des cocons est un processus important pour le dévidage de la soie grège qui joue un rôle décisif sur la performance de dévidage des cocons et sur la qualité de la soie grège. Pour obtenir un gonflement et un amollissement uniformes de la séricine dans toutes les couches de la coque soyeuse, on procède à la cuisson des cocons en six étapes. Le processus de cuisson des cocons décide de l'absorption d'eau dans le cocon et des conditions de cuisson des cocons. Des études ont été réalisées au Japon (Shimazaki, 1961, 1962 ; Yoshiro Masogo, 1968) sur la cuisson des cocons avec des cocons hybrides bivoltins d'origine japonaise. Takabayashi (1985) a suggéré des valeurs optimales de degré de cuisson des cocons et de teneur en eau dans la coque soyeuse pour les cocons hybrides bivoltins d'origine japonaise. Cependant, les informations sur l'influence des conditions de cuisson des cocons pour les systèmes de dévidage flottant, semi-immersé et immergé par rapport à la performance de dévidage et à la qualité de la soie grège, en particulier, pour les cocons hybrides bivoltins indiens sont rares.

* Auteur auquel adresser la correspondance.

Cette étude se concentre sur l'effet des conditions de cuisson des cocons pour les systèmes de dévidage flottant, semi-immergé et immergé par rapport au degré de cuisson des cocons, à la performance de dévidage et aux caractéristiques de qualité de la soie grège des cocons hybrides bivoltins indiens.

MATERIELS ET METHODES

Matières premières :

Pour l'étude, on utilise des cocons hybrides bivoltins (CSR2 × CSR4) achetés sur les marchés aux cocons gouvernementaux.

Conception expérimentale :

La conception de l'expérience varie les conditions de cuisson, c'est-à-dire cuisson ouverte à la bassine et cuisson pressurisée.

Conditions de séchage des cocons :

On sèche les cocons à l'air chaud au niveau optimal en utilisant un profil de température de 115° C à 55° C pendant quatre heures et demi dans un étouffoir en vrac.

Cuisson des cocons :

On procède à la cuisson des cocons en utilisant une bassine ouverte unique et une machine de cuisson des cocons pressurisée circulaire du CSTRI pour les systèmes de dévidage flottant, semi-immergé et immergé d'après la conception de l'expérience.

Cuisson des cocons pour le système de dévidage flottant :

Pour procéder aux conditions de cuisson des cocons pour le système de dévidage flottant, on cuit les cocons dans une bassine unique à une température de 95° C pendant environ 3 minutes.

Cuisson des cocons pour les systèmes de dévidage semi-immergé et immergé :

Pour cuire les cocons pour les systèmes de dévidage semi-immergé et immergé, on cuit les cocons dans une machine de cuisson circulaire pressurisée en vrac du CSTRI. La température et la durée adoptées sont les suivantes .

	Système semi-immergé		Système immergé	
	Temp (° C)	Durée (min)	Temp. (° C)	Durée (min)
i. Condition de rouissage	75	1,0	75	1,5
ii. Traitement à température élevée (vapeur)	90	1,5	90	3,0
iii. Traitement d'imprégnation à basse température de l'eau	75	1,0	75	1,5
iv. Cuisson à la vapeur	96	1,0	97	3,0
v. Profil du traitement d'ajustement				
Température initiale de l'eau	96	1,0	97	1,0
Diminution progressive de la Température de l'eau	96 à 75	4,0		5,0
vi. Traitement de finition	35	0,5	35	1,0

Purgeage :

On purge les cocons cuits dans de l'eau chaude à 80° C.

Conditions de dévidage :

On dévide les cocons sur une bassine de dévidage multibouts du CSTRI en adoptant une vitesse de dévidage de 100 m / min, une longueur de croisure de 8 cm, une température de l'eau de la bassine de 40° C et des filières de dévidage du CSTRI avec un trou de 250 µ.

Reflottage :

On trempe les petits roquets dans l'eau en utilisant une étuve d'imprégnation à vide pour petits dévidoirs et on les reflotte sur une machine de reflottage de type fermé du CSTRI avec une vitesse de reflottage de 225 tpm, une température de 40° C et une HR de 45 % dans la machine de reflottage.

Qualité de l'eau :

On utilise une eau avec un pH de 7,2, une dureté de 85 ppm et une alcalinité de 36 ppm pour l'étude.

Degré de cuisson des cocons :

Pour évaluer les conditions de cuisson des cocons, on mesure la teneur en eau des cocons cuits et de la coque soyeuse en utilisant la formule suivante :

$$\text{Degré de cuisson du cocon} = \frac{\text{Poids du cocon cuit}}{\text{Poids du cocon sec}}$$

% d'absorption de l'eau dans la coque soyeuse =

$$\frac{\text{Poids de la coque cuite} - \text{Poids de la coque sèche}}{\text{Poids de la coque sèche}} \times 100$$

Perte au décreusage de la soie grège :

Pour évaluer la perte au décreusage, on soumet les échantillons de soie grège au test de perte à l'ébullition en suivant la procédure standard du CSTRI.

Test de la soie grège :

On teste les caractéristiques de propreté, de netteté, de netteté minimum des échantillons de soie grège en utilisant le test Seriplane et on teste la résistance et l'allongement de la soie grège en utilisant un sérigraphie en adoptant la procédure de l'AIS.

Analyse des données :

On recueille les données et on les analyse statistiquement.

RESULTATS ET DISCUSSION

Caractéristiques de dévidage :

Les résultats moyens des conditions de cuisson des cocons sur le degré de cuisson des cocons, sur la teneur en eau de la coque soyeuse et sur les caractéristiques de dévidage sont présentés dans les Tableaux I et II et dans les figures 1 à 3.

Dévidabilité et longueur du filament sans rupture :

D'après les résultats (Tableaux I et II), on observe que les conditions de cuisson du cocon ont une influence significative (au seuil de 1 %) sur la dévidabilité et sur la longueur du filament sans rupture. Les conditions de cuisson des cocons pour le système de dévidage immergé et semi-immergé donnent une dévidabilité et une longueur de filament sans rupture significativement meilleures (Tableau I) par comparaison aux conditions de cuisson des cocons pour le système de dévidage flottant et on attribue cela à l'amollissement et au gonflement meilleurs et uniformes de la séricine dans toutes les couches de la coque soyeuse, tandis qu'on attribue la diminution de la dévidabilité et de la longueur du filament du cocon sans rupture dans l'autre cas à la sous-cuisson des cocons.

On doit noter que le gonflement et l'amollissement de la séricine sont provoqués par une combinaison de chaleur et de quantité d'eau absorbée par les couches du cocon pendant le traitement d'imprégnation à l'eau lors de la cuisson des cocons et aux propriétés de l'eau utilisée.

Après l'entrée d'une quantité appropriée d'eau dans le cocon et dans la coque soyeuse pendant l'étape de pré-traitement de cuisson des cocons, l'énergie calorifique nécessaire est impérative dans la zone de cuisson pour cuire les couches de la coque soyeuse de manière uniforme. Autrement, il y aura une sous-cuisson ou la cuisson sera inégale. Ainsi, pendant la cuisson des cocons pour le système de dévidage flottant (connu souvent en tant que cuisson dans une bassine unique), il n'y aura pas d'imprégnation de d'eau dans les cocons avant le traitement de cuisson des cocons, puisque les cocons sont directement traités à une seule température. Dans le cas de la cuisson pressurisée des cocons, les cocons sont cuits en suivant un principe de cuisson avec six traitements de cuisson des cocons pour répondre aux conditions des systèmes semi-immergé et immergé. Grâce à cela, la séricine des filaments de toutes les couches de la coque soyeuse gonfle et s'amollit de manière uniforme au niveau requis, ce qui entraîne une meilleure dévidabilité et donc une longueur de filament sans rupture plus longue.

Dans le cas de la cuisson des cocons pour le système de dévidage immergé, les cocons sont complètement remplis d'eau et tendent à s'enfoncer dans la bassine de dévidage pendant le dévidage. Compte tenu du gonflement et de l'amollissement de la séricine, qui sont maintenus pendant le processus de dévidage, le déroulement du filament du cocon sur sa longueur est très homogène avec une tension de dévidage minimum du filament du cocon (Takabayashi, 1996), ce qui entraîne une meilleure dévidabilité.

On peut observer que le degré de cuisson du cocon et l'absorption de l'eau dans la coque soyeuse sont significativement meilleurs avec les systèmes de cuisson immergé et semi-immergé, par comparaison au système flottant (Figures 1 et 2).

Longueur moyenne du filament des cocons :

Les résultats indiquent (Tableau I) que les conditions de cuisson des cocons pour les systèmes de dévidage immergé et semi-immergé ont donné une meilleure longueur de filament par comparaison aux conditions pour le système de dévidage flottant. L'influence des conditions de cuisson des cocons sur la longueur moyenne du filament des cocons est significative au seuil de 1 % (Tableau II).

On attribue la meilleure longueur du filament des cocons lors de la cuisson des cocons avec les systèmes de dévidage immergé et semi-immergé à la cuisson uniforme des cocons au niveau requis, ce qui entraîne une génération moins importante de déchets pendant la cuisson, ce qui donne une meilleure longueur de filament.

Rentrée de soie grège, rendement à la bassine et % de déchets :

On observe que (Tableau II) les conditions de cuisson des cocons ont une influence significative (au seuil de 1 %) sur la rentrée de soie grège, le rendement à la bassine (rendement en soie grège) et sur la génération de déchets. Les résultats (Tableau I) indiquent que les conditions de cuisson des cocons pour le système de dévidage immergé entraînent une rentrée en soie grège significativement

meilleure et donc moins de déchets de rendement à la bassine, de purgeage et de battage par comparaison aux deux autres conditions de cuisson, le système semi-immergé étant meilleur que le système flottant.

On peut observer (Figure 3) que le pourcentage de perte au décreusage de la soie grège est plus élevé avec le système flottant, suivi par le système semi-immergé et il est moins important avec le système immergé. Cela signifie que la dissolution de la sérécine est plus importante (d'environ 2 %) pendant la cuisson pour le système de dévidage immergé par comparaison au système flottant. Malgré cela, la rentrée de soie grège est meilleure lors de la cuisson des cocons pour le système de dévidage immergé par comparaison au système flottant et on peut attribuer cela à une génération moins importante de déchets de cuisson et de dévidage dans le cas du système immergé.

On attribue la meilleure rentrée de soie grège et donc le rendement supérieur à la bassine pour les systèmes immergé et semi-immergé à la cuisson uniforme du filament de toutes les couches de la coque soyeuse au niveau requis. La cuisson uniforme des cocons a entraîné une meilleure dévidabilité et une diminution du pourcentage de déchets et des déchets de pélette (Tableau I). On attribue la diminution significative de la rentrée de soie grège et la diminution du rendement à la bassine et du % de déchets avec le système flottant à la sous-cuisson et à la cuisson inégale des cocons. On peut observer (Tableau I) que les déchets de pélette sont significativement supérieurs avec le système flottant de cuisson des cocons par comparaison aux deux autres systèmes.

Caractéristiques de qualité :

Les résultats moyens de l'influence des conditions de cuisson sur les caractéristiques qualitatives de la soie grège sont présentés dans les Tableaux III à IV.

Netteté, netteté minimum et propreté de la soie grège :

On observe (Tableau III) que les conditions de cuisson des cocons pour les systèmes de dévidage immergé et semi-immergé ont entraîné une netteté, une netteté minimum et une propreté de la soie grège significativement meilleures par comparaison au système flottant. Les résultats (Tableau III) indiquent que la cuisson des cocons avec le système de dévidage flottant a affecté de manière significative la netteté, la netteté minimum et la propreté de la soie grège. L'influence des conditions de cuisson des cocons sur la netteté et sur la netteté minimum de la soie grège est significative au seuil de 1 %, tandis qu'elle est significative au seuil de 5 % sur la propreté de la soie grège (Tableau IV).

D'après l'analyse de comparaison multiple (Tableau V), on observe que la différence de netteté, de netteté minimum et de propreté de la soie grège entre les conditions de cuisson des cocons pour les systèmes de dévidage flottant et semi-immergé et pour les systèmes flottant et immergé est significative au seuil de 1 %. Par ailleurs, la différence de ces caractéristiques de la soie grège entre les systèmes semi-immergé et immergé est insignifiante.

On attribue l'amélioration de la netteté, de la netteté minimum et de la propreté de la soie grège avec les systèmes immergé et semi-immergé à la cuisson uniforme du filament de toutes les couches de la coque soyeuse au niveau requis.

On attribue la diminution significative de la netteté, de la netteté minimum et de la propreté de la soie grège avec le système flottant à la sous-cuisson et à la cuisson inégale des cocons. On doit noter que la sous-cuisson entraîne un amollissement insuffisant du filament des couches du cocon, en particulier aux points de croisement, ce qui entraîne la présence de défauts de netteté et de propreté du fil (Subhas et coll., 2003).

Résistance et allongement :

D'après les résultats (Tableaux III et V), on observe que les conditions de cuisson des cocons ont une influence significative sur la résistance de la soie grège. La ténacité de la soie grège s'avère bonne dans tous les cas.

Les résultats (Tableaux III & V) indiquent que les conditions de cuisson des cocons ont une influence significative (au seuil de 1 %) sur l'allongement de la soie grège. Les systèmes immergé et semi-immergé ont entraîné un allongement significativement meilleur de la soie grège par comparaison au système flottant. On observe que (Tableau V) la différence d'allongement de la soie grège entre les systèmes flottant et immergé est significative, tandis qu'elle est insignifiante entre les systèmes semi-immergé et immergé.

On attribue le meilleur allongement de la soie grège avec les systèmes immergé et semi-immergé aux meilleurs gonflement et amollissement de la séricine du filament du cocon aux points de croisement et de toutes les couches de la coque soyeuse au niveau requis. On attribue la diminution de l'allongement de la soie grège avec le système flottant à la sous-cuisson des cocons. On doit noter que les conditions de cuisson des cocons ont une influence significative sur la tension de dévidage du filament et si les cocons ne sont pas assez cuits, la tension de dévidage du filament du cocon sera supérieure, ce qui entraînera une augmentation de la tension de dévidage totale (Takabayashi, 1996). On sait que la tension supérieure pendant le dévidage diminue l'allongement de la soie grège.

Pendant le dévidage des cocons, on mesure la tension de dévidage dans tous les cas. La tension de dévidage se classe dans une fourchette de 0,45 g / d, 0,33 g / d et de 0,29 g / d respectivement avec les systèmes flottant, semi-immergé et immergé.

CONCLUSION

D'après les résultats, on en déduit que les paramètres de cuisson des cocons influencent l'absorption de l'eau dans le cocon et dans la coque soyeuse de manière significative et donc les conditions de cuisson des cocons, qui à leur tour influencent la performance de dévidage des cocons et la qualité de la soie grège. Les résultats indiquent clairement que la cuisson des cocons pour les systèmes de dévidage immergé ou semi-immergé en utilisant la machine de cuisson pressurisée et avec les paramètres de cuisson nécessaires, permet d'obtenir une meilleure performance de dévidage et une soie grège de catégorie supérieure.

COCOON FILAMENT SIZE DEVIATION IN MULTIVOLTINE BREEDS OF SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

S. A. HIEMATH, P. R. KOUNDINYA¹*, S. M. H. QADRI² & C. K. KAMBLE*

Central Silk Technological Research Institute, Bangalore 560 068, Karnataka, India.

1. Central Sericultural Germplasm Resources Center, Hosur, India.

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

67 parental multivoltine breeds were studied for their size deviation within the cocoon. Single cocoon filament was reeled with eppovette in 100 m sects from the beginning to the end. Every 100 m sect was weighed and the size deviation along the length of filament was calculated for each breed. The results indicate that the filament size showed decrease from outermost layer to the innermost layer. The regression analysis (Least square method) was used for calculation of the slope of size deviation curve and relationship between filament length vs. slope, average filament size vs. slope and maximum filament size vs. slope. The analysis indicates that a highly significant positive correlation exists between slope vs. average filament size ($r = 0.984$) and slope vs. maximum filament size ($r = 0.622$) for breeds. The accessions BMI-0063 ($d = 1.67, b = -0.00137$) and BMI-0013 ($d = 1.65, b = -0.00113$) recorded lower slope values with fine denier. Similarly, accessions BMI-0068 ($d = 2.66, b = 0.00192$) and BMI-0038 ($d = 2.52, b = 0.00126$) recorded lower slope values with coarse denier. These potentiality are to be used in the breeding programme for evolving superior quality races and also to be used as potential parents to gain heterosis in cross breed development for improving post cocoon traits.

Keywords: multivoltine parental breeds, revolutions, filament size, slope.

INTRODUCTION

In view of increasing demand to meet the requirement of quality silk by the filatures, it is highly important to meet the dual demands having consumer specific characters including development of thick and thin filament varieties, etc. Because of certain problem in Indian dupion silk, it is not preferred in power looms and only consumed by the handlooms. Further, present Indian dupion silk fetches significantly low price as compared to the Chinese dupion silk. In order to produce international grade dupion/coarse denier silk, thick denier parental breeds are to be identified with minimum size variations. The importance of quality silk triggered the temperate sericulture industry of Japan about 5 to 6 decades ago. It is during 1990 onwards, lot of scope was given by silkworm breeders of Japan to develop fine denier breed Shin Akebono with filament length varying from 1480 to 1730 m and denier from 2.23 to 2.30 and later in the year 2000 super fine denier breed Hakugin with filament length of 1750 m and 1.75 denier was developed (Yamamoto *et al.*, 1995).

Quality of silkworm cocoon influences the productivity in silk reeling and raw silk quality (Somashekar, 2003). Since the major quality contribution comes from the cocoons, it is very much essential for the silkworm breeders to focus their attempts on quality specific characters like filament

* To whom correspondence to be addressed Central Silk Technological Research Institute, Central Silk Board - Govt. of India, B.T.M. Layout, Madiwala, Karnataka, India. Tel: 091-080-26688831. Fax: 091-080-26680435. E-mail: sahiemath1965@yahoo.com

size and its deviation, filament length, tenacity, elongation and boil off loss, etc. Among the other quality traits, the filament size and its deviation from outer layer to the inner layer will affect the uniformity and quality of raw silk yarn. (Naik and Babu, 1993). India being the tropical country with highly fluctuating characters, therefore it is highly demanding work for the breeders to keep filament size and deviation of single filament throughout the length. Filament size variations influence the size or thickness of the raw silk yarn (Mahadevappa, 2000). Therefore silkworm breeders should consider the filament size deviation as one of the important parameters for assessing the yarn quality. Ramesh Babu *et al.* (2003) studied the filament size deviation among the newly developed bivoltine parental breeds/hybrids and concluded that among the parental breeds, APS63 recorded lower slope value and in hybrid combination SDO1 × SDD3 showed lower slope value. Considering the importance of thick and thin filament size and its deviation for assessing the quality of the silk yarn, study has been conducted to know the filament size deviation in 67 multivoltine parental breeds.

MATERIALS AND METHODS

67 multivoltine parental breeds were selected as test materials for the study. All breeds were reared as per the standard rearing method (Datta, 1992). Twenty-five good cocoons were selected from each accession. Accession wise all the cocoons were assessed, by recording of data on cocoon weight, shell weight and shell ratio percentage. Cocoons were dried in hot air oven. The drying chamber is heated up to 120 °C then the cocoons are charged in the drying chamber. The cocoons are initially charged at high temperature to remove moisture mixed with the air inside the cocoon at faster rate, so that the inner layer sericine is not affected. The cocoons are dried using the schedule as 115 °C (One hour) → 100 °C (One hour) → 85 °C (One hour) → 70 °C (One hour) → 55 °C (One hour). Hot air dried cocoons were conditioned for a minimum period of 2 to 7 days in atmospheric conditions (Laxmipathaiah *et al.* (2000). The length of the filament is measured using epprovette fitted with meter. While single cocoon reeling, the filament reeled for every 100 meters were taken out from the epprovette and arranged serially one after another till the filament obtained from innermost layer of the cocoon and the total filament length was calculated and recorded. A minimum of 10 cocoons from each accession was reeled in similar way. Each of 100-meter sections together with the last section was dried in drying chamber at 100 °C for 1 hour. Later the threads were transferred to the desiccators and weighing of each section was undertaken immediately so as to avoid absorption of moisture by silk filament. The weighing of silk filament from outside layer to inner layer was taken with sartorius weighing balance. The filament size was calculated by using the following formula/

$$\text{Denier} = \frac{\text{Weight in grams}}{\text{Length in meters}} \times 9000$$

The size of cocoon filament has its own specific regularity. And the characteristic numbers showing the variations in fineness. Cocoon layer categories are different and most of the filament size recorded as Coarsest → Coarse → Fine → Finest.

The relation between length of filament and slope, filament size and slope was estimated through regression analysis (Least square method). Slope of the denier curve was estimated by applying the following formula:

$$b = \frac{\sum xy - (\sum x \sum y) / n}{\sum x^2 - (\sum x)^2 / n}$$

Where, b = Slope, x = Filament length, y = Filament size and n = no of observations.

The least square method is a procedure for using sample data to find the estimated regression equation. The individual data from a 67 multivoltine parental breeds, x is the individual filament length (in metre) and y is the denier of the filament (d). The value of x and y for 67 MV breeds are summarised in Table I.

Slope (b) is the sum of the squares of the deviations between the observed value of the filament length (mtrs.) and filament size (d)

If the slope of the estimated regression equation is positive; it implies that as filament length increases, filament size also increases. On the other side, if the slope of the estimated regression equation is negative; it implies that as filament length increases filament size decreases.

Analysis of variance (ANOVA) was employed for filament length and average filament size for breeds.

RESULTS AND DISCUSSION

The data pertaining to 67 multivoltine parental breeds for average filament length, filament size with maximum, minimum and average values and slope values are presented in Table I. The results present that among the breeds the filament length ranged from a minimum of 287.95 (BMI-0020) to a maximum of 709.95 (BMI-0066) with 18.25 % coefficient of variation. The maximum filament size of the breeds ranged between as high of 3.87 observed for BMI-0072 and as low of 2.25 observed for BMI-0063. Similarly, the minimum filament size ranged from 1.44 and the lowest of 0.441 was recorded for the breeds BMI-0061 and BMI-0054, respectively. The average filament size ranged from 1.65 (BMI-0065) to 2.66 (BMI-0068). The regression analysis (Least square method) conducted to find out the 'slope' expressed as ' b ' value indicated that the ' b ' value ranged from 0.00192 to -0.00137 with least value of -0.00137 recorded for BMI-0063 followed by BMI-0013 (-0.00113) and BMI-0029 (-0.00109). Maximum value of 0.00192 was recorded for BMI-0068 followed by BMI-0038 (0.00126) and BMI-0065 (0.00085).

Out of 67 multivoltine parental breeds, a total of 40 breeds showed negative slope values and remaining 27 breeds showed positive slope values. Among 40 negative slope breeds, longer filament length recorded in BMI-0066 (709.957 m) followed by BMI-0008 (604.13 m) and BMI-0045 (495.13 m). Similarly, among positive slope values; longer filament length was recorded in BMI-0072 (550.60 m) followed by BMI-0061 (514.43 m) and BMI-0067 (469.28 m).

The relationship between filament length and slope, average filament size and slope and maximum filament size and slope are presented in Table II. The analysis indicated that there exists non-significant relationship between slope vs average filament length. However, there was a highly significant relationship between slope and average filament size ($r = 0.984^{**}$) and slope vs maximum filament size ($r = 0.622$). These results corroborate the observations of Suresh Kumar *et al.* (2002). Among the parental breeds, BMI-0063 (TW $\times$ SK6 $\times$ SK1) and BMI-0013 (GUANGNONG PLAIN) have recorded lower slope value of -0.00137 and -0.00113 respectively.

The list of selected multivoltine parental breeds are presented in Table III. This table indicated that out of 67 multivoltine parental breeds, 20 breeds viz; top ten thin denier & top 10 coarse denier breeds. Among the breeds, BMI-0063 and BMI-0013 have recorded lower slope value with thin denier. Among thick denier breeds BMI-0072, recorded lower slope with longer filament length.

The best performing top 10 breeds with fine denier, average filament length and the slope value (b) among 67 multivoltine parental breeds are shown in Table IV. The data present that the filament size (denier) is ranged from a thick (coarse) of 1.83 d (BMI-0010) to a fine of 1.65 d (BMI-0013). Further, average filament length ranged from a height of 438.70 m (BMI-0050) to a low of 313.08 m (BMI-0063). The slope of curve was calculated through ' b ' value obtained by employing the regression analysis (Least square method).

Table I. Details of filament length, size and slope in the multivoltine breeds of *Bombyx mori* L.

Tableau I. Données sur la longueur, le titre et la pente du filament chez les lignées polyvoltines de *Bombyx mori* L.

Sl.No.	Accn.no.	Avg.fil. length (m)	Max fil size (d)	Min.fil size (d)	Avg. fil. Size (d)	Slope (b-value)
No. de série	No. d'exemplaire	Longueur moyenne du fil. (m)	Titre max. du filament (d)	Titre min. du filament (d)	Titre moyen du filament (d)	Pente (valeur b)
1	1	393.78	3.06	0.76	2.18	0.00020
2	2	406.80	2.61	1.10	1.87	-0.00057
3	3	428.55	2.79	1.14	1.97	-0.00030
4	4	357.60	2.52	1.06	1.91	-0.00053
5	5	389.53	2.88	0.96	2.04	-0.00015
6	6	420.05	2.97	0.75	2.00	-0.00024
7	7	439.60	2.79	0.88	1.94	-0.00036
8	8	604.13	2.79	0.89	1.85	-0.00041
9	9	458.25	3.06	1.29	2.23	0.00028
10	10	340.95	2.61	0.73	1.78	-0.00094
11	11	378.03	2.88	0.77	2.00	-0.00026
12	12	328.83	2.61	0.89	2.04	-0.00018
13	13	396.90	2.52	0.48	1.65	-0.00113
14	14	411.30	2.70	0.84	1.77	-0.00080
15	15	383.90	2.79	0.80	1.86	-0.00063
16	16	443.43	2.88	0.96	2.04	-0.00013
17	17	323.65	3.15	0.70	1.89	-0.00065
18	18	386.30	2.61	0.81	1.90	-0.00052
19	19	301.40	3.24	0.68	2.19	0.00030
20	20	287.95	2.70	1.42	2.05	-0.00017
21	22	433.90	3.51	0.71	1.94	-0.00037
22	23	325.00	2.88	0.73	1.85	-0.00077
23	24	298.25	3.69	0.68	2.34	0.00080
24	25	420.73	3.06	0.71	1.77	-0.00078
25	26	376.00	2.70	0.99	2.02	-0.00021
26	27	309.50	3.15	1.23	2.11	0.00003
27	28	383.43	3.15	1.21	2.22	0.00031
28	29	394.65	2.97	0.72	1.67	-0.00109
29	30	458.68	3.33	0.80	2.11	0.00002
30	31	433.08	2.88	0.84	1.74	-0.00083
31	32	370.18	2.70	1.00	2.13	0.00008
32	33	387.23	3.33	1.41	2.43	0.00085
33	34	322.08	3.24	1.23	2.34	0.00075
34	35	417.15	2.52	0.66	1.90	-0.00048
35	36	448.38	2.79	0.49	2.07	-0.00007
36	37	357.80	3.06	1.08	2.04	-0.00017
37	38	333.55	3.51	1.14	2.52	0.00126
38	39	367.90	2.88	1.17	2.17	0.00019
39	40	443.00	3.60	0.80	2.00	-0.00023
40	42	364.75	2.61	0.73	1.91	-0.00052
41	44	390.85	2.70	0.64	1.94	-0.00041
42	45	495.13	3.24	1.01	2.08	-0.00004

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

Sl. No.	Accn. no.	Avg. fil. length (m)	Max fil size (d)	Min.fil size (d)	Avg. fil. Size (d)	Slope (b-value)
<i>No. de série</i>	<i>No. d'exemplaire</i>	<i>Longueur moyenne du fil. (m)</i>	<i>Titre max. du filament (d)</i>	<i>Titre min. du filament (d)</i>	<i>Titre moyen du filament (d)</i>	<i>Pente (valeur b)</i>
43	46	364.53	2.88	0.67	2.13	0.00008
44	47	362.08	3.06	0.80	2.13	0.00008
45	48	296.20	2.88	1.26	2.24	0.00047
46	49	361.31	2.70	1.26	2.10	0.00000
47	50	438.70	2.43	0.52	1.70	-0.00090
48	52	318.05	2.88	0.77	1.79	-0.00097
49	53	398.93	2.97	0.80	1.84	-0.00065
50	54	462.98	3.51	0.44	2.07	-0.00006
51	55	406.83	3.15	0.59	1.83	-0.00066
52	56	457.90	2.70	0.81	2.00	-0.00022
53	57	400.50	2.97	1.27	2.38	0.00070
54	58	355.98	2.70	1.26	2.15	0.00014
55	59	442.73	2.70	0.94	1.94	-0.00036
56	60	433.75	3.60	0.80	2.13	0.00007
57	61	514.43	3.33	1.44	2.49	0.00076
58	62	427.34	2.88	1.21	2.12	0.00005
59	63	313.08	2.25	1.00	1.67	-0.00137
60	64	319.60	2.43	1.23	2.00	-0.00031
61	65	421.40	3.42	1.37	2.46	0.00085
62	66	709.95	3.69	0.67	1.94	-0.00023
63	67	469.28	2.88	1.10	2.20	0.00022
64	68	292.15	3.60	1.25	2.66	0.00192
65	71	412.83	3.06	0.90	2.07	-0.00007
66	72	550.60	3.87	1.43	2.48	0.00069
67	73	449.38	3.78	0.90	2.47	0.00082
	Mean / Moyenne	399.89	2.98	0.93	2.05	
	SD	72.96	0.37	0.26	0.23	
	CV%	18.25	12.24	27.82	10.99	

Accordingly, the 'b' value ranged from -0.00137 to -0.00066 with least value of -0.00137 recorded for the breed BMI-0063 and highest slope value of -0.00066 among fine denier recorded for BMI-0055.

These breeds will help the breeders in developing special breeds/hybrids with longer filament, fine denier with minimum size deviation from outer layer to inner layer within the cocoon. This type of classification will help in exploring the available source of pure races to derive commercial breeds to meet specific end use of silk in view of consumer interest. The quality silk produced from them suits the production of formal dress materials, scarf, golden lace, zari and soft silk fabrics, surgical threads etc.

Table II. Regression analysis in parental multivoltine silkworm breeds.

Tableau II. Analyse de régression chez les lignées de ver à soie parentales polyvoltines.

Parameters	No. of breed	Degree of freedom	R ²	S.E. of coefficient	r
Paramètres	Nbre de lignées	Degrés de liberté		Ecart type du coefficient	
Slope on average filament length <i>Pente pour la longueur moyenne du filament</i>	67	65	0.0001	0.00041	-0.038 ^{NS}
Slope on average filament size <i>Pente pour le titre moyen du filament</i>	67	65	0.968	0.00012	0.984**
Slope on maximum filament size <i>Pente pour le titre maximum du filament</i>	67	65	0.387	0.00048	0.622**

** - Significant at 1% level / Significatif au seuil de 1 %

NS - Non - significant / Non significatif

Table III. Details of selected multivoltine parental breeds.

Tableau III. Caractéristiques des lignées parentales polyvoltines sélectionnées.

Sl. No.	Accn. no.	Accn.Name	Collected from
No. de série	No. de l'exemplaire	Nom de l'exemplaire	Obtenue auprès du
1	BMI-0010	MY-1	CSRTI, Mysore
2	BME-0013	GUANGNONG PLAIN	CSRTI, Mysore
3	BMI-0014	OS-616	CSRTI, Berhampore
4	BMI-0025	A25	CSRTI, Berhampore
5	BMI-0029	B	CSRTI, Berhampore
6	BMI-0031	A14DY	CSRTI, Mysore
7	BME-0050	CAMBODG	CSRTI, Mysore
8	BME-0052	DAIZO	CSRTI, Mysore
9	BMI-0055	LMO	CSRTI, Mysore
10	BMI-0063	TWxSK6xSK1	DOS, Coonoor
11	BMI-0024	A23	CSRTI, Berhampore
12	BMI-0033	PA12	CSRTI, Mysore
13	BMI-0034	AP12	CSRTI, Mysore
14	BMI-0038	MU-1	CSRTI, Mysore
15	BMI-0057	PM(SL)	CSRTI, Mysore
16	BMI-0061	MU520	Mysore University
17	BMI-0065	BL43	CSRTI, Mysore
18	SMGS-BMI-0068	M12(w)	CSR&TI, Berhampore
19	SMGS-BMI-0072	M6M81	CSR&TI, Berhampore
20	BMI-0073	BL-67	CSRTI, Mysore

Table IV. List of thin (fine) denier multivoltine breeds and their performance.

Tableau IV. Liste et performance des lignées polyvoltines au titre fin.

Sl.no.	Accn.no.	Avg.fil. length(m)	Max fil size (d)	Min.fil size (d)	Avg.fil. Size (d)	Slope (b-value)
No. de série	No. d'exemplaire	Longueur moyenne du filament (m)	Titre max. du filament (d)	Titre min. du filament (d)	Titre moyen du filament (d)	Pente (valeur b)
1	13	396.90	2.52	0.48	1.65	-0.00113
2	63	313.08	2.25	1.00	1.67	-0.00137
3	29	394.65	2.97	0.72	1.67	-0.00109
4	50	438.70	2.43	0.52	1.70	-0.00090
5	31	433.08	2.88	0.84	1.74	-0.00083
6	14	411.30	2.70	0.84	1.77	-0.00080
7	25	420.73	3.06	0.71	1.77	-0.00078
8	10	340.95	2.61	0.73	1.78	-0.00094
9	52	318.05	2.88	0.77	1.79	-0.00097
10	55	406.83	3.15	0.59	1.83	-0.00066
	Mean / Moyenne	387.43	2.75	0.72	1.74	
	SD	46.44	0.29	0.16	0.06	
	CV	11.99	10.62	22.02	3.49	

Table V. List of thick (Coarse) denier multivoltine breeds and their performance.

Tableau V. Liste et performance des lignées polyvoltines au titre épais (grossier).

Sl.no.	Accn. no.	Avg.fil. length (m)	Max fil size (d)	Min.fil size (d)	Avg. fil. Size (d)	Slope (b-value)
No. de série	No. d'exemplaire	Longueur moyenne du filament (m)	Titre max. du filament (d)	Titre min. du filament (d)	Titre moyen du filament (d)	Pente (valeur b)
1	68	292.15	3.60	1.25	2.66	0.00192
2	38	333.55	3.51	1.14	2.52	0.00126
3	61	514.43	3.33	1.44	2.49	0.00076
4	72	550.60	3.87	1.43	2.48	0.00069
5	73	449.38	3.78	0.90	2.47	0.00082
6	65	421.40	3.42	1.37	2.46	0.00085
7	33	387.23	3.33	1.41	2.43	0.00085
8	57	400.50	2.97	1.27	2.38	0.00070
9	34	322.08	3.24	1.23	2.34	0.00075
10	24	298.25	3.69	0.68	2.34	0.00080
	Mean / Moyenne	396.96	3.47	1.21	2.46	
	SD	88.95	0.27	0.25	0.09	
	CV	22.41	7.84	20.48	3.86	

Similarly, the best performing top 10 breeds with thick (coarse) denier, average filament length and the slope value (b) among 67 multivoltine parental breeds are shown in Table V. The data present that the filament size (denier) is ranged from a thick (coarse) of 2.66 d (BMI-0068) to a fine of 2.48 d (BMI-0072). Further, average filament length ranged from a height of 550.60 m (BMI-0072) to a low of 292.15 m (BMI-0068). The 'b' value ranged from 0.00069 to 0.00192 with least value recorded for the breed BMI-0072 and highest slope value among thick (coarse) denier recorded for BMI-0068. These breeds will help the breeders in developing thick filament breeds/hybrids with longer filament with minimum size deviation from outer layer to inner layer within the cocoon. This will help in producing international grade dupion silk, and it can also be used as a weft material on high speed power looms and rapier looms. The quality thick silk yarn produced from them suits for the production of thick fabrics like curtains, upholstery, seat covers etc.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Sri Ashok Deole, computer statistician for data compilation and statistical analysis.

REFERENCES

- DATTA R.K (1992) Guidelines for bivoltine rearing. Central Silk Board, Bangalore.
- HIROB T (1985) on the recent advancement of silkworm breeding in Japan. Tamagawa University, 2-17-19, Gakuken- Cho- Higshikurume, Japan, pp. 157-167.
- KISHOR KUMAR C.M., BASAVARAJA H.K., NIRMAL KUMAR.S and RAMESH BABU M. (1997) Studies on size deviation of single cocoon filament in bivoltine silkworm breeds and hybrids. Abstract, current Technology seminar, September 18-19, Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore.
- LAKSHMI H.(1996) Studies on Post cocoon parameters in the cross breeds with special reference to size deviation in single cocoon filament. M.Sc. Dissertation, University of Mysore, Mysore.
- RAMESH BABU M, CHNDRASHEKHARAIH, LAKSHMI H, PRASAD J AND SEETHARAMULU J (2003) Cocoon filament size deviation in bivoltine breeds/hybrids of silkworm, *Bombyx mori* L. National conference on tropical sericulture for global competitiveness held at National academy of sericultural sciences, India, Bangalore.
- SOMASHEKAR T.H.(2003) Influence of racial characteristics on reeling performance and yarn characteristics. In: Concept papers, Silkworm breeders summit – 2003, July 18-19,2003, at APSSRDI, Hindupur, 86-89.pp
- SURESH KUMAR.N.; BASAVARAJA H.K., KALPANA G.V.; MAL REDDY N., JAYASWAL K.P., THIPPESWAMY T AND DATTA R.K.(2002) Cocoon filament size deviation in bivoltine silkworm, *Bombyx mori* L. Indian J. Seric, 41: 142-148.

REGULARITE DU TITRE DU FILAMENT DU COCON CHEZ LES LIGNEES POLYVOLTINES DU VER A SOIE, *BOMBYX* *MORI* L.

S. A. HIREMATH*, P. R. KOUNDINYA¹, S. M. H. QADRI² & C. K. KAMBLE¹

Central Silk Technological Research Institute, Bangalore 560 068, Karnataka, Inde.

1. Central Sericultural Germplasm Resources Center, Hosur, Inde.

2. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, Inde.

On a étudié 67 lignées parentales polyvoltines par rapport à la régularité du titre des filaments de leurs cocons. On dévide un filament de cocon avec une bassine par sections de 100 m du début à la fin. On pèse chaque section de 100 m et on calcule la régularité du titre le long du filament pour chaque lignée. Les résultats indiquent que le titre du filament présente une diminution de la couche la plus externe à la couche la plus interne. On utilise l'analyse de régression (méthode des moindres carrés) pour calculer la pente de la courbe de régularité du titre et la relation entre la longueur du filament et la pente, entre le titre moyen du filament et la pente et entre le titre maximum du filament et la pente. L'analyse indique qu'il y a une corrélation positive très significative entre la pente et le titre moyen du filament ($r = 0,984$) et entre la pente et le titre maximum du filament ($r = 0,622$) pour les lignées. Les exemplaires BMI-0063 ($d = 1,67$, $b = -0,00137$) et BMI-0013 ($d = 1,65$, $b = -0,00113$) enregistrent des valeurs plus faibles pour la pente avec le titre fin. De même, les exemplaires BMI-0068 ($d = 2,66$, $b = 0,00192$) et BMI-0038 ($d = 2,52$, $b = 0,00126$) enregistrent des valeurs plus faibles pour les pentes avec un titre grossier. Il faut utiliser ces potentialités dans un programme de breeding afin de mettre au point des races de qualité supérieures et les utiliser aussi comme parents potentiels pour gagner de l'hétérosis dans la mise au point de cross breeds afin d'améliorer les caractères post-cocon.

INTRODUCTION

Compte tenu de l'augmentation de la demande des filatures en soie de qualité il est très important de répondre aux doubles demandes des consommateurs pour des variétés à filament fin et épais. En raison de certains problèmes avec la soie indienne doupion, on ne l'utilise pas pour les métiers mécaniques mais seulement pour les métiers à tisser manuels. Par ailleurs, à l'heure actuelle la soie doupion indienne atteint des prix significativement bas, par comparaison à la soie doupion chinoise. Afin de produire de la soie doupion / au titre épais de qualité internationale, il faut identifier des lignées parentales au titre épais avec une faible variation du titre. La demande en soie de qualité a mis en route l'industrie séricicole tempérée au Japon, il y a 5 ou 6 décennies. A partir de 1990, les sélectionneurs japonais ont accordé beaucoup d'importance à la mise au point de la lignée Shin Akebono au titre fin avec une longueur de filament variant entre 1480 et 1730 m et un titre entre 2,23 et 2,30 et plus tard dans les années 2000 à la mise au point de la lignée Hakugin au titre super fin avec une longueur de filament de 1750 m et un titre de 1,75 (Yamamoto et coll., 1995).

* Auteur auquel adresser la correspondance Central Silk Technological Research Institute, Central Silk Board – Govt. of India, B.T.M. Layout, Madiwala, Karnataka, Inde. Tel: 091-080-26688831, Fax: 091-080-26680435. Email / sahiremath1965yahoo.com

La qualité du cocon du ver à soie influence la productivité du dévidage de la soie et la qualité de la soie grège (Somashekar, 2003). Puisque la contribution principale envers la qualité vient des cocons, il est impératif pour les sélectionneurs de vers à soie de concentrer leurs efforts sur les caractères spécifiques de qualité, tels que le titre et la régularité du filament, la longueur du filament, la résistance, l'allongement et la perte à l'ébullition (décreusage). Parmi les autres caractères qualitatifs, le titre du filament et sa régularité de la couche externe à la couche interne ont un effet sur l'uniformité et sur la qualité du fil de soie grège (Naik et Babu, 1993). L'Inde étant un pays tropical, aux caractéristiques très fluctuantes, le maintien du titre et de la régularité du filament sur toute la longueur représente donc un travail très exigeant pour les sélectionneurs. Les variations du titre du filament influencent le titre ou l'épaisseur du fil de soie grège (Mahadevappa, 2000). La régularité du titre du filament devrait donc être prise en compte comme l'un des paramètres important par les sélectionneurs de vers à soie pour évaluer la qualité du fil. Ramesh Babu et coll., (2003) ont étudié la régularité du titre du filament des lignées / des hybrides parentaux bivoltins venant d'être mis au point et conclus que parmi les lignées parentales, APS63 enregistre la valeur la plus faible pour la pente et la combinaison hybride SDO1 × SDD3 enregistre la valeur la plus faible pour la pente. Compte tenu de l'importance du titre du filament épais et fin et de sa régularité pour évaluer la qualité du fil de soie, nous avons entrepris cette étude pour évaluer la régularité du titre du filament chez 67 lignées parentales polyvoltines.

MATERIELS ET METHODES

On a sélectionné 67 lignées parentales polyvoltines comme matériels d'essai pour l'étude. On élève toutes les lignées d'après la méthode d'élevage standard (Datta, 1992). On sélectionne 25 bons cocons chez chaque exemplaire. On évalue tous les cocons de l'exemplaire, en enregistrant les données sur le poids du cocon, sur le poids de la coque et sur la richesse soyeuse. On sèche les cocons dans un four à air chaud. On chauffe l'étuve de séchage à 120° C lors du placement des cocons dans l'étuve d'étouffage. On place les cocons au début à une température élevée pour retirer l'humidité mélangée à l'air à l'intérieur du cocon à un taux plus rapide, de sorte que la couche interne de sérécine ne soit pas affectée. On sèche les cocons en utilisant la grille de 115° C (une heure) → 100° C (une heure) → 85° C → (une heure) → 70° C (une heure) → 55° C (une heure). On conditionne les cocons séchés à l'air chaud pendant une période minimum de 2 à 7 jours (Laxmipathaiiah et coll., (2000). On mesure la longueur du filament en utilisant une bassine équipée avec un mètre. Lors du dévidage d'un cocon, on sort le filament dévidé tous les 100 mètres de la bassine et on le range en séries, l'une après l'autre jusqu'à la couche la plus interne du cocon et on enregistre la longueur totale du filament. On dévide un minimum de 10 cocons de chaque exemplaire de manière similaire. On sèche chacune des sections de 100 m jusqu'à la dernière section dans une étuve d'étouffage à 100 ° C pendant une heure. Plus tard, on transfère les fils dans des dessiccateurs et on pèse chaque section immédiatement de manière à éviter l'absorption de l'humidité par le filament de soie. On pèse le filament de soie de la couche externe à la couche interne avec une balance Sartorius. On calcule le titre du filament en utilisant la formule suivante :

$$\text{Titre} = \frac{\text{Poids en grammes}}{\text{Longueur en mètres}} \times 9000$$

Le titre du filament de cocon a sa propre régularité spécifique et des nombres caractéristiques représentent les variations de finesse. Les couches des cocons sont différentes et la majorité des titres du filament que l'on enregistre sont les suivants : Le plus grossier → Grossier → Fin → Le plus fin.

On estime la relation entre la longueur du filament et la pente et entre le titre du filament et la pente par l'analyse de régression (méthode des moindres carrés). On estime la pente de la courbe du titre en appliquant la formule suivante :

$$b = \frac{\sum xy - (\sum x \sum y) / n}{\sum x^2 - (\sum x)^2 / n}$$

Où b = pente, x = longueur du filament, y = titre du filament et n = nbre d'observations.

La méthode des moindres carrés est une procédure pour utiliser les données échantillons afin de trouver l'équation de régression estimée. Les données individuelles proviennent de 67 lignées parentales polyvoltines et x est la longueur individuelle du filament (en mètres) et y est le titre du filament (d). Les valeurs de x et de y pour les 67 lignées polyvoltines sont résumées dans le Tableau I.

La pente (b) est la somme des carrés des écarts entre la valeur observée pour la longueur du filament (m) et le titre du filament (d).

Si la pente de l'équation de régression estimée est positive, cela signifie alors que la longueur du filament augmente ainsi que le titre du filament. D'autre part, si la pente de l'équation de régression est négative, cela signifie qu'alors que la longueur du filament augmente, le titre du filament diminue.

On emploie l'analyse de variance (ANOVA) pour comparer la longueur du filament et le titre moyen du filament entre les lignées.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données appartenant à 67 lignées parentales polyvoltines pour la longueur du filament, le titre du filament moyen, avec les valeurs maximum, minimum et moyennes et les valeurs de la pente sont présentées dans le Tableau I. Les résultats montrent que parmi les lignées, la longueur du filament est comprise entre un minimum de 287,95 (BMI-0020) et un maximum de 709,95 (BMI-0066) avec un coefficient de variation de 18,25 %. Le titre maximum du filament des lignées est compris entre un maximum de 3,87 pour BMI-0072 et un minimum de 2,25 chez BMI-0063. De même, le titre minimum du filament est compris entre 1,44 et 0,041, le plus faible, que l'on enregistre respectivement pour les lignées BMI-0061 et BMI-0054. Le titre moyen du filament est compris entre 1,65 (BMI-0065) et 2,66 (BMI-0068). L'analyse de régression réalisée (méthode des moindres carrés) pour trouver la pente exprimée comme valeur « b » indique que la valeur « b » est comprise entre 0,00192 et 0,00137, avec la valeur la plus basse de -0,00137 enregistrée pour BMI-0063, suivie par BMI-0013 (-0,00113) et par BMI-0029 (-0,00109). On enregistre la valeur maximum de 0,00192 pour BMI-0068, suivie par BMI-0038 (0,00126) et BMI-0065 (0,00085).

Sur 67 lignées parentales polyvoltines, un ensemble de 40 lignées présentent des valeurs négatives pour la pente et les 27 lignées restantes présentent des valeurs positives pour la pente. Parmi 40 lignées à pente négative, la longueur de filament la plus longue a été enregistrée chez BMI-0066 (709,957 m) suivie par BMI-008 (604,13 m) et BMI-0045 (495,13 m). De même, parmi les valeurs positives de la pente, on enregistre la longueur de filament la plus longue chez BMI-0072 (550,60m) suivie par BMI-0061 (514,43 m) et par BMI-0067 (469,28 m).

La relation entre la longueur du filament et la pente, le titre moyen du filament et la pente et le titre maximum du filament et la pente est présentée dans le Tableau II. L'analyse indique qu'il existe une relation non significative entre la pente et la longueur moyenne du filament. Cependant, il y a une relation très significative entre la pente et le titre moyen du filament ($r = 0,984^{**}$) et entre la pente et le titre maximum du filament ($r = 0,622$). Ces résultats confirment les observations de Suresh Kumar

et coll., (2002). Parmi les lignées parentales, BMI-0063 (TW × SK6 × SK1) et BMI-0013 (Guangnong Plain) ont enregistré la valeur la plus faible pour la pente de respectivement $-0,00137$ et de $-0,00113$.

La liste des lignées parentales polyvoltines sélectionnées est présentée dans le Tableau III. Sur 67 lignées parentales polyvoltines, ce tableau présente 20 lignées, c'est-à-dire les dix premières au titre fin et les 10 premières au titre épais. Parmi les lignées, BMI-0063 et BMI-0013 enregistrent la valeur la plus faible de la pente avec le titre fin. Parmi les lignées au titre épais, BMI-0072 enregistre la pente la plus faible, avec le filament le plus long.

Les dix meilleures lignées au titre fin, pour la longueur moyenne du filament et pour la valeur de la pente (b) parmi les 67 lignées parentales polyvoltines sont présentées dans le Tableau IV. Les données montrent que le titre du filament (denier) est compris entre un titre épais (grossier) de 1,83 d (BMI-0010) à fin de 1,65 d (BMI-0013). Par ailleurs, la longueur moyenne du filament est comprise entre un maximum de 438,70 m (BMI-0050) et un minimum de 313,08 m (BMI-0063). On calcule la pente de la courbe par la valeur « b » obtenue en employant l'analyse de régression (méthode des moindres carrés). En conséquence, la valeur « b » est comprise entre $-0,00137$ et $-0,00066$ avec une valeur inférieure de $-0,00137$ enregistrée pour la lignée BMI-0063 et la valeur la plus élevée de la pente de $-0,00066$ pour le titre fin enregistrée pour BMI-0055.

Ces lignées permettront aux sélectionneurs de mettre au point des lignées / des hybrides spéciaux avec un filament plus long, avec un titre à la régularité maximum de la couche externe à la couche interne du cocon. Ce type de classification permettra d'explorer les sources existantes de races pures pour en tirer des lignées commerciales, afin de répondre aux utilisations finales spécifiques de la soie dans l'intérêt du consommateur. La soie de qualité produite à partir d'elles convient à la production de vêtements, de foulards, de dentelle dorée, de sarees, de tissus soyeux et de fils chirurgicaux, etc..

De même, parmi les 67 lignées parentales polyvoltines, les 10 meilleures lignées au titre épais (grossier), pour la longueur moyenne de filament et pour la valeur de la pente (b) sont présentées dans le Tableau V. Les données montrent que le titre du filament (denier) est compris entre un titre épais (grossier) de 2,66 d (BMI-0068) à fin de 2,48 d (BMI-0072). Par ailleurs, la longueur moyenne du filament est comprise entre un maximum de 550,60 m (BMI-0072) et un minimum de 292,15m (BMI-0068). La valeur « b » est comprise entre 0,00069 à 0,00192 avec la valeur la moins importante pour la pente enregistrée pour la lignée BMI-0072 et la valeur la plus élevée de la pente pour le titre épais (grossier) enregistrée pour BMI-0068. Ces lignées permettront aux sélectionneurs de mettre au point des lignées / des hybrides au filament épais avec un filament plus long, une régularité maximum du titre de la couche externe à la couche interne du cocon. Cela permettra de produire de la soie doupion de catégorie internationale qui pourra aussi être utilisée pour le tissu de trame sur les métiers à tisser mécaniques à vitesse élevée et sur les métiers à tisser Rapier. Le fil de soie épais de qualité produit à partir de cette soie est adapté à la production de tissus épais pour les rideaux, la tapisserie, les housses de fauteuil, etc..

