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	H. BOUVIER	**Managing Director**
Rédacteur en Chef	G. CHAVANCY	**Chief Editor**
Rédacteur Adjoint	A. FOURNIER	**Deputy Editor**

COMITE DE REDACTION
EDITORIAL BOARD

BEAULATON J. (France)
BECK D. (France)
BOSQUET G. (France)
COUBLE P. (France)
DANDIN S.B. (Inde / *India*)
DAS B.C. (Inde / *India*)
DATTA R.K. (Inde / *India*)
DOIRA H. (Japon / *Japan*)
FONSECA T.C. (Brésil / *Brazil*)
FOURCHE J. (France)
FREDDI G. (Italie / *Italy*)
GOLDSMITH M.R. (USA)
IATROU K. (Canada)
JOLLY M.S. (Inde / *India*)
KAWAKAMI K. (Japon / *Japan*)
KOBAYASHI M. (Japon / *Japan*)
KRISHNASWAMY S. (Inde / *India*)
LEGAY J-M. (France)
LIU S-X. (Chine / *China*)
LU H-S. (Chine / *China*)
MANO Y . (Japon / *Japan*)
NARASIMHANNA M.N. (Inde / *India*)
PERSOONS C.J. (Pays-Bas / *Netherlands*)
PRUDHOMME J-C. (France)
REALI G. (Italie / *Italy*)
SHIMURA K. (Japon / *Japan*)
SHIRATA A. (Japon / *Japan*)
SOMASHEKAR T.H. (Inde / *India*)
SONWALKAR T.N. (Inde / *India*)
TAKAHASHI R. (Brésil / *Brazil*)
TAZIMA Y. (Japon / *Japan*)
VAGO C. (France)
VEY A. (France)
XIA J-G. (Chine / *China*)
YAMASHITA O. (Japon / *Japan*)

VOLUME 33 1993 NUMERO 2

SOMMAIRE - CONTENTS

Informations CSI i
ISC announcements ii

Actualités / News iii

Revue / Review :

Review on pebrine, a microsporidian disease in the silkworm, *Bombyx mori* L. 201
Revue sur la pébrine, une maladie microsporidienne chez le ver à soie *Bombyx mori* L. . . 211
C.S. PATIL

Articles originaux / Original papers :

Effect of age of male on ejaculation and behaviour of spermatozoa in the internal reproductive organs of the female silkmoth, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombycidae) 219
Effet de l'âge du mâle sur l'éjaculation et le comportement des spermatozoïdes dans les organes de reproduction internes du papillon femelle de *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombycidae) 223
C.M. KISHOR KUMAR & D.C. PAUL

Impact of differential feeding duration of parent on the larval and cocoon characters in the next generation of *Bombyx mori* L. 227
Impact de durées de nourrissage différentes des parents sur les caractères de la larve et du cocon à la génération suivante chez *Bombyx mori* L. 231
D.C. PAUL & D.C. DEB

Study on the productivity of differential feeding amount in sex-limited strains of the silkworm, *Bombyx mori* L., for egg and larval traits 235
Etude sur la productivité de souches de ver à soie *Bombyx mori* L. à marquage sexuel sur l'oeuf et la larve soumises à différents taux de nourrissage 243
P. TZENOV & N. PETKOV

Study on the food utilization in genetic sex-limited breeds for egg and larval traits of the silkworm, *Bombyx mori* L., at moderate, reduced and excess feeding amounts . . 247
Etudes sur l'utilisation de la nourriture chez des souches de ver à soie *Bombyx mori* L. à marquage sexuel de l'oeuf et de la larve en fonction des taux de nourrissage modéré, réduit et excédentaire 257
P. TZENOV

The sprouting broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) : acceptability of the non-host plants by *Bombyx mori* 263
Le brocoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) : acceptation de plantes non-hôtes par *Bombyx mori* 269
T. SHIMIZU & M. YAZAWA

Sensitivity of male germ cells to mitomycin C for induction of dominant lethals in the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombycidae) **273**
Etude de la sensibilité des cellules germinales mâles à la mitomycine C par mesure de l'induction de mutations létales dominantes chez le ver à soie du mûrier *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombycidae) 285
R.K. SINHA

Influence of abiotic factors on uzifly, *Exorista sorbillans* (Wiedemann) Beck, infestation on the silkworm (*Bombyx mori* L.) and assessment of crop loss in Malda District (West Bengal, India) **289**
Influence des facteurs abiotiques sur l'infestation par la mouche uzi *Exorista sorbillans* (Wiedemann) Beck du ver à soie (*Bombyx mori* L.) et évaluation des pertes de récolte dans le district de Malda (Bengale occidental, Inde) 297
S.S. BHATTACHARYA, N.G. CHAKRABORTY, B.P. NAIR & A.K. SAHAKUNDU

Assessment of generation means : a study from *Antheraea mylitta* D. **301**
Evaluation des valeurs moyennes dans diverses générations : étude sur *Antheraea mylitta* D. 309
A.A. SIDDIQUI, A.K. SENGUPTA, P.K. SRIVASTAV & A.K. GOEL

Plant regeneration and seedless fruit formation in nodal explant cultures of *Morus alba* L., cv. S_1 . . . . . **313**
Régénération des plants et formation de fruits sans graines par culture d'explants nodaux de *Morus alba* L., cultivar S_1 319
A. ZAMAN, R. ISLAM, M. HOSSAIN, M.A. BARI & O.I. JOARDER

Floral biological investigations in four *Terminalia* species **323**
Etude de la biologie florale de quatre espèces de *Terminalia* 329
P.K. SRIVASTAV, D.N. PRASAD & K.N. SINGH

Further studies on the occurrence of anomalous seedlings in *Terminalia* Linn. **333**
Nouvelles études sur la présence de plantules anormales chez *Terminalia* Linn. 339
P.K. SRIVASTAV, SHOVA BECK, MD. ISA & H.R. BANIA

Notes brèves / Brief notes :

Effect of temperature and humidity on hatching of eggs of the muga silkworm, *Antheraea assama* Ww., during incubation **343**
Effet de la température et de l'humidité au cours de l'incubation sur l'éclosion des oeufs du ver à soie muga *Antheraea assama* Ww. 349
A. BARAH, A.K SENGUPTA & M.V. SAMSON

Phytoalexins and their role in disease control with special reference to mulberry . . . **353**
Les phytoalexines et leur rôle dans la lutte contre la maladie, en particulier chez le mûrier 359
SUBRATA BISWAS & K. SENGUPTA

Bibliographie / Bibliography **363**

INFORMATIONS CSI

Comme nous l'avions annoncé précédemment, la Conférence statutaire et le Congrès international de sériciculture de la Commission séricicole internationale seront exceptionnellement découplés.

La XIVe Conférence de la CSI se tiendra les 8 et 9 décembre 1993 à l'Ambassade d'Indonésie à Paris. Cette conférence statutaire est réservée aux délégués officiels des Etats membres (5 délégués maximum par Etat, y compris le chef de délégation). Conformément aux statuts de la CSI, l'ordre du jour comprendra :

- le rapport d'activité du Secrétaire général ;
- l'élection du Bureau du Comité exécutif de la CSI (actuellement, les membres du Bureau sont : le Brésil, la France, l'Inde et la Thaïlande) :
- l'élection du Secrétaire général ;
- un communiqué présenté par chaque délégation sur la situation de la sériciculture dans son pays.

Le XVIe Congrès international de sériciculture de la CSI se tiendra à Bursa (Turquie) en juin 1994.

Les représentants des Etats membres et les Membres associés recevront prochainement les dossiers d'inscriptions.

Pour toute demande de dossiers d'inscription, prière de contacter le secrétariat de la CSI.

Au nom de tous les Etats membres, le Secrétaire général de la CSI remercie vivement le Gouvernement indonésien et le Gouvernement turc de leurs invitations, marquant ainsi leur soutien actif aux activités de la CSI.

ISC ANNOUNCEMENTS

As had previously been announced, the Statutory Conference and the International Congress of Sericulture of the International Sericultural Commission will exceptionally be held separately.

The XIVth ISC Conference will be held on 8-9 December 1993 at the Embassy of Indonesia in Paris. This statutory conference is reserved for the official delegates of Member States (with a maximum of 5 delegates per State, including the head of delegation). In accordance with the ISC's statutes the agenda will include :

- the progress report from the Secretary-General ;
- the election of the Board of the Executive Committee (at present the members of the Board are : Brazil, France, India and Thailand) ;
- the election of the Secretary-General ;
- a report presented by each delegation on the situation of sericulture in its country.

The XVIth ISC International Congress of Sericulture will be held in Bursa (Turkey) in June 1994. The representatives of Member States and Associate Members will receive the registration documents shortly.

All applications for registration documents should be made to the ISC secretariat.

On behalf of all the Member States, the ISC Secretary-General warmly thanks the Indonesian Government and the Turkish Government for their kind invitations which evince the great interest they take in the ISC activities.

ACTUALITES - NEWS

Grèce

Le 3e Atelier international sur la biologie et la génétique moléculaires des lépidoptères se tiendra à Kolymbari (Crète) du 21 au 26 août 1994. Pour de plus amples informations, contacter :

Greece

The 3rd International Workshop on the Molecular biology and molecular genetics of Lepidoptera will be held in Kolymbari (Crete) from 21-26 August 1994. For further information, contact :

Dr Ingrid Faye, Insect Immunology Unit Department of Microbiology, Stockholm University, S-106 91, Stockholm, Suède / Sweden.
Tel. : 46-8-612 95 52, Fax : 46-8-16 41 55.

République tchèque

Le XIe Atelier sur l'ecdysone se tiendra en République tchèque du 29 juin au 2 juillet 1994.
Pour tout complément d'information et demande d'inscription préliminaire, prière de contacter :

Czech Republic

The XIth Ecdysone Workshop will be held in the Czech Republic from 29 June to 2 July 1994.
Further information and preliminary application forms can be obtained from :

Dr Frantisek Sehnal, Institute of Entomology, Czech Academy of Sciences, Braniskovska 31, 370 05 Ceske Budejovice, République tchèque / Czech Republic.
Tel. : 42 38 817, Fax : 42 38 43625.

Review

REVIEW ON PEBRINE, A MICROSPORIDIAN DISEASE IN THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

C.S. PATIL*

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

The pebrine spore, despite its simple appearance under the microscope, causes a deadly disease in silkworms. The enormous amount of literature available from the time of Louis Pasteur to 1990 has been scattered in various journals and periodicals. It is important to gather all the information and readily make it available to the pebrine researchers in order to help them to develop efficient method(s) to control the disease. Hence, an attempt has been made to review the literature on various aspects of the pebrine disease. In addition, a note on future avenues of investigation in this field is included.

Keywords : Pebrine disease review, microsporidian spore, *Nosema bombycis* Naegeli, silkworm *Bombyx mori* L.

1. INTRODUCTION

"Pebrine", a microsporidian disease, has been considered as one of the most deadly diseases of the silkworm, *Bombyx mori* L. At one time or another, it has severely damaged sericulture in all the silk-producing countries of the world. In the middle of the 19th century, cocoon production declined sharply in Europe due to disease. The evidence showed that the pebrine outbreak started in France during 1845. France's total cocoon production, which had reached 26,000,000 kg in 1853 fell to only 4,000,000 kg in 1865. During this time the disease was so rampant that sericulture in France was on the verge of total collapse (Tatsuke, 1971). During the same period, the disease reached an epidemic stage in the regions of India. In 1875, the silkworm basic seed was completely destroyed due to pebrine in Kashmir, India (Lefroy, 1916). Again during 1960-65, high rates of disease (more than 40 %) were observed in Vietnam, Indonesia and in other South-East Asian countries (Anonymous, 1975). Thus pebrine has always played a decisive role in determining the future of the sericulture industry. The earliest research on pebrine was contemporaneous with the advancement of microbiology in the 19th century. However, much progress has been made after the discovery of malaria in the field of protozoology. Pasteur (1870) is the pioneer scientist in pebrine studies. Later, the works of Nerikii and Ito (1896), Ishiwata (1897), Stempell (1909), Mukerji (1919), Pringle-Jameson (1922, 1924), Ichikawa (1935), Ghosh (1949) and Weiser (1961) were mainly concerned with the epizootiology and prevention of disease.

Even though the fight against pebrine has continued for more than a century, loss due to the disease has not been completely eliminated. In fact, there appears to be a close relationship between the control of pebrine and the success of the sericulture industry. Therefore, it is essential, for the improvement of the sericulture industry, to acquire in-depth knowledge of this disease. Hence, an attempt has been made to review and discuss the research done on various aspects of pebrine disease.

---

* Present address : Dr C.S. Patil, Department of Microbiology, Washington State University, Pullman, WA, 99164-4233, USA.

2. CAUSATIVE ORGANISM AND ITS SYSTEMATIC POSITION

The name "pebrine" was coined by de Quadrefages (1860) because of the appearance of pepper-like spots in diseased larvae. The disease-causing microorganism was first observed in the hemolymph of silkworms and was given the name "hematozoid" (Guérin-Méneville, 1849). Naegeli in 1857 gave the pathogen a scientific name, *Nosema bombycis* ; belonging to the family : Nosematidae, order : Microspordia. Later Balbiani (1882) reiterated its position to sporozoa of the Phylum : Protozoa. Recently, Thomson (1960) and Sprague (1977) while listing microsporidians infecting insects presented the classification as,

Phylum : Protozoa
Order : Microsporidia Balbiani, 1882
Family : Nosematidae Labbe, 1899
Genus : *Nosema* Naegeli, 1857
Nosema bombycis Naegeli, 1857

Recently, based on the microsporidians' unusual cytological and molecular characteristics such as primitive type of nuclear division, devoid of mitochondria, prokaryotic-sized ribosomes and ribosomal RNAs, they have been phylogenetically considered as one of the earliest known eukaryotes (Vossbrinck *et al.*, 1987 ; Undeen and Cockburn, 1989).

3. CHARACTERISTICS OF DISEASE AND EFFECTS ON HOST

Pebrine disease symptoms vary depending on the age of the infected silkworms. Diseased larvae show symptoms like poor appetite, retarded development, irregularity in moulting and wrinkled skin with a slightly pale brown colour (Tatsuke, 1971 ; Jolly, 1986). The parasitised gut becomes opaque ; and white spots appear on the silk glands. Diseased larvae die due to the mechanical disruption of tissues caused by the pathogen attack. Deprivation of nutrients causes disturbance of the physiology and normal functions of larvae. The abdominal region swells in diseased pupae and sometimes black spots appear on the abdominal region (Ishihara, 1963). Deformed wings, distorted antennae and discoloured scales are observed in moths. Diseased moths lay loose eggs, sometimes in lumps, and contain a high percentage of unfertilised eggs. Low fecundity in the insects infected with microsporidian spores is reported (Veber and Jasic, 1961). Eggs infected with *N. bombycis* are found to be less coloured compared to normal (Masera, 1960).

The minimum number of spores required to initiate a disease in silkworms has been estimated. It appears to vary with the age of the host. For example, it has been determined that one to ten spores are sufficient to cause disease in II instar larvae, while one hundred spores are required in V instar larvae for the same symptoms to occur (Iwano and Ishihara, 1981). The larvae infected during the I or II instar show normal growth up to the III instar. Disease symptoms appear during the IV instar followed by death of the larvae resulting in discharging spores. During this period, oral infection takes place in healthy larvae and is called 2nd stage contamination. Larvae infected during the IV and V instars undergo eclosion and lay contaminated eggs. This phenomenon is termed *transovum* transmission. Transovarially infected larvae show disease symptoms in the II instar and die during the III and IV instars. The rate of infection is high in the I, II and V instars and low in middle instars. It has been observed that the longevity of instars and the amount of feeding are some factors which influence the rate of disease manifestation (Ishihara and Fujiwara, 1965).

The effects of *N. bombycis* on its host are more severe than those caused by other microsporidians. Tissue damage to different organs of silkworms has been studied in detail (Mitani, 1920, Hassanein and Ibrahim, 1959 ; Wafa and Kotby, 1971 ; Abe and Fujiwara, 1979 ; Fujiwara, 1979). Localization of pathogens in the muscular and nervous systems causes the disturbance to the functioning of organs which leads to disorganization (Wafa and Kotby, 1971). On the other hand, Issi and Onatski (1984) showed that presporulation stages do not damage the tissues but seem to have stimulatory effects at the cellular and organ levels.

The pathogens are first observed to infect the midgut of the host. The sporoplasm (germ cells) from the lumen of the midgut pass through the intestinal wall and reach the hemolymph through the

hemocelic spaces (Oshima, 1975). Later, these germ cells are transported to different organs through the circulating body fluid and establish colonies in the cells of those organs. The schizonts assembled in the central regions of the eggs find their way into newly formed embryonic cells in the gut soon after embryo formation. Therefore, the midgut epithelium of young larvae is found full of schizonts and spores (Stempell, 1909). Sequential tissue damage studies (Mitani, 1920) have identified shizonts in the midgut tissues after 24 hours of infection, while mature spores were observed on the 3rd day of infection and onwards in various tissues.

4. PURIFICATION OF SPORES

Isolation and purification of spores from the host is a primary step in studying pebrine disease. To isolate spores, the diseased larvae are homogenised in sterile water. Large pieces of tissue debris are removed by filtering the homogenate through a fine meshed cloth. Further purification may be achieved through differential centrifugation as proposed by different workers (Vavra and Maddox, 1976). However, serological and biochemical studies of microsporidians require a high degree of purity. Cole (1970) achieved purity of more than 90 % based on triangular and counter current distribution chromatography. A rapid method for concentrating *Nosema* spores based on continuous flow centrifugation was described (Gochnaner and Margetts, 1980) ; another method based on brownian movement was described (Hostounsky, 1981). Sato and Watanabe (1980) purified spores using sucrose and percol gradient centrifugations. In the sucrose gradient of 50-60 % (w/w) centrifugation the mature spores did not clearly separate from immature spores and cell debris, while a band consisting of only mature spores with a recovery rate of 90 % was possible in percol gradient. Centrifugation using percol at 73000 g for 30 minutes resulted into 3 bands : (1) a sharp band consisting of tissue debris of silkworms, cell debris of mulberry leaf, bacteria, etc. ; (2) a dim band consisting of mature but inactive spores ; (3) another sharp band consisting of only mature and active spores.

5. SIZE, STRUCTURE AND LIFE CYCLE

A mature spore is oval (egg-shaped). It measures approximately 3.6 ± 0.2 µm in length and 2.0 æ 0.3 µm in width. The biology of the pathogen has been the basis of disease control and hence it has been extensively investigated (Stempell, 1909 ; Omori, 1912 ; Iwabuchi, 1913 ; Kudo, 1916 ; Paillot, 1928). When a silkworm ingests a spore through contaminated food, by the alkaline action of digestive juice the spore is stimulated to extrude a long polar filament with a length 30 times greater than its size. The extrusion of the filament is of vital importance to the ability of the pathogen in invading the host cells (Oshima and Suzuki, 1939 ; Ishihara, 1968a). The sporoplasm (germ cell) is released from the spore through the tubular polar filament (Oshima, 1937 ; Kramer, 1960 ; Lom and Vavra, 1963). *In vitro* extrusion of the polar filament has been studied by suspending spores in alkaline solutions of KOH-KCl or K_2CO_3. Oshima (1965) pointed out that the potassium ion concentration, pH and temperature are some factors influencing the extrusion of polar filament. Further, he suggested that the silkworm gut juice has high potassium ion concentration and its optimum pH range is suitable in stimulating spores for extrusion of polar filaments like that of K_2CO_3-$KHCO_3$ solutions.

The binucleate sporoplasm (germ cell) is released into the hemolymph through the polar filament (Ishihara, 1969). It moves freely along with the circulating hemolymph and reaches every part of the body penetrating into various tissues through the intracellular spaces ; at this stage these germ cells are called planonts (Stempell, 1909). Infection is established when nuclei of the sporoplasm penetrate into the host cells and begin the intracellular development. This stage is called the meront stage. Mature spores are formed due to multiplication by fission. The spore completes its life cycle within 4 days. Ishihara (1969) and Takizawa *et al.* (1975) have studied the complete developmental stages of the pathogen. The mature spore is a unicellular endomembranous differentiation of its sporoblast (Vavra, 1974b, 1976).

With the application of electron-microscopic techniques to microsporidians, it has been possible to study precisely the various developmental stages as well as the fine structure of spores. The observed characteristics have facilitated the differentiation of species. The number of coils of the polar

filament and the angle of tilt of these coils have been considered as useful characters in distinguishing the species with morphologically similar characters (Burges *et al.*, 1974). Recently, Sato and Watanabe (1986a) during the studies of developmental stages of three *Nosema* species (M11, M12 and *Pleistophora* species) reassigned the position of *Nosema* M12 species ot the genus *Vairimorpha* based on spore ultrastructure.

6. SURVIVAL OF PATHOGEN IN THE ENVIRONMENT AND SEASONAL INCIDENCE OF DISEASE

Generally, the survival of microsporidians in the environment is influenced by a large number of factors like temperature, humidity and biotic components of the substrate on which they are found (Kramer, 1976). Survival of *N. bombycis* for less than 2 months in moist fermenting materials has been reported (Kudo, 1930). Studies conducted on the viability of pebrine spores in soil and compost under tropical conditions showed survival of spores for a maximum period of 225 days in wet soil and a minimum of 135 days in wet compost (Patil and Muniraju, 1991). Apparently, spores coated with tissues and spores present under humid conditions have been found to be viable for several years (Anonymous, 1975). On the other hand, naked spores are susceptible to dessiccation and thus lose infectivity very quickly. Maddox (1973) is of the opinion that survival of microsporidian spores depends on the kind of material (substrate) in which they are found, in addition to the moisture content of the material.

The adverse effects of environmental conditions on microsporidian spores, especially sunlight, have been well documented (Brooks, 1982 ; Kaya, 1977 ; Sikorowski and Lashomb, 1977 ; Wilson, 1974). Sunlight contains ultraviolet light (UV) which has a sporicidal effect (Nilova, 1974). The amount of actual UV content of sunlight reaching the earth's surface depends on the prevailing atmospheric conditions (Coulson, 1975) and solar angle (Withrow and Withrow, 1956). In addition, the intensity and amount of bright sunlight (high UV content) available to spores depends on the seasons of the year and duration of time for which spores are exposed (Patil *et al.*, 1991). The overall effect of the above parameters is directly related to the rate of inactivation of spores.

Because the pebrine disease is the deadliest of silkworm diseases, its intensity and relationship with prevailing weather conditions has been well studied over time (Aoki, 1962, Dasgupta, 1950 ; Pringle-Jameson, 1922, Noamani *et al.*, 1971) and the results found were highly variable. Pringle-Jameson (1922) observed a high incidence of disease during August-September and stated that a moist atmosphere is more conducive for the disease development. Aoki (1962) is of the opinion that silkworms reared under dry and cool conditions become more susceptible to disease than the silkworms reared in hot and moist conditions. On the other hand, Noamani *et al.* (1971) noticed the highest intensity of pebrine disease during July-August, closely followed by November-December, and suggested that there appeared to be no correlation between the incidence of disease and either temperature or humidity. However, the factors involved in the disease initiation and development include the pathogen numbers, host population and an efficient means of transmission agent(s). Apparently, all these factors are affected by other abiotic factors (Tanada, 1963).

7. HOST SPECIFICITY AND DISEASE RESISTANCE IN HOST

Most microorganisms prefer to have alternative hosts because of many advantages for them in dispersal, transmission and survival. There are several reports on the wide range of hosts to *N. bombycis* ; it exceeds 25 lepidopterans (Machay, 1957 ; Kashkarova, 1981 ; Kashkarova and Khakhanov, 1980 ; Srikanta, 1987). Studies in multiplication of *N. bombycis* in cell lines of *Manduca sexta* (Streett and Lymn, 1984) and in *Antheraea eucalypti* (Kawarbata and Ishihara, 1984 ; Sato and Watanabe, 1986b, 1986c) have been shown. Interestingly, Ishihara (1968b) and Mescheryakov *et al.* (1984) reported the development of *N. bombycis* in mammalian cells. However, in addition to *N. bombycis*, other microsporidians belonging to the genera, *Nosema*, *Pleistophora* and *Thelohania*, were found to infect the silkworm, *B. mori* (Tanaka *et al.*, 1972 ; Fujiwara, 1980, 1984 ; Fujiwara *et*

al., 1985 ; Patil, 1989 ; Sato *et al.*, 1981). Nevertheless, most of the *Nosema* species, especially those from Lepidoptera, have a wide host range.

Recently, the research on disease resistant races (strains) has been paid much attention. There has been evidence showing resistance in silkworms against microsporidian infections (Tanada, 1963). Masera (1957) reported that Chinese White silkworm races are more resistant to pebrine spores than others. More recently, Patil and Geetha Bai (1989) showed the high resistance of Indian multivoltine races to pebrine disease compared to exotic bivoltine races. Although the disease resistance appears to depend on the genetic constituents of a particular race, nevertheless factors such as pathogen number, inadequate nutrition and the environment in which the insects are reared may also affect resistance. In addition, the physical and physiological characteristics of hosts may make the invasion of microsporidians possible (Weiser, 1969 ; Brooks, 1971). However, the studies directed towards the factors responsible for differential host resistance for a particular pathogen are limited.

8. BIOCHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL INVESTIGATIONS

The main reason for investigating the biochemical and immunological aspects of parasitic microsporidians is precisely to understand their biology : the host parasitic relationships and the taxonomy which would be useful for developing a method for the control of disease. Apparently, in the process of such investigations, many new and exciting discoveries have been made which, although not immediately applicable, have immense value in the long run.

Earlier, the identification of pathogens was mainly based on morphological characters observed with light and electron microscopy, but the dimorphism exhibited by microsporidians caused difficulties in accurate identifications (Hazard and Weiser, 1968). This gave an impetus to study the biochemical characters. Ishihara and Hayashiya (1968) determined the sedimentation value of monoribosomes from the sporoplasm of *N. bombycis* as 70S (typical of lower protista) by sucrose density centrifugation. Later, the nature of metachromatic granules, distribution of ribosomes within the spores, their sedimentation coefficients and chemical composition of the spore wall of *Nosema* species were studied (Erickson and Sprague, 1970). Further identification of various microsporidian species was achieved using polyacrylamide gel electrophoresis (Fowler and Reeves, 1974a, 1974b) and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Streett and Briggs, 1982). The polypeptides separated with the above methods provided reproducible electrophoretic profiles.

The presence of juvenile hormone (JH) activity in microsporidian spores has been reported (Fisher and Sanborn, 1964 ; Erickson and Sprague, 1970). The possible explanation suggested was that the microsporidian parasite either produces a chemical with an activity similar to that of JH or the parasite absorbs JH from the host hemolymph. It has been reported that microsporidia-infected larvae undergo super-numerary moults (Fowler and Reeves, 1975 ; Milner, 1972), a condition which is characteristic of abnormally high or persistent levels of JH. This would indicate that infection of *N. bombycis* may have some effect on the endocrine system of silkworms which eventually may lead to the extension of the larval period which would enable the parasite to continue multiplication for its complete development.

Recently, immunological techniques have been applied for detection of pathogens and species identification. *Nosema bombycis* and closely related species were diagnosed with the use of antibody sensitised latex (Grobov and Rodoinova, 1985 ; Hayashiya and Ayuzawa, 1987 ; Li, 1985), the use of ELISA procedures (Kawarbata and Hayashiya, 1987 ; Watanabe, 1987) and with fluorescent antibody technique (Sato *et al.*, 1981). These tests are mainly used for early detection of causative organisms and thereby help to adapt suitable control measures. Of late, development of monoclonal antibody techniques (Kohler and Milstein, 1975) has provided a means for the rapid diagnosis of microsporidians in silkworms. In addition, monoclonal antibodies have been also used for identification of specific microsporidians. Zhaoxi Lee *et al.* (1990) raised monoclonal antibodies against *N. bombycis* spores and applied them to identify *N. bombycis* and other closely related microsporidian spores infecting silkworms using the ELISA procedure.

9. DISEASE CONTROL / PREVENTIVE MEASURES

Most of the attempts made for control of protozoan diseases in insects have been concerned with the pebrine in silkworms and in honeybees. Apparently, the biology of pathogen has been used as a basis in disease control. The earliest method postulated by Pasteur (1870), based on the selection of pathogen-free eggs through the examination of mother moths for pathogens, has been extraordinarily successful. Perhaps, it is the only method still widely used with few modifications. Recently, a simple negative staining procedure (Geetha Bai *et al.*, 1985) and an immunoperoxidase staining procedure (Han and Watanabe, 1987) have been developed for the clarity during examination of spores in grainages. Individual moth examination has been in practice for reproductive or seed cocoon eggs while mass moth examination based on a sampling procedure has been employed during commercial egg preparation. To maintain the quality, several attempts have been made to improve the sampling procedure from time to time (Oshima, 1950, 1960 ; Kurisu, 1986 ; Kurisu and Hamazaki, 1986 ; Kurisu *et al.*, 1983, 1984, 1985).

Destruction of disease-causing microorganisms at various levels is another method for controlling the disease. Exposing all the contaminated materials and equipment to direct sunlight has been traditionally a practice in villages (Patil and Dandin, 1990). However, the pathogens lurking in rearing rooms, roofs, etc., cannot be eradicated by sunlight. The most effective and simple eradication method is to disinfect with 2-3 % formalin solution. Other than formalin, bleaching powder and sodium hypochlorite are also widely used (Anonymous, 1975). The pathogen-killing action of disinfectants has been influenced by several factors such as temperature, humidity, concentration of chemicals and duration of treatment (Kagawa, 1980).

However, earlier workers (Astaurov, 1974 ; Bendnyakova and Tereiskaya, 1959 ; Li Ai Qun, 1962) suggested that treatment of pebrinised eggs with hot water controls pebrine disease. On the other hand, Smyk (1959a), who experimented with heavily infected batches, reported varying success using the above method. *Nosema bombycis* parasitising the diapause eggs of silkworms was effectively controlled when cold-stored (5 °C) pebrinised eggs were treated with 20 % HCl at 48 °C for 5 minutes (Fujiwara and Kagawa, 1984).

Chemical control of pebrine disease attempted by several workers was found to have limited success (Alenkseenok, 1986 ; Baig *et al.*, 1988 ; Iwano and Ishihara, 1981 ; Liu *et al.*, 1979 ; Masera, 1938 ; Patil *et al.*, 1984-85 ; Xian, 1987). Of several therapeutic drugs tested against the pebrine disease, Benlate, Nosematol and Bavistin have been found fairly effective. However, their efficiency in the field has yet to be evaluated.

10. FUTURE PROSPECTS

The control of pebrine disease has been attempted mainly in two ways, (1) breaking the pathogen transmission cycle through mother moth examination and elimination of diseased seeds and (2) use of chemicals in control of disease. The first method has been considered as more appropriate. Apparently, the use of chemicals as a means of control has not been very successful in silkworms compared to other areas of protozoology. Most of the presently tested chemicals were empirically selected and conventionally tried. Perhaps, a more rational approach is required. Good knowledge of the biochemistry of both the parasite and the host to identify a potential target(s) for chemical agents is essential. This knowledge will be vital in future attempts for a more effective chemical therapy directed towards specific target sites. Perhaps, chemicals can also be used to influence the intestinal microflora which in turn may inhibit pathogen activity. Hence, there is vast scope for such a type of research.

Secondly, little is known about the molecular aspects of disease resistance in silkworms and mechanism of gene action. With the great advances in molecular biology and recombinant DNA technology in recent years, it appears that it may be possible to identify, isolate, purify and clone resistant genes from pebrine-resistant silkworm races and inject them into productive susceptible ones, thus leading to the development of pebrine-resistant breeds.

Lastly, the excellent tools presently available in the form of tissue culture, electron microscopy, biochemical and serological techniques will be useful for the study of problems involving the biology,

host parasite interactions, taxonomy, etc. Such studies would help to rapid diagnosis of *N. bombycis* spores and other closely related microsporidians infecting silkworms. This knowledge could also be used for epidemiological studies of microsporidians in natural epizootics.

REFERENCES

ABE Y., FUJIWARA T. (1979) Mode of multiplication of a protozoan, *Pleistophora* sp. (Mocrosporidia : Nosematidae) in the midgut epithelium of silkworm larvae. J. Sericult. Sci. Jpn., 48(1), 19-23.
BURGES H.D., CANNING E.U., HULLS I.K. (1974) J. Invetebr. Pathol., 23, 135-139.
COLE J.R. (1970) J. Invertebr. Pathol., 15, 193-195.
COULSON K.L. (1975) *In* Solar and Terrestrial Radiation. Academic Press, New York, 143-145.
DASGUPTA M.R. (1950) Diseases of silkworm. *In* Monographs on Cottage Industries. Govt. of India Publication, No. 1, p. 9.
ERICKSON B., SPRAGUE V. (1970) Proc. Int. Colloq. Insect Pathol., Maryland, 25-28 August 1970.
FISHER F.M. Jr, SANBORN R.C. (1964) Biol. Bull., 126(2), 235-252.
FOWLER J.L., REEVES E.L. (1974a) J. Invertebr. Pathol., 23, 3-12.
FOWLER J.L., REEVES E.L. (1974b) J. Invertebr. Pathol., 23, 63-69.
FOWLER J.L., REEVES E.L. (1975) J. Invertebr. Pathol., 25, 349-353.
FUJIWARA T. (1979) Infectivity and pathogenicity of *Nosema bombycis* to larvae of the silkworm. J. Sericult. Sci. Jpn., 48(5), 376-380.
FUJIWARA T. (1980) Three microsporidians (*Nosema spp.*) from the silkworm, *Bombyx mori*. J. Sericult. Sci. Jpn., 49(3), 229-236.
FUJIWARA T. (1984) *Theloania* sp. (Microsporidia : Thelohaniidae) isolated from the silkworm. J. Sericult. Sci. Jpn., 53(5), 459-460.
FUJIWARA T. (1985) Microsporidia from silk moths in egg production sericulture. J. Sericult. Sci. Jpn., 54(2), 108-111.
FUJIWARA T., KAGAWA T. (1984) Control of *Nosema bombycis* parasitizing silkworm eggs by treatment with hydrolic acid or exposure to various temperature. J. Sericult. Sci. Jpn., 53(5), 394-398.
FUJIWARA T., KAGAWA T., ANDOU H. (1985) *Nosema bombycis* like microsporidia isolated from the silk moth in egg production sericulture. J. Sericult. Sci. Jpn., 54(2), 117-121.
GEETHA BAI M., PATIL C.S., KASTURI BAI A.R. (1985) A new method for easy detection of pebrine spores. Sericologia, 25(3), 297-300.
GHOSH C.C. (1949) *In* Silk Production and Weaving in India. CSIR, Monograph, India.
GROBOV O.F., RODIONOVA Z.E. (1985a) Veterinariya Moscow, USSR, 12, 70-71.
GROBOV O.F., RODIONOVA Z.E. (1985b) Trudy Vsesoynznogo. Inst. Eksperimental Veterinarii, 62, 112-116.
GUERINE-MENEVILLE (1849) *cit. in* Pebrine disease of silkworm, a technical report, Ed. Tatsuke K. (1971). Overseas Technical Co-operation Agency, Tokyo, Japan.
HAN M.-S., WATANABE H. (1987) Immunoperoxidase-staining methods for discrimination of microsporidian spores in the pebrine inspection of silkworm mother moths. J. Sericult. Sci. Jpn., 56(5), 431-435.
HASSANEIN M.H., IBRAHIM M.M. (1959) Bull. Soc. Entom. Egypt, 44, 303-314.
HAYASAKA S., AYUZAWA C. (1987) Diagnosis of microsporidians, *Nosema bombycis* and closely related species by antibody-sensitized latex. J. Sericult. Sci. Jpn., 56(2), 169-170.
HAZARD E.I., WEISER J. (1968) J. Protozool., 15, 817-823.
ICHIKAWA T. (1935) Sanshitaiho, 44, 244-250.
ISHIHARA R. (1963) J. Insect Pathol., 5, 131-140.
ISHIHARA R. (1967) Can. J. Microbiol., 13, 1321-1332.
ISHIHARA R. (1968a) J. Invertebr. Pathol., 11, 328-329.
ISHIHARA R. (1968b) J. Invertebr. Pathol., 12, 245-258.
ISHIHARA R. (1969) J. Invertebr. Pathol., 14(3), 316-320.
ISHIHARA R., FUJIWARA T. (1965) J. Insect Pathol., 7, 126-131.
ISHIHARA R., HAYASAKA Y. (1968) J. Invertebr. Pathol., 11, 377-385.

ISHIHARA R., SAHI S.S. (1966) J. Invertebr. Pathol., 8, 538-540.
ISHIWATA T. (1897) Tokyo Sangyo Koshujo Hokoku, 13, 142-195.
ISSI I.V., ONATKSI N.M. (1984) Protozoologia, 9, 102-113.
IWABUCHI H. (1913) Tokyo Sangyo Koshujo Hokoku, 48, 1-65.
IWANO H., ISHIHARA R. (1981) Inhibitions effect of several chemicals against the hatch of *Nosema bombycis* spores. J. Sericult. Sci. Jpn., 50(4), 276-281.
JOLLY M.S. (1986) Pebrine and its control. CSB Publication, Bangalore, India.
KAGAWA T. (1980) The efficacy of *Nosema bombycis* spores. J. Sericult. Sci. Jpn., 49(3), 218-222.
KASHKAROVA L.F. (1981) Zashchita Rostenil, 9, 28-29.
KASHKAROVA L.F., KHAKHANOV A.I. (1980) Parazitologiya, 14(2), 164-167.
KAWARBATA T., ISHIHARA R. (1984) J. Invertebr. Pathol., 44, 52-62.
KAWARBATA T., HAYASAKA S. (1987) J. Invertebr. Pathol., 50(2), 118-123.
KAYA H.K. (1977) J. Invertebr. Pathol., 26, 329-332.
KOHLER G., MILSTON C. (1975) Nature, 256, 495-497.
KRAMER J.P. (1960) J. Invertebr. Pathol., 2, 433-439.
KRAMER J.P. (1976) The extra corporeal ecology of Microsporidia. *In* Comparative Pathobiology. Vol. I Ed. by Bulla Lee A. Jr. and Cheng T.C., Plenum Press, ISDA, Manhattan, Kanswa, USA, pp. 127-135.
KUDO R. (1916) Bull. Seric. Exp. Sta. (Tokyo), 1, 31-51.
KUDO R. (1930) Microsporidia. *In* Problems and Methods of Research in Protozoology. Eds. Henger and Andrew, MacMillan Co., New York, pp. 325-347.
KURISU K. (1986) Simplified calculation of the operating characteristics in the pebrine inspection of the grouping mother method. J. Sericult. Sci. Jpn., 55(4), 351-352.
KURISU K., HAMAZAKI M. (1986) J. Sericult. Sci. Jpn., 55(2), 127-134.
KURISU K., YAMAMOTO H., NAKAO T. (1983) Bull. Fac. Text. Sci.,
KURISU K., NAKAO T., DOHI M., HAMAZAKI M. (1985) Bull. Fac. Text. Sci., Kyoto Univ. Ind. Arts and Text. Fibres, 11(1), 19-30.
LEFROY H.M. (1916) Report on an inquiry into the silk industry in India. Govt. of India Publication, Calcutta.
LI AI QUN (1962) *cit. in* Liu S.X. and Zhong W.B. (1990) The research channels in the prevention anc control of silkworm diseases. Sericologia, 28(3), 287-295.
LI D. (1985) Canye Kexue, 11(1), 99.
LIU S.X. *et al.* (1979) Sci. of Sericult., China, 7(1), 63-64.
LOM J., VAVRA J. (1963) Acta Protozool., 1, 81-90.
MACHAY M.L. (1957) Folia Entomol. Hungarica, 359-366.
MADDOX J.V. (1973) Misc. Publ. Entomol. Soc. Amer., 9, 99-104.
MASERA E. (1938) Padova, 54, 8.
MASERA E. (1957) *cit. in* Insect Pathology, ed. by E.A. Steinhaus. Academic Press. New york.
MASERA E. (1960) J. Silkworm, 13, 123-133.
MESCHERYAKOV A.A., GROBOV O. F., KHAKONOV A.J. KASHKAROVA L.F. (1984) Referativnyi Zhurnal Biologiya, 8, 112.
MILNER R.J. (1972) J. Invertebr. Pathol., 19, 248-255.
MITANI (1920) *cit. in* Pebrine and its control. Jolly M.S. (1986) CSR & TI, Mysore, CBS Publication, Bangalore, India.
MUKERJEE N.G. (1919) Handbook of Sericulture. Bengal Secretariat Book Depot, Calcutta, India.
NAEGELI (1857) *cit. in* Pebrine disease of silkworm, a technical report. (Ed. Tatsuke K. 1971). Overseas Technical Cooperation Agency, Tokyo, Japan.
NERIKI Y., ITO T. (1896) Tokyo Sangyo Koshiyo Hokoku, 12, 236-273.
NILOVA G.N. (1974) Parasitologia, 8, 463-468.
NOAMANI K.R., KRISHNASWAMI S., SAHU KUNDU A.K. (1971) Indian J. Sericulture, 10(1), 101-104.
OMORI J. (1912) Arab Kais Gesundh. 40, 108-122.
OSHIMA K. (1937) Parasitologia, 29, 220-224.

OSHIMA K. (1950) Pebrine and the inspection method of silkworm (*Bombyx mori* L.) moth. Raw Silk Bureau, Ministry of Agriculture and Forestry, Japan.
OSHIMA K. (1960) Japan J. Appl. Entomol. Zool., 4, 212-225.
OSHIMA K. (1964) Japan J. Zool., 14, 209-229.
OSHIMA K. (1965) Annot. Zool. Jpn., 38, 134-139.
OSHIMA K. (1975) Annot. Zool. Jpn., 48(1), 21-32.
OSHIMA K., SUSUKI M. (1939) Dobysugaku Zasshi, 51, 134-139.
PAILLOT A. (1928) Comp. Rend Biol. Soc., 99, 81 -83.
PASTEUR L. (1870) Etudes sur la maladie des vers à soie, *cit. in* Pebrine disease of silkworms, a technical report. (Ed., Tatsuke K. 1971). Overseas Technical Cooperation Agency, Tokyo, Japan.
PATIL C.S. (1989) Entomon, 14 (3 & 4), 207-210.
PATIL C.S., DANDIN S.B. (1990) Indian Silk, 28(4), 11-14.
PATIL C.S., GEETHA BAI M. (1985) Guidelines for identification of pebrine spores in grainages. KSSDI Publication, Bangalore.
PATIL C.S., GEETHA BAI M. (1989) J. Appl. Entomol., 108, 421-423.
PATIL C.S., MUNIRAJU E. (1991) Indian J. Sericult. (in press).
PATIL C.S., SHARADAMMA P., KRISHNA M. (1991) Indian J. Sericult. (in press).
PATIL C.S., *et al.* (1984-85) Chemical control of pebrine disease. *In* Annual reports of KSSDI, Thalaghattapura, Bangalore.
PRINGLE-JAMESON (1922) *cit. in* Report on the disease of silkworm in India. (Ed. Pringle-Jameson A 1984). Government of India Publication, Calcutta, India.
PRINGLE-JAMESON (1924) Illinois Biol. Microbiol., 9(2&3), 130-163.
QUADREFAGUE A. DE. (1860) *cit. in* Pebrine disease of silkworms, a technical report, (Ed), Katsuke K. (1971). Overseas Technical Cooperation Agency, Tokyo, Japan.
SATO R., WATANABE H. (1980) Purification of mature microsporidian spores by isodensity equilibrium centrifugation. J. Sericult. Sci. Jpn, 49(6), 512 -516.
SATO R., WATANABE H. (1986a) Sporogonial sequence in three Microsporideae pathogenic to the silkworm, *Bombyx mori* L. J. Sericult. Sci. Jpn, 55(1), 10-26.
SATO R., WATANABE H. (1986b) Pathways of oral infection with four Microsporideae in the silkworm, *Bombyx mori* L. J. Sericult. Sci. Jpn, 55(1), 17-22.
SATO R., WATANABE H. (1986c) J. Sericult. Sci. Jpn, 55(1), 28 -32.
SATO R., KOBAYASHI M., WATANABE H., FUJIWARA T. (1981) J. Sericult. Sci. Jpn., 50, 180-184.
SATO R., MASAHIKO K., WATANABE H. (1982) Serological discrimination of several kinds of microsporidian spores isolated from the silkworm, *Bombyx mori* L., by an indirect fluorescent antibody technique. J. Invertebr. Pathol., 40, 260 -265.
SIKOROWSKI P.P., LASHOMB J.H. (1977) J. Invertebr. Pathol., 39, 95 -96.
SMYD D. (1959) Méthodes physiques de lutte contre *Nosema bombycis* dans les graines du ver à soie du mûrier. Revue du Ver à Soie, 11, 155-164.
SPRAGUE V. (1977) Systematics of the Microsporidia. *In* Comparative Pathobiology, vol. II. (Eds) Bulla L.A., Cheng T.C. Plenum Publishing Corporation, New York.
SRIKANTA H.K. (1987) Studies on the cross infectivity and viability of *Nosema bombycis*. M.S. Thesis, Univ. Agri. Sci., Bangalore.
STEMPELL W. (1909) Arch. Protistenk, 17, 281-358.
STREETT D.A., BRIGGS J.D. (1982) J. Invertebr. Pathol., 40, 159-165.
STREETT D.A., LYMN D.E. (1984) J. Parasitol., 70(3), 452-454.
TAKIZAWA H., VIVIER E., PETITPREZ A. (1975) J. Protozool., 22, 359-368.
TANADA Y. (1963) Epizootiology of infectious diseases. *In* Insect Pathology, Ed by E.A. Steinhaus, vol. II, pp. 423-475, Academic Press, New York.
TANAKA Y. (1953) Advan. Genetics. 5, 239-317.
TANAKA S., SHIMIZU T., KOBAYASHI M., ISHIHARA R. (1972) J. Sericult. Sci., Japan, 41, 89-95.
TATSUKE K. (1971) Ed. Pebrine disease in silkworms, a technical report; Overseas Technical Cooperation Agency, Tokyo, Japan.

THOMSON H.M. (1960) J. Invertebr. Pathol., 2, 346-385.
TRAGER W. (1937) J. Parasitol., 23, 226-227.
UNDEEN A.H., COCKBURN A.F. (1989) J. Invertebr. Pathol., 54, 132-133.
VAVRA J. (1974b) Proc. Int. Cong. Parasitol., Munchen; Germany.
VAVRA J. (1976) Biology of the Microsporidia. *In* Comparative Pathobiology, vol. I. (Eds) BULLA L.A., CHENG T.C. Plenum Publishing Corporation, New York.
VAVRA J., MADDOX J.V. (1976) Methods in microsporidiology. *In* Comparative Pathobiology, vol. I. (Eds) Bulla L.A., Cheng T.C. Plenum Publishing Corporation, New York.
VEBER J., JASIC J. (1961) J. Insect. Pathol., 3, 103-111.
VOSSBRINK C.B., MADDOX J.V., FRIEDMAN S., DEBRUNNER-VOSSBRINK B.A., WOESE C.R. (1987) Ribosomal RNA sequence suggests Microsporidia are extremely ancient eukariotes. Nature. 326, 411-414.
WATANABE H. (1987) J. Sericult. Sci. Jpn. 56(5), 431-435.
WAFA A.K., KOTBY F.A. (1971) Bull. Ent. Soc. Egypta. 55, 259-274.
WEISER J. (1969) Immunity of insects to protozoa. *In* Insect immunity to parasitic animals. Ed. by Jackson C.J., Herman R., Singer I., 129-147. Appleton Century Crofts, New York.
WILSON G.G. (1974) Canad. J. Zool., 52, 59-63.
WITHROW R.B., WITHROW A.P. (1956) Generation, control and measurement of visible and near visible radiant energy. *In Radiation Biology, vol. III, ed by Hollaender A. MacGraw Hill Book Co., Inc., New York, 125-128.*
XIAN LIU SHI (1978) J. Sericult. Sci. China, 27(3), 405-410.
ZHAOXI LEE W. XIE, XUNZHANG W., QINGXING L., ZHELONG PU. (1990) J. Invertebr. Pathol., 56, 395-400.

Revue

REVUE SUR LA PEBRINE, UNE MALADIE MICROSPORIDIENNE CHEZ LE VER A SOIE, *BOMBYX MORI* L.

C.S. PATIL

Karnataka State Sericulture Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore - 560 062, Inde.

La spore de pébrine, malgré la simplicité de son aspect au microscope, est responsable d'une maladie mortelle chez le ver à soie. Une quantité considérable de documentation a été accumulée depuis l'époque de Louis Pasteur jusqu'en 1990, dispersée dans diverses revues et périodiques. Il a donc été jugé important de réunir toutes ces informations afin de les mettre à la portée des chercheurs travaillant sur la pébrine et faciliter ainsi la mise au point d'une ou plusieurs méthode(s) de lutte contre cette maladie. Une revue a donc été réalisée afin de faire le point sur la documentation concernant les divers aspects de la pébrine ; cette étude comprend également une section sur les perpectives de recherches dans ce domaine.

I. INTRODUCTION

La "pébrine", une maladie microsporidienne, a longtemps été considérée comme l'une des maladies les plus graves du ver à soie *Bombyx mori* L. Les milieux séricicoles de tous les pays producteurs de soie ont, à une époque ou une autre, souffert des dommages considérables occasionnés par cette maladie. Au XIXe siècle, la production de cocons a chuté en Europe à la suite de cette maladie. Il a été démontré que la pébrine est apparue en France en 1845. La production totale de cocons en France, qui atteignait 26 000 tonnes en 1853, est tombée à 4 000 tonnes en 1865. A cette époque, l'étendue de cette maladie était telle que la sériciculture en France était au bord de l'effondrement total (Tatsuke, 1971). Au cours de la même période, la maladie avait atteint des dimensions épidémiques dans les régions d'Inde. En 1875, les graines de ver à soie de base ont été complètement détruites par la pébrine dans l'Etat du Cachemire (Lefroy, 1916). Au cours des années 1960-65, des taux élevés de maladie (plus de 40 %) ont à nouveau été observés au Vietnam, en Indonésie et dans d'autres pays de l'Asie du sud-est (Anonyme, 1975). Ainsi, la pébrine a toujours joué un rôle déterminant dans le devenir de l'industrie séricicole. Les recherches les plus anciennes sur la pébrine sont contemporaines des progrès de la microbiologie au XIXe siècle. Cependant, des progrès importants ont été réalisés après la découverte de la malaria en protozoologie. Pasteur (1870) a été le pionnier de la recherche en matière de pébrine. Par la suite, les travaux de Nerikii et Ito (1896), Ishiwata (1897), Stempell (1909), Mukerji (1919), Pringle-Jameson (1922, 1924), Ichikawa (1935), Ghosh (1949) et Weiser (1961) concernent principalement l'épizootiologie et la prévention de la maladie.

Bien que la lutte contre la pébrine dure depuis plus d'un siècle, les dommages provoqués par cette maladie n'ont pas été complètement éliminés. En fait, il semble qu'il y ait une relation étroite entre la lutte contre la pébrine et l'essor de l'industrie séricicole. Il est donc indispensable d'acquérir une connaissance approfondie de cette maladie afin d'améliorer l'industrie séricicole. Une revue a donc été réalisée afin de faire le point sur les recherches effectuées sur les divers aspects de la pébrine.

Adresse actuelle : Dr C.S. Patil, Department of Microbiology, Washington State University, Pullman, WA, 99164-4233, USA.

2. L'ORGANISME RESPONSABLE ET SA POSITION SYSTEMATIQUE

Le terme de "pébrine" a été inventé par de Quadrefages (1860) en raison de l'apparition de taches rappelant le poivre chez les larves malades. Le microorganisme responsable de la maladie a été observé pour la première fois dans l'hémolymphe du ver à soie et a été appelé "hématozoïde" (Guérin-Méneville, 1849). En 1857, Naegeli a donné à l'agent pathogène le nom scientifique de *Nosema bombycis* de la famille des nosématidés, ordre : microsporodies. Plus tard, Balbiani (1882) a confirmé l'appartenance de l'agent pathogène aux sporozoaires du phylum des protozoaires. Plus récemment, Thomson (1960) et Sprague (1977) ont fait l'inventaire des microsporodies infestant les insectes et établi la classification suivante :
Phylum : protozoaires ;
Ordre : Microsporidia Balbiani, 1882 ;
Famille : Nosematidae Labbe, 1899 ;
Genre : *Nosema* Naegeli, 1857 ;
Nosema bombycis Naegeli, 1857.

Récemment, sur la base des caractères moléculaires et cytologiques particuliers des microsporidiens tels que la nature primitive de la division nucléaire, l'absence de mitochondries, des ribosomes de taille procaryotiques et les ARN ribosomiques, on a établi qu'ils constituaient les eucaryotes les plus anciennement répertoriés (Vossbrink et coll., 1987 ; Undeen et Cockburn, 1989).

3. CARACTERISTIQUES DE LA MALADIE ET EFFETS SUR L'HOTE

Les symptômes de la pébrine varient en fonction de l'âge des vers à soie infestés. Les larves malades présentent les symptômes suivants : faible appétit, développement retardé, irrégularité de la mue, plissage et léger brunissement de la peau (Tatsuke, 1971 ; Jolly, 1986). L'intestin infesté devient opaque et des taches blanches apparaissent sur les glandes séricigènes. Les larves malades meurent après la rupture mécanique de leurs tissus provoquée par l'infestation pathogène. Le manque d'éléments nutritifs pertube la physiologie et les fonctions normales des larves. La région abdominale enfle et, dans certains cas, présente des taches noires (Ishihara, 1963). On observe une déformation des ailes, une distortion des antennes et une décoloration des écailles chez les papillons malades. Ces derniers pondent des oeufs détachés, parfois en masse, et contiennent un pourcentage élevé d'oeufs non fécondés. On a observé que les insectes infestés par des spores microsporidiennes avaient une faible fécondité (Veber et Jasic, 1961). Les oeufs infestés par *N. bombycis* sont moins colorés que la normale (Masera , 1960).

Le nombre minimal de spores nécessaire à l'initation d'une maladie chez le ver à soie a été évalué. Il semble varier en fonction de l'âge de l'hôte. Par exemple, on a déterminé qu'une à dix spores suffisent à initier la maladie chez les larves du 2e âge, tandis que cent spores sont nécessaires pour provoquer les mêmes symptômes chez les larves du 5e âge (Iwano et Ishihara, 1981). Les larves infestées au cours du 1er ou du 2e âge présentent une croissance normale jusqu'au 3e âge. Les symptômes de la maladie apparaissent au 4e âge, les larves meurent ensuite du fait de la libération des spores. Au cours de cette période, l'infestation orale, appelée contamination du 2e stade, se manifeste chez les larves saines. Les larves infestées au 4e et au 5e âge parviennent jusqu'à l'émergence et donnent des oeufs contaminés. Ce phénomène est dénommé transmission *transovum*. Les larves infestées de manière transovarienne présentent les symptômes de la maladie au 2e âge et meurent au cours du 3e et du 4e âge. Le taux d'infestation est élevé aux 1er, 2e, 5e âges et faible aux âges intermédiaires. On a observé que la longueur des âges et la quantité de nourriture fournie constituaient certains des facteurs contribuant au taux de manifestation de la maladie (Ishihara et Fujiwara, 1965).

Les effets de *N. bombycis* sur son hôte sont plus graves que ceux provoqués par d'autres microsporidiens. Les dommages tissulaires aux différents organes des vers à soie ont été étudiés en détail (Mitani, 1920 ; Hassanein et Ibrahim, 1959 ; Wafa et Kotby, 1971 ; Abe et Fujiwara, 1979 ; Fujiwara, 1979). La présence des agents pathogènes dans les systèmes musculaire et nerveux perturbe le fonctionnement des organes et entraîne une désorganisation (Wafa et Kotby, 1971). Par ailleurs,

Issi et Onatski (1984) ont montré que les stades de présporulation n'affectaient pas les tissus mais semblaient avoir des effets stimulants aux niveaux cellulaire et organique.

Les agents pathogènes infestent d'abord l'intestin moyen de l'hôte. Le sporoplasme (cellule germinale) entre par l'ouverture de l'intestin moyen et traverse la paroi intestinale pour atteindre l'hémolymphe par les interstices hémocéliques (Oshima, 1975). Ces cellules germinales sont transportées dans différents organes par l'intermédiaire du fluide corporel en mouvement et établissent des colonies dans les cellules de ces organes. Les schizontes accumulés dans les régions centrales des oeufs se fraient un passage vers les cellules embryonnaires nouvellement formées de l'intestin peu après la formation de l'embryon. L'épithélium de l'intestin moyen des jeunes larves est donc infesté de schizontes et de spores (Stempell, 1909). Des études séquentielles sur les dommages tissulaires (Mitani, 1920) ont permis d'identifier les schizontes dans les tissus de l'intestin moyen 24 heures après l'infestation, tandis que les spores n'apparaissent que 3 jours après l'infestation dans les divers tissus.

4. PURIFICATION DES SPORES

L'isolement et la purification des spores sur l'hôte est une étape fondamentale dans l'étude de la pébrine. Pour isoler les spores, les larves sont homogénéisées dans de l'eau stérile. On ôte de gros fragments de débris tissulaires en filtrant le broyat à travers de la gaze fine. Il est possible de réaliser une purification supplémentaire par centrifugation différentielle comme l'ont proposé plusieurs chercheurs (Vavra et Maddox, 1976). Cependant, l'étude sérologique et biochimique des microsporidiens nécessite un degré de pureté élevé. Cole (1970) a obtenu une pureté de plus de 90 % à partir d'une chromatographie triangulaire par distribution à contre-courant. On a également décrit une méthode rapide pour concentrer les spores de *Nosema* par centrifugation en flux continu (Gochnaner et Margetts, 1980) ainsi qu'une méthode basée sur le mouvement brownien (Hostounsky, 1981). Sato et Watanabe (1980) ont purifié des spores par centrifugation sur gradient de sucrose et de percol. Dans le cas de la centriguation sur gradient de sucrose à 50-60 % (w/w), la séparation entre les spores matures, d'une part, et les spores immatures et les débris cellulaires, d'autre part, n'est pas nette, alors qu'on a pu obtenir une bande composée uniquement de spores matures avec un taux de récupération de 90 % sur gradient de percol.

La centrifugation sur percol à 73000 g pendant 30 minutes donne 3 bandes : 1) une bande marquée composée de débris tissulaires de vers à soie, des débris cellulaires de feuilles de mûrier, de bactéries, etc., 2) une bande pâle composée de spores matures mais inactives, 3) une deuxième bande marquée composée seulement de spores matures et actives.

5. TAILLE, STRUCTURE ET CYCLE VITAL

Une spore mature est ovale (ovoïde). Elle mesure environ 3.6 ± 0.2 µm de long et 2.0 ± 0.3 µm de large. La connaissance de la biologie de l'agent pathogène forme la base de la lutte contre la maladie et elle a été étudiée de manière extensive (Stempell, 1909 ; Omori, 1912 ; Iwabuchi, 1913 ; Kudo, 1916 ; Paillot, 1928). Lorsqu'un ver à soie ingère une spore par l'intermédiaire d'un aliment contaminé, la spore est stimulée par l'action alcaline du suc digestif et extrude un long filament polaire d'une taille 30 fois supérieure à la sienne. L'extrusion du filament est d'une importance capitale car elle permet à l'agent pathogène d'envahir les cellules de l'hôte (Oshima et Suzuki, 1939 ; Ishihara, 1968a). Le sporoplasme (cellule germinale) est libéré de la spore par le filament polaire tubulaire (Oshima, 1937 ; Kramer, 1960 ; Lom et Vavra, 1963). L'extrusion *in vitro* du filament polaire a été étudiée par suspension des spores dans des solutions alcalines de glycine KOH-KCl ou de K_2CO_3. Oshima (1965) a démontré que la concentration en ions potassium, le pH et la température constituaient certains des facteurs influençant l'extrusion du filament polaire. De plus, il a suggéré que le suc intestinal du ver à soie avait une teneur élevée en ions potassium et que sa plage optimale de pH induisait, chez les spores, l'extrusion du filament polaire de la même façon que les solutions de K_2CO_3-$KHCO_3$.

Le sporoplasme binucléé (cellule germinale) est libéré dans l'hémolymphe par le filament polaire (Ishihara, 1969). Il se déplace librement avec l'hémolymphe circulante et atteint toutes les parties du corps, pénétrant dans les différents tissus par les interstices intracellulaires ; à ce stade, les cellules germinales sont appelées planontes (Stempell, 1909). L'infestation est active lorsque les noyaux du sporoplasme pénètrent dans les cellules de l'hôte et commencent leur développement intracellulaire. Ce stade est le stade méronte. Les spores matures se forment par multiplication par fission. La spore a un cycle de 4 jours. Ishihara (1969) et Takizawa et coll. (1975) ont étudié tous les stades du développement de l'agent pathogène. La spore mature est une entité unicellulaire et ses composantes structurelles sont formées par différenciation de l'endomembrane de son sporoblaste (Vavra, 1974, 1976).

Avec l'application des techniques utilisant le microscope électronique aux microsporidiens, on a pu étudié avec précision les différents stades du développement ainsi que la structure fine des spores. L'observation des caractéristiques a facilité la différenciation des espèces. Le nombre d'enroulements du filament polaire et l'angle de prise de ces enroulements sont considérés comme des caractères intéressants pour la distinction des espèces ayant des caractères morphologiquement identiques (Burges et coll., 1974). Récemment, Sato et Watanabe (1985) au cours d'études sur les stades du développement de trois espèces de *Nosema* (M11, M12 et *Pleistophora*) ont pu attribuer une nouvelle appartenance de *Nosema* M12 au genre *Vairimorpha* sur la base de l'ultrastructure de la spore.

6. SURVIE DU PATHOGENE DANS L'ENVIRONNEMENT ET INCIDENCE SAISONNIERE DE LA MALADIE

Généralement, la survie des microsporidiens dans l'environnement est influencée par un grand nombre de facteurs comme la température, l'humidité et les composants biotiques du substrat sur lequel ils se trouvent (Kramer, 1976). On a observé que *N. bombycis* ne peut pas survivre plus de deux mois sur des matériels fermentant dans l'humidité (Kudo, 1930). Des études portant sur la viabilité des spores de pébrine dans le sol et le compost dans des conditions tropicales ont montré que les spores pouvaient survivre pendant une période maximale de 225 jours en sol humide et un minimum de 135 jours dans du compost humide (Patil et Muniraju, 1991). Apparemment, les spores enveloppées dans les tissus organiques et les spores présentes en conditions humides peuvent vivre plusieurs années (Anonyme, 1975). Par ailleurs, les spores nues sont sensibles à la dessication et perdent leur toxicité rapidement. Maddox (1973) pense que la survie des spores microsporidiennes dépend non seulement du contenu en humidité du matériel (substrat) sur lequel elles se trouvent mais aussi de sa nature.

Les effets négatifs des conditions de l'environnement sur les spores microsporidiennes, en particulier l'ensoleillement, ont été étudiés de manière approfondie (Brooks, 1982 ; Kaya, 1977 ; Sikorowski et Lashomb, 1977 ; Wilson, 1974). Les rayons solaires contiennent des ultraviolets (UV) qui ont un effet sporicide (Nilova, 1974). La teneur réelle en UV des rayons solaires à la surface de la terre dépend des conditions atmosphériques (Coulson, 1975) et de la position du soleil (Withrow et Withrow, 1956). Par ailleurs, l'intensité et la quantité de rayons solaires purs (teneur élevée en UV) auxquelles sont exposées les spores dépendent de la saison et de la durée d'exposition (Patil et coll., 1991). L'effet global des paramètres décrits ci-dessus est en corrélation directe avec le taux d'inactivation des spores.

La pébrine étant la maladie la plus mortelle des maladies du ver à soie, son intensité et sa relation avec les conditions météorologiques ont été étudiée depuis longtemps (Aoki, 1962 ; Dasgupta, 1950 ; Pringle-Jameson, 1922 ; Noamani et coll., 1971) et les résultats se sont révélés très variables. Pringle-Jameson (1922) a observé une incidence élevée de la maladie en août-septembre et établit qu'une atmosphère humide combinée avec une température élevée favorisait le développement de la maladie. Aoki (1962) pense que les vers à soie élevés en milieu sec et froid sont plus sensibles à la maladie que les vers à soie élevés en milieu chaud et humide. Par ailleurs, Noamani et coll. (1971) ont remarqué que l'intensité de la pébrine était maximale en juillet-août et importante en novembre-décembre et ont suggéré qu'il semblerait n'y avoir aucune corrélation entre l'incidence de la maladie et la température ou l'humidité. Cependant, les facteurs intervenant dans l'initiation et le développement de la maladie comprennent le nombre d'agents pathogènes, la population hôte et un

ou des agent(s) de transmission efficace(s). Apparemment tous ces facteurs sont affectés par d'autres facteurs abiotiques et biotiques (Tanada, 1963).

7. SPECIFICITE DE L'HOTE ET RESISTANCE DE L'HOTE A LA MALADIE

La plupart des microorganismes préfèrent avoir des hôtes de substitution car ils leur permettent de se disperser, de se transmettre et de survivre. Il existe plusieurs études sur l'éventail des hôtes de *N. bombycis*, qui comprend plus de 25 lépidoptères (Machay, 1957 ; Kashkarova, 1981 ; Kashkarova et Khakhanov, 1980 ; Srikanta, 1987). Des études ont été réalisées sur la multiplication de *N. bombycis* dans les lignées cellulaires de *Manduca sexta* (Street et Lymn, 1984) et d'*Antheraea eucalypti* (Kawarbata et Ishihara, 1984 ; Sato et Watanabe, 1986). Il est intéressant de noter qu'Ishihara (1968b) et Mescheryakov et coll. (1984) ont observé le développement de *N. bombycis* dans des cellules de mammifères. Cependant, outre *N. bombycis*, d'autres microsporidiens appartenant aux genres *Nosema*, *Pleistophora* et *Thelohania* infestent le ver à soie *B. mori* (Tanaka et coll., 1972 ; Fujiwara, 1980, 1984 ; Fujiwara et coll., 1985 ; Patil, 1989 ; Sato et coll., 1981). Néanmoins, la plupart des espèces de *Nosema*, en particulier celles qui infestent les lépidoptères, ont un large éventail d'hôtes.

On s'est beaucoup intéressé aux recherches sur les races (souches) résistantes aux maladies. Il a été établi que certains vers à soie étaient résistants aux infestations microsporidiennes (Tanada, 1963). Masera (1957) a observé que les vers à soie de la race chinoise blanche étaient plus résistants aux spores de pébrine que les autres races. Plus récemment, Patil et Geetha Bai (1989) ont mis en évidence la résistance élevée des races multivoltines indiennes à la pébrine par rapport aux races bivoltines exotiques. Bien que la résistance à la maladie semble dépendre des composants génétiques d'une race donnée, des facteurs tels que le nombre d'agents pathogènes, une nutrition mal adaptée et l'environnement dans lequel les insectes sont élevés peuvent affecter la résistance. En outre, les caractéristiques physiques et physiologiques des hôtes peuvent rendre possible l'infestation par les microsporidiens (Weiser, 1969 ; Brooks, 1971). Cependant, les études orientées vers les facteurs responsables de la différenciation de la résistance de l'hôte pour un agent pathogène donné restent limitées.

8. LES RECHERCHES BIOCHIMIQUES ET IMMUNOLOGIQUES

Le principal objectif des recherches sur les aspects biochimiques et immunologiques des microsporodiens parasitaires est de comprendre précisément leur biologie : les relations hôte-parasite et la taxonomie qui permettraient de mettre au point une méthode de lutte contre la maladie.

Apparemment, au cours de telles recherches, de nombreuses découvertes prometteuses ont été réalisées qui, bien qu'elles ne soient pas applicables dans l'immédiat, auront une importance capitale à long terme.

Dans le passé, l'identification des agents pathogènes était principalement basée sur les caractères morphologiques observés aux microscopes optique et électronique mais le dimorphisme présenté par les microsporidiens rendait difficiles les identifications exactes (Hazard et Weiser, 1968). Ceci donna un élan à l'étude des caractères biochimiques. Ishihara et Hayashiya (1968) ont déterminé que la vitesse de sédimentation des monoribosomes issus du sporoplasme de *N. bombycis* était de 70S (caractéristique des protistes inférieurs) par centifrugation de densité sur sucrose. Par la suite, la nature des granules métachromatiques, la répartition des ribosomes à l'intérieur des spores, leurs coefficients de sédimentation et la composition chimique des parois des spores des espèces de *Nosema* ont été étudiés (Erickson et Sprague, 1970). L'identification complémentaire de diverses espèces de microsporidiens a été réalisée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Fowler and Reeves, 1974a, 1974b) et sur gel de polyacrylamide de sulfate dodécyl de sodium ((Streett and Briggs, 1982). Les polypeptides séparés suivant les méthodes décrites ci-dessus ont donné des profils électrophorétiques reproductibles.

On a observé la présence d'une activité hormone juvénile (JH) dans les spores microsporidiens (Fisher et Sanborn, 1964 ; Erickson et Sprague, 1970). L'explication proposée est que soit le parasite microsporidien produit une substance chimique dont l'activité est similaire à la JH, soit il absorbe la JH de l'hémolymphe de l'hôte. Il a été établi que les larves infestées de microsporidiens subissent des

mues surnuméraires (Fowler et Reeves, 1975 ; Milner, 1972), état caractéristique des niveaux de JH persistants ou anormalement élevés. Ceci suggère que l'infestation par *N. bombycis* pourrait avoir un effet sur le système endocrinien des vers à soie entraînant un prolongement de la période larvaire qui permettrait au parasite de poursuivre sa multiplication et de terminer son développement.

Récemment, les techniques immunologiques ont été appliquées à la détection des agents pathogènes et à l'identification des espèces. *Nosema bombycis* et les espèces étroitement apparentées ont été diagnostiquées à l'aide de latex sensibilisé aux anticorps (Grobov et Rodoinova, 1985 ; Hayashiya et Ayuzawa, 1987 ; Li 1985), de dosages ELISA (Kawarbata et Hayashiya, 1987 ; Watanabe, 1987) et d'anticorps fluorescents (Sato et coll., 1981). Ces tests servent principalement à la détection précoce des organismes responsables, permettant ainsi de leur adapter des mesures de lutte appropriées. Le développement des techniques des anticorps monoclonaux (Kohler et Milstein, 1975) consistue une méthode de détection rapide des microsporidiens chez le ver à soie. De plus, les anticorps monoclonaux ont également été utilisés pour l'identification des microsporidiens spécifiques. Zhaoxi Lee et coll. (1990) ont obtenu des anticorps monoclonaux contre les spores de *N. bombycis* et les ont appliqués, à l'aide des dosages ELISA, pour identifier *N. bombycis* et d'autres spores microsporidiennes étroitement apparentées infestant les vers à soie.

9. LUTTE CONTRE LA MALADIE / MESURES PREVENTIVES

La plupart des tentatives d'éradication des maladies protozoaires chez les insectes ont porté sur la pébrine chez le ver à soie et l'abeille. Apparemment, la biologie de l'agent pathogène a servi de base dans la lutte contre la maladie. La méthode la plus ancienne, préconisée par Pasteur (1870), basée sur la sélection des oeufs exempts d'agents pathogènes par examen de la présence des agents pathogènes des papillons mères, a donné des résultats extraordinairement bons. C'est peut-être la seule méthode utilisée extensivement avec peu modifications. Récemment, un protocole de coloration négative simple (Geetha Bai et coll., 1985) et un protocole de coloration à l'immunopéroxydase (Han et Watanabe, 1987) ont été développés pour rendre plus clair l'examen des spores dans les grainages. L'examen des papillons individuels est utilisé pour les oeufs destinés à la reproduction et au grainage tandis que l'examen en masse des papillons basé sur l'échantillonnage est utilisé pour la préparation des oeufs destinés aux élevages commerciaux. Pour maintenir le niveau de qualité, plusieurs tentatives ont été faites afin d'améliorer la méthode d'échantillonnage de manière ponctuelle (Oshima, 1950, 1960 ; Kurisu, 1986 ; Kurisu et Hamazaki, 1986 ; Kurisu et coll., 1983, 1984, 1985).

La neutralisation des microorganismes responsables de la maladie à différents niveaux constitue une autre méthode de lutte. L'exposition de tous les matériels et équipements aux rayons solaires est traditionnellement pratiquée dans les villages (Patil et Dandin, 1990). Cependant, les agents pathogènes dissimulés des pièces d'élevages, les toits, etc., ne peuvent pas être éliminés par l'exposition au soleil. La méthode d'éradication la plus simple et la plus efficace est la désinfection avec une solution de formol de 2 à 3%. Outre le formol, le chlorure de chaux et l'hypochlorite de sodium sont également communément utilisés (Anonyme, 1975). L'action neutralisante des désinfectants sur l'agent pathogène est influencée par plusieurs facteurs, comme la température, l'humidité, la concentration des produits chimiques et la durée du traitement (Kagawa, 1980).

Auparavant, des chercheurs (Astaurov, 1974 ; Bendnyakova et Teresikaya, 1959 ; Li Ai Qun, 1962) avaient suggéré que le traitement des oeufs pébrinisés à l'eau chaude éliminait la pébrine. Par ailleurs, Smyk (1959), qui a réalisé des expériences sur des lots fortement infestés, a obtenu des résultats variables à l'aide de cette méthode. *Nosema bombycis* parasitant des oeufs diapausants de vers à soie a pu effectivement être éliminée lorsque les oeufs pébrinisés stockés au froid (5 °C) ont été traités avec de l'HCl à 20 % à 48 °C pendant 5 minutes (Fujiwara et Kagawa, 1984).

La lutte chimique contre la pébrine testée par plusieurs chercheurs a donné des résultats mitigés (Alenkseenok, 1986 ; Baig et coll., 1988b ; Iwano et Ishihara, 1981 ; Liu et coll., 1979 ; Masera, 1938 ; Patil et coll., 1984-85 ; Xian, 1987). Des diverses drogues thérapeutiques testées contre la maladie de la pébrine, le benlate, le nosematol et la bavistine se sont révélés assez efficaces. Cependant, leur efficacité sur le terrain reste à évaluer.

10. PERSPECTIVES DE RECHERCHES

On a tenté d'éradiquer la maladie de la pébrine de deux façons : 1) par rupture du cycle de transmission de l'agent pathogène en examinant le papillon mère et en éliminant les graines malades, 2) par l'utilisation de produits chimiques pour éliminer la maladie. La première méhode est considérée comme mieux adaptée. Il semble que l'utilisation de produits chimiques comme moyen de lutte n'est pas très probante chez les vers à soie par rapport à d'autres domaines de la protozoologie. La plupart des produits chimiques testés jusqu'à présent ont été sélectionnés de manière empirique et expérimentés de façon conventionnelle. Une approche plus rationnelle serait souhaitable. Il est essentiel d'acquérir une bonne connaissance de la biochimie tant chez le parasite que chez l'hôte qui permettrait de clarifier les voies biochimiques fonctionnant chez le parasite et d'identier une ou des cible(s) potentielle(s) pour les agents chimiques. Cette connaissance s'avèrera cruciale dans les tentatives futures de mise au point d'une thérapie chimique effective orientée vers des sites-cibles spécifiques. Les produits chimiques pourraient également être utilisés pour influencer la flore microbienne intestinale susceptible d'inhiber l'activité pathogène. Il existe donc de nombreuses possibilités de recherches dans ce domaine.

En outre, les aspects moléculaires de la résistance à la maladie chez les vers à soie et les mécanismes d'action des gènes sont peu connus. Avec les progrès de la biologie moléculaire et la technologie de l'ADN recombinant au cours de ces dernières années, il devient possible d'identifier, d'isoler, de purifier et de cloner des gènes de résistance à partir de races de vers à soie résistantes à la pébrine et de les intégrer dans les souches productives mais sensibles, permettant ainsi le développement de souches résistantes à la pébrine.

Enfin, les excellents outils que constituent à l'heure actuelle la culture tissulaire, le microscope électronique, les techniques biochimiques et sérologiques seront utiles dans l'étude des problèmes concernant la biologie, les interactions hôte-parasite, la taxonomie, etc. De telles études faciliteraient le diagnostic rapide des spores de *N. bombycis* et d'autres microsporidiens apparentés infestant les vers à soie. Cette connaissance pourrait également être utilisées dans les études épidémiologiques des microsporidies dans les épizooties naturelles.

EFFECT OF AGE OF MALE ON EJACULATION AND BEHAVIOUR OF SPERMATOZOA IN THE INTERNAL REPRODUCTIVE ORGANS OF THE FEMALE SILKMOTH, *BOMBYX MORI* L. (LEPIDOPTERA : BOMBYCIDAE)

C.M. KISHOR KUMAR & D.C. PAUL

Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore - 742 101, India.

The different aged males (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 d. old) when mated, ejaculated eupyrene sperm bundles (Eb) and apyrene spermatozoa (As) simultaneously into the female copulatory pouch. However, the time of ejaculation and the separation of eupyrene spermatozoa (Es) from Eb delayed with the increase of male age. Similarly, the migration of both As and Es into the seminal receptacle (spermatheca) delayed or inhibited with the increase in the age of male.

Keywords : Mating, eupyrene spermatozoa, apyrene spermatozoa, spermatheca, fertilization.

INTRODUCTION

Like other Lepidoptera, the silkmoth, *Bombyx mori*, has two types of spermatozoa, nucleated eupyrenes and anucleated apyrenes. The eupyrene spermatozoa (Es) form from the end of the larval period to the beginning of the pupal period and apyrene spermatozoa (As) are produced during the pupal period (Machida, 1929 ; Sugai, 1965). The Es and As, which are formed in the testicular follicle, are released in the form of bundles. The As separate from their bundles in the testis itself while the Es that participate in the fertilization of eggs separate from the bundles and acquire mobility within the spermatophore formed inside the bursa copulatrix (Bc) of female (Omura, 1938 ; Katsuno, 1977e ; Kasuga, 1984). The intra-testicular and after ejaculation within female reproductive organs, the behaviour of two spermatozoa has been studied in detail (Katsuno, 1977a, 1977b, 1977c, 1977d). These studies were conducted using freshly eclosed male and females. We have studied the effect of age of male on the ejaculation and behaviour of spermatozoa in the internal reproductive organs of female moths of *Bombyx mori* (race-Nistari).

MATERIALS AND METHODS

Freshly emerged healthy male adults were collected and held separately in paper packets. The males were divided into 8 groups each having 12 moths. Each group was a treatment and when mated to fresh females they were 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 days old. Now onwards 0d, 1d, ... refers to the female mated with 0d, 1d, ... aged male. The 12 moths were divided further into 4 groups of 3 moths and mated to fresh females for a duration of 30, 60, 120 and 180 min. Depaired females after mating were freezed in a deep freezer and the males were rejected. Dead males, if any, were replaced with same aged males from a reserve lot.

The freezed females were subsequently excised for the reproductive organs. The bursa copulatrix (copulatory pouch) was observed for the successful formation of spermatophore and ejaculation by the male and the spermatheca (seminal receptacle) for the presence of spermatozoa. A temporary preparation was made by squeezing and separating the material using a fine needle on a cover slip with a drop of water. The material was stained with eosin for easy discrimination of Es and As. Then

the cover slip was carefully inverted over a concavity microslide and observed under a compound microscope. The amounts of Eb, Es and As were compared with two slides prepared from the fresh female reproductive organs, which was mated with fresh male for a duration of 2 h. and 3 h. and the amount scored as + = present in numerous, ± = present in small number, and – = absent. For each mating duration 3 observations were made and the average results are tabulated in Table I.

RESULTS

30 min. mating duration :

Except 5d and 6d, other males successfully formed the spermatophore in the Bc after 30' of mating and first ejaculation had occurred or began to occur. The content of the Bc was much less due to older males (4d and 7d). A larger quantity of As was observed in 0d-3d, while in 4d and 7d the quantity was much less. Except 0d (a few), in other treatments, separation of Eb had not started and though Es and As were present in Bc of 0d, none was migrated to the spermatheca after 30' mating.

60 min. mating duration :

There was a successful formation of spermatophore in the Bc and ejaculation had occurred in all the treatments. However, the amount of seminal fluid ejaculated was low in 4d and 7d. Larger quantities of As were observed in all except 4d. The Es were separated in more number from Eb up to 2d. In 3d, 5d and 6d very less and in 4d and 7d no separation of Es from Eb was observed. Both Es and As in small number for 0d and 1d and only a small number as for 4 d were observed in the spermatheca at 60' of mating.

120 min. mating duration :

In 0d, 1d and 2d the female Bc, due to continuous separation, had numerous Es and a small number Eb, while the observation was reverse in the case of mating due older males, i.e., 3d, 4d, 7d, in which less, 5d nil and 6d in which about 50 % separation fo Es from Eb observed. The As were numerous in the Bc in all cases. Both Es and As migrated to the spermatheca in larger amounts in 0d and 1d, while a small quantity in 2d and 6d. No Es migrated to the spermatheca in 3d, 4d, 5d and 7d, while only a few As were found in 4d and 5d.

180 min. mating duration :

A second ejaculation had occurred in 0d and 1d and due to this the Bc contained more Eb and also more Es (due to separation of Eb of the first ejaculation). In 3d and 4d the Bc contained few Eb because of separation and more Es. From 5d onwards a delay in the separation time of Es from Eb caused the Bc to have more number Eb and a few to half of the quantity Es. The female seminal receptacle mated with 0d, 1d and 2d old males had larger amounts of Es and As, while the others (except 6d) had few Es and few to more As. 6d had neither Es nor As.

DISCUSSION

In silkworms, Katsuno (1977d) observed that Eb and As were ejaculated simultaneously by male into female copulatory pouch and the Eb started separating at about 30 min. after ejaculation. The first ejaculation occurred at 9 min. and continued up to 15 min. and the seond ejaculation took place after resting from one hour to one and half hours (Machida and Watanabe, 1927). Katsuno (1977d) also observed that Es and As started migrating to the seminal receptacle at about 50 min. after commencement of mating. Our observations of 0d & 1d confirm his reports. However, we found that 4d onwards ageing delayed the ejaculation time and lowered the quantity ejaculated and 2d onwards ageing invariably delayed the separation time of Es and delayed or inhibited the migration of Es and As into the spermatheca. The mating capacity and the viability of Es due to the effect of age of male have been studied in another experiment and we observed (unpublished data) that mating with males aged up to 7d did not have any adverse effect on fecundity of female but mating success decreased with age.

Table I. Presence of eupyrene sperm bundles, eupyrene spermatozoa and apyrene spermatozoa in the internal reproductive organs of female separated at 30, 60, 120 and 180 min. after mating with 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 day aged males.

Tableau I. Présence de faisceaux spermatiques eupyrenes, de spermatozoïdes eupyrenes et apyrenes dans les organes de reproduction internes de la femelle séparés 30, 60, 120 et 180 minutes après l'accouplement avec des males agés de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 jours.

Mating duration (min.)	Reproductive organ	Age at mating							
		0d	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d
Durée d'accouplement (min.)	*Organe de reproduction*	*Age à l'accouplement*							
		0 j	*1 j*	*2 j*	*3 j*	*4 j*	*5 j*	*6 j*	*7 j*
30	Bc Eb	+	+	+	+	±	-	-	±
	Es	±	-	-	-	-	-	-	-
	As	+	+	+	+	±	-	-	±
60	Sp Es	-	-	-	-	-	-	-	-
	As	-	-	-	-	-	-	-	-
	Eb	+	+	+	+	±	+	+	±
	Bc Es	+	+	+	±	-	±	±	-
	As	+	+	+	+	±	+	+	+
120	Sp Es	±	±	-	-	-	-	-	-
	As	±	±	-	-	±	-	-	-
	Bc Eb	±	±	±	+	+	+	+	+
	Es	+	+	+	±	±	-	+	±
	As	+	+	+	+	+	+	+	+
180	Sp Es	+	+	±	-	-	-	±	-
	As	+	+	±	-	±	±	+	-
	Eb	+*	+*	-	±	±	+	+	+
	Bc Es	+	+	+	+	+	±	+	+
	As	+	+	+	+	+	+	+	+
	Sp Es	+	+	+	±	±	±	-	±
	As	+	+	+	+	+	±	-	+

Bc : Bursa copulatrix. **As** : Apyrene spermatozoa / *Spermatozoïdes apyrènes*. Sp: Spermatheca / *Spermathèque*.
Eb : Eupyrene sperm bundles / *Faisceaux spermatiques eupyrènes*. **Es** : Eupyrene spermatozoa / *Spermatozoïdes eupyrènes* .
- : Absent. * : More due to second ejaculation / *Davantage après la seconde éjaculation*. + : Present in numerous numbers / *Présents en grande quantité*. ± : Present in small numbers / *Présents en faible quantité*.

REFERENCES

KATSUNO S. (1977a) Studies on eupyrene and apyrene spermatozoa in the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombicidae). I. The intratesticular behaviour of the spermatozoa at various stages from the 5th instar to the adult. Appl. Ent. Zool., 12, 142-153.

KATSUNO S. (1977b) Studies on eupyrene and apyrene spermatozoa in the silkworm, *Bombyx mori L. (Lepidoptera : Bombicidae). II. The intratesticular behaviour of the spermatozoa after emergence. Appl. Ent. Zool., 12, 236-240.*

KATSUNO S. (1977c) Studies on eupyrene and apyrene spermatozoa in the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombycidae). III. The post-testicular behaviour of the spermatozoa at various stages from the pupa to the adult. Appl. Ent. Zool., 12, 241-247.

KATSUNO S. (1977d) Studies on eupyrene and apyrene spermatozoa in the silkworm, *Bombyx mori L. (Lepidoptera : Bombycidae). IV. The behaviour of the spermatozoa in the internal reproductive organs of female adults. Appl. Ent. Zool., 12, 352-359.*

KATSUNO S. (1977e) Studies on eupyrene and apyrene spermatozoa in the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombycidae). V. The factor related to the separation of eupyrene sperm bundles. Appl. Ent. Zool., 12, 370-371.

KASUGA H, OSANAI M. (1984) Migration mode of two types of spermatozoa of *Bombyx mori* L., from testis to receptaculum seminis. Zool. Sci., 1, 942.

MACHIDA J. (1929) Fine experimentelle Untersuchung über die apyrene Spermatoen des Seidenspinners *Bombyx mori* L., Z. Zellforsch. Mikro. Anat., 9, 466-510.

MACHIDA J, WATANABE K. (1927) The relation between copulation and fertilization of *Bombyx mori*. Sangyo Sinpo., 35, 454-472 (in Japanese).

OMURA S. (1938) Studies on the reproductive system of the male of *Bombyx mori*. II. Post-testicular organs and post-testicular behaviour of the spermatozoa. J. Fac. Agric. Hokkaido Imp. Univ., 40, 129-170.

SUGAI E. (1965) Formation of sperm dimorphiom and glycogen of the testicular membrane in the silkworm, *Bombyx mori* L. Zool. Mag., 74, 276-282.

EFFET DE L'AGE DU MALE SUR L'EJACULATION ET LE COMPORTEMENT DES SPERMATOZOIDES DANS LES ORGANES DE REPRODUCTION INTERNES DU PAPILLON FEMELLE DE *BOMBYX MORI* L. (LEPIDOPTERA : BOMBYCIDAE)

C.M. KISHOR KUMAR & D.C. PAUL

Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore - 742 101, Inde.

Au cours de l'accouplement, les mâles de différents âges (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 jours) éjaculent des faisceaux spermatiques eupyrènes (Eb) et des spermatozoïdes apyrènes (As) simultanément dans la poche de copulation de la femelle. Le moment de l'éjaculation et celui de la séparation des spermatozoïdes eupyrènes (Es) des Eb sont retardés lorsque l'âge du mâle augmente. Parallèlement, la migration des As et des Es dans le réceptacle séminal (spermathèque) est retardée ou inhibée lorsque l'âge du mâle augmente.

INTRODUCTION

Comme les autres lépidoptères, le papillon du ver à soie *Bombyx mori* a deux types de spermatozoïdes : les eupyrènes nucléés et les apyrènes anucléés. Les spermatozoïdes eupyrènes (Es) se forment depuis la fin du stade larvaire jusqu'au début du stade pupal et les spermatozoïdes apyrènes (As) sont produits au cours du stade pupal (Machida, 1929 ; Sugai, 1965). Les Es et les As, qui sont formés dans le follicule testiculaire, sont libérés sous la forme de faisceaux. Les As se séparent de leurs faisceaux dans le testicule tandis que les Es qui participent à la fécondation des oeufs se séparent des faisceaux et acquièrent une mobilité dans le spermatophore formé à l'intérieur de la bursa copulatrix (Bc) de la femelle (Omura, 1938 ; Katsuno, 1977e ; Kasuga, 1984). Le comportement des deux types de spermatozoïdes à l'intérieur des testicules et après l'éjaculation dans les organes de reproduction de la femelle a été étudié en détail (Katsuno, 1977a, 1977b, 1977c, 1977d). Ces études ont été réalisées sur des mâles et des femelles en sortie d'émergence. Nous avons étudié l'effet de l'âge du mâle sur l'éjaculation et le comportement des spermatozoïdes dans les organes de reproduction internes des papillons femelles de *Bombyx mori* (race Nistari).

MATERIELS ET METHODES

Des adultes sains en sortie d'émergence ont été prélevés et conservés séparément dans des boîtes en papier. Les mâles ont été divisés en 8 groupes de 12 papillons. Chaque groupe constituait un traitement et, au moment de l'accouplement à de jeunes femelles, ils étaient âgés de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 jours. Par commodité, nous avons choisi d'appelé 0 j, 1 j... les femelles accouplées avec des mâles âgés de 0 jour, 1 jour... Les 12 papillons ont ensuite été divisés en 4 groupes de 3 papillons et accouplés à de jeunes femelles pendant 30, 60, 120 et 180 minutes. Les femelles désaccouplées ont été stockées dans un congélateur et les mâles ont été éliminés. Les mâles morts éventuels ont été remplacés par des mâles du même âge issus d'un lot de réserve.

Les femelles congelées ont ensuite été disséquées pour permettre l'étude de leurs organes de reproduction. On a examiné la bursa copulatrix (poche de copulation) afin d'établir s'il y avait

formation de spermatophores et éjaculation du mâle ainsi que la spermathèque (réceptacle séminal) afin d'observer la présence de spermatozoïdes. Une préparation temporaire a été faite en pressant et en séparant le matériel à l'aide d'une aiguille fine sur une lame couvre-objet contenant une goutte d'eau. Le matériel a été coloré à l'éosine pour faciliter l'identification des Es et des As. La lame couvre-objet a été retournée délicatement sur une lame creuse et examinée au microscope. Les quantités d'Eb, d'Es et d'As ont été comparées sur deux lames préparées à partir des organes de reproduction frais des jeunes femelles accouplées avec des jeunes mâles pendant 2 et 3 heures. Les quantités observées ont été relevées comme suit : + = présents en grande quantité, ± = présents en petite quantité, - = absent. Trois observations ont été réalisées pour chaque durée d'accouplement. la moyenne des résultats est présentée dans le tableau I.

RESULTATS

Durée d'accouplement de 30 minutes :

A l'exception de 5 j et 6 j, tous les autres mâles ont pu former un spermatophore dans la Bc après 30 minutes d'accouplement et après que la première éjaculation ait eu lieu ou ait commencé. Le contenu de la Bc est très faible avec les mâles âgés (4 j et 7 j). Une quantité plus importante d'As a été observée chez 0 j à 3 j, tandis que les As étaient beaucoup moins nombreux chez 4 j et 7 j. Chez tous les traitements, à l'exception de 0 j, la séparation des Eb n'a pas commencé et les As sont présents dans la Bc de 0 j ; aucun ne migre vers la spermathèque après 30 minutes d'accouplement.

Durée d'accouplement de 60 minutes :

On constate une formation réussie de spermatophore dans la Bc et l'éjaculation pour tous les traitements. Cependant, la quantité de liquide séminal éjaculé est faible chez 4 j et 7 j. Des quantités plus importantes d'As sont présentes chez tous les traitements sauf 4 j. Les Es se séparent des Eb en plus grands nombres jusqu'à 2 j. Les Es se séparent très peu des Eb chez 3 j, 5 j et 6 j et aucune séparation n'apparaît chez 4 j et 7 j. Les Es et les As sont présents en faibles quantités chez 0 j et 1 j et seulement en quantités infimes chez 4 j dans la spermathèque après 60 minutes d'accouplement.

Durée d'accouplement de 120 minutes :

Chez 0 j, 1 j et 2 j, la Bc de la femelle, en raison d'une séparation continue, présente un grand nombre d'Es et une petite quantité d'Eb, tandis que l'on obtient un résultat inverse lorsque les femelles sont accouplées à des mâles âgés, c'est-à-dire 3 j, 4 j et 7 j, pour lesquels très peu de séparations entre les Es et les Eb ont été observées. Il n'y a aucune séparation pour 5 j et environ 50 % de séparation pour 6 j. Les As sont présents en grands nombres dans la Bc dans tous les cas. Les Es et les As migrent vers la spermathèque en plus grandes quantités chez 0 j et 1 j mais en petites quantités chez 2 j et 6 j. Aucun Es ne migre vers la spermathèque chez 3 j, 4 j, 5 j et 7 j et très peu d'As sont présents chez 4 j et 5 j.

Durée d'accouplement de 180 minutes :

Une deuxième éjaculation a lieu chez 0 j et 1 j, entraînant une augmentation du nombre d'Eb et d'Es dans la Bc (du fait de la séparation des Eb de la première éjaculation). Chez 3 j et 4 j, la Bc contient peu d'Eb en raison de la séparation et davatange d'Es. A partir de 5 j, un retard du moment de la séparation entre les Es et les Eb provoque un accroissement de la présence de Eb, dont la quantité varie de faible à 50 % de la quantité d'Es. Le réceptacle séminal de la femelle accouplée avec des mâles âgés de 0 j, 1 j et 2 j contient des quantités plus importantes d'Es et d'As, tandis que les autres (excepté 6 j) ont peu d'Es et peu à très peu d'As. Chez 6 j, il n'y a ni Es ni As.

DISCUSSION

Katsuno (1977d) a observé que, chez le ver à soie, les Eb et les As sont éjaculés simultanément par le mâle dans la bursa copulatrix de la femelle et que les Eb commencent à se séparer environ 30 minutes après l'éjaculation. La première éjaculation a lieu après 9 minutes et continue pendant

15 minutes tandis que la seconde éjaculation se produit après une période de repos de 1 heure à 1 heure et demie (Machida et Watanabe, 1927). Katsuno (1977d) a également observé que les Es et les As commencent à migrer vers le réceptacle séminal environ 50 minutes après le début de l'accouplement. Les données que nous avons relevées pour 0 j et 1 j confirment ces résultats. Cependant, nous avons observé que le vieillissement retardait le moment de l'éjaculation et entraînait une diminution de la quantité éjaculée à partir de 4 j et qu'il retardait le moment de séparation des Es et retardait ou inhibait systématiquement la migration des Es et des As vers la spermathèque à partir de 2 j. La capacité d'accouplement et la viabilité des Es en fonction de l'âge du mâle ont été étudiées dans une autre expérience et nous avons observé (données non publiées) que l'accouplement avec des mâles âgés de 0 à 7 jours n'avait aucun effet défavorable sur la fécondité de la femelle mais que la réussite de l'accouplement diminuait avec l'âge.

IMPACT OF DIFFERENTIAL FEEDING DURATION OF PARENT ON THE LARVAL AND COCOON CHARACTERS IN THE NEXT GENERATION OF *BOMBYX MORI* L.

D.C. PAUL* & D.C. DEB[1]**

* P_2 Farm, Regional Sericultural Research Station, Kalimpong - 734 301, West Bengal, India.

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

Freshly moulted fifth instar larvae of the bivoltine KPG-B race of ***Bombyx mori*** *were reared at the prevailing 18-23 °C temperature and 66-74 % relative humdity (RH) during December and provided mulberry leaves as food for different durations of 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 days, which were regarded as treatments. The normal span of feeding of these larvae was 7.25 days which was considered as control. A 100 % larval mortality occurred due to feeding for 1 and 2 days, and in the case of 3-day feeding only a few adults could be formed, which, again, produced very few mature eggs with poor hatchability. Therefore, treatments of 4-day feeding onwards were considered for further investigation.*

Four to 6-day feeding resulted in reduced pupal size and initial weight of newly hatched larvae of the following generation, the weight differed significantly ($P < 0.05$) from that of the control. Ad libitum feeding in the following generation did not show significant difference ($p > 0.05$) between the control and any of the treatments in respect of single full-grown larval weight, larval duration, single cocoon weight, single shell weight and silk ratio (SR) percentage. The results indicate that larval and cocoon characters are genetically determined and the feeding stress of differential duration imposed on the parent cannot influence the larval and cocoon characters in the following generation.

Keywords : *Bombyx mori*, feeding duration, larval and cocoon character, generation.

INTRODUCTION

Influence of life style, nutritional stresses imposed and vigour and quality of individuals of the parental generation on the larval cocoon qualities of the next generation is mooted by the authorities. Reports are available regarding the differential restriction of feeding duration and its effect on larval duration and growth and cocoon characters in *Bombyx mori* (Muthukrishnan *et al.*, 1978 ; Radhakrishnan *et al.*, 1985 ; Mathavan *et al.*, 1987 ; Radhakrishna et Delvi, 1987). These reports have confirmed some negative effects of nutritional restriction on the larval and cocoon characters in the parental generation only. Haniffa *et al.* (1988) also have observed that an increased number of feeds per day resulted in better qualities of larval and cocoon characters of the parental generation. But no attempt has been made to evaluate whether the effects pass on to the following generation. This article describes the impact of nutritional stress due to reduction in the number of feeding days during the parental larval life on the following generation of *B. mori*.

---

1. Correspondent author.

MATERIALS AND METHODS

Fifth instar larvae were obtained immediately after the fourth moult from the stock culture maintained at 18-23 °C temperature and 66-74 % RH. The larvae were fed with S_1 variety of mulberry leaves, four feeds *ad libitum* per day, but for a duration of different numbers of days followed by starvation. The larvae fed for a differential number of days as 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 were regarded as treatments, and those for the usual 7.25 days were the control. For each category of treatment and control, 100 larvae were taken. Because of a 100 % larval mortality in the case of 1 or 2-day feeding and production of only a few mature eggs by the females resulted from 3-day feeding, these 3 categories of treatments were not considered for the results. Altogether the results obtained from 4, 5, 6 and 7-day feeding treatments and those from the control were analysed. There were 4 replications for each category. The study in the following generation was based on one full laying by a female for each replication of each category. The parameters considered in the following generation were the weight of 100 newly hatched larvae, weight of a single full-grown larva, duration of larval life, single cocoon weight, single shell weight, and silk ratio percentage. Sex separation was done by opening the cocoons of each category on the fifth day of pupation very carefully with the help of a sharp razor. In order to get viable eggs, mating was allowed between two moths obtained from within each category of parental treatments and control.

RESULTS AND DISCUSSION

The intial weight of the newly hatched larvae of the next generation increased significantly with the increased number of feeding days during the parental generation (Table I). As a holometabolous insect the source of energy for the rapid developmental activity during the pupal life and subsequent production of eggs by the adult females of *B. mori* is derived from the nutritional storage during the larval life, particularly during the fifth instar stage. The fifth stage alone consumes about 87.67 % of the total food consumption spanning the entire larval life (Matsumura and Takeuchi, 1950). Further, the length of the fifth instar larval life is more than twice that of each of the preceding instars and the quantity of food consumption increases day by day, the highest being on the day before spinning (Horie and Watanabe, 1983). The additional feeding period of the fifth instar larva roughly corresponds to the facultative feeding period (Inagaki and Yamashita, 1986). Thus, in the present investigation the feeding stress beyond the third day could not impair the larval life and subsequent formation completely. The degree of impairment corresponded directly to the feeding stress imposed. This is why the extent of poor initial weight of newly hatched larvae in the following generation has been caused due to nutrient limitations as a result of differential feeding duration during the parental last instar larval life.

Underfeeding during the last larval life has a definite bearing on the weight of eggs in the following generation. The weight of eggs of the experimental individuals approaches to that of the control in proportion to the amount of food provided (Baud, 1955). Our result shows a close relationship between the egg weight and the newly hatched larval weight. The larval weight increases with the increase in egg weight. Again, the quantity of mulberry leaves consumed and digested is intimately related to the gain in larval weight (Sunioka *et al.*, 1982) and consequently to the egg weight (Samson and Krishnaswamy, 1980).

In respect of larval duration, weight of full-grown larva, single cocoon weight, single shell weight and SR % in the next generation there is no significant difference among the treatments and each of the treatments with the control. The larval and cocoon characters obtained from all the treatments were at par with those obtained from the control individuals. This justifies that the imposed nutrition deficiency by way of restriction of feeding days in the parental larval life cannot alter the original, genetically determined characters of larvae and cocoons of the following generation if the food is provided *ad libitum*. The deficient situation in the newly hatched larvae has been compensated progressively with the advancement of larval life. This finding confirms an earlier observation by Legay (1958). It has also been recorded that when silkworm breeds are maintained under lower feeding levels for 5 successive generations, they are able to regain their original, genetically determined traits if reared with full feeding levels in subsequent generations (Pillai, 1989).

Table I. Effect of parental feeding stress on the larval and cocoon characters of the following generation.

Tableau I. Effet du stress du jeûne chez la génération parentale sur les caractères de la larve et du cocon à la génération suivante.

Feeding duration (days)	Weight of 100 newly hatched larvae (mg)	Weight of single full-grown larva (g)	Larval duration (days)	Single cocoon weight (g)	Single shell weight (g)	Silk ratio (%)
Durée du nourrissage (jours)	*Poids de 100 larves à l'éclosion (mg)*	*Poids d'une larve mature (g)*	*Durée larvaire (jours)*	*Poids d'un cocon (g)*	*Poids d'une coque (g)*	*Richesse soyeuse (%)*
4	35.175	4.140	26.438	1.760	0.335	19.030
5	38.025	4.153	26.500	1.750	0.333	18.910
6	39.700	4.140	26.563	1.743	0.333	19.085
7	40.952	4.132	26.500	1.713	0.323	18.830
7.25 (C)	40.938	4.182	26.500	1.700	0.322	18.967
CD at 5 %	0.348	NS	NS	NS	NS	NS

C : Control / *Témoin.*
NS : Non significant / *Non significatif.*

REFERENCES

BAUD L. (1955) The influence of quantitative underfeeding during the last larval intermoult of *Bombyx mori* on its final development and on that of the next generation. Rev. Ver à Soie, 7(3/4), 73-157.

HANIFFA M.A., PUNITHAM T.M., ARUNACHALAM S. (1988) Effect of larval nutrition on survival, growth and reproduction in the silkworm, *Bombyx mori* L. Sericologia, 28(4), 563-575.

HORIE Y., WATANABE K. (1983) Daily utilization and consumption of dry matter of food by the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae). Appl. Ent. Zool., 18(1), 70-80.

INAGAKI S., YAMASHITA O. (1983) Metabolic shift from lipogenesis to glycogenesis in the last instar larval fat body of the silkworm, *Bombyx mori* L. Insect Biochem., 16(2), 327-331.

LEGAY J.-M. (1958) Recent advances in silkworm nutrition. Annual Rev. Entomol., 3, 75-86.

MATHAVAN S., SANTHI G., NAGARAJA S.B. (1987) Effect of feeding regime on energy allocation to reproduction in the silkworm, *Bombyx mori*. Proc. Indian Acad. Sci. (Anim. Sci.), 96(3), 333-340.

MATSUMURA S., TAKEUCHI Y. (1950) Experiment on nutrition of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Sericult. Sci. Japan, 19, 192-200.

MUTHUKRISHNAN J., MATHAVAN S., NAVARATHINA J.V. (1978) Effect of the restriction of the feeding duration on food utilization, emergence and silk production in *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombycidae). Monit. Zool. Ital., 12, 87-94.

PILLAI S.V. (1989) Growth studies in parental stocks of silkworm, *Bombyx mori* L., under tropical conditions. Indian J. Seric., 28(1), 53-66.

RADHAKRISHNA P.G., DELVI M.R. (1987) Effect of ration level on food utilization in the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombycidae). Sericologia, 27(2), 347-354.

RADHAKRISHNAN S., NARAYANAPRAKASH R., PERIASAMY K. (1985) Effect of food deprivation on silk production in *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombycidae). Sericologia, 25(3), 349-356.

SAMSON S., KRISHNASWAMY S. (1980) Some useful correlation studies of silkworm and products such as cocoon, pupa, shell and egg weight. Indian J. Seric., 19(1), 4-8.

SUNIOKA H., KURODA S., YOSHITAKA N. (1982) Relationship among food ingestion, food digestion and body weight gain in the silkworm larvae, *Bombyx mori, under restricted feeding by indices. J. Sericult. Sci. Japan, 51(1), 52-57.*

IMPACT DE DUREES DE NOURRISSAGE DIFFERENTES DES PARENTS SUR LES CARACTERES DE LA LARVE ET DU COCON A LA GENERATION SUIVANTE CHEZ *BOMBYX MORI* L.

D.C. PAUL* & D.C. DEB**

* P_2 Farm, Regional Sericultural Research Station, Kalimpong - 734 301, West Bengal, Inde.

** Department of Zoology, University of North Bengal, Darjeeling - 734 430, West Bengal, Inde.

Des larves du cinquième âge sorties de mûe de la race bivoltine KPG-B de ***Bombyx mori*** *ont été élevées à une température de 18 à 23 °C et une humidité relative de 66 à 74 % en décembre et alimentées de feuilles de mûrier pendant des durées variables de 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 jours, considérées comme traitements. La durée normale du nourrissage de ces larves, considérée comme le témoin, est de 7,25 jours. Les durées de nourrissage d'un et deux jours ont entraîné une mortalité larvaire de 100 % et la durée de nourrissage de 3 jours a donné seulement quelques adultes produisant à leur tour très peu d'oeufs matures ayant un faible taux d'éclosion. C'est pourquoi seuls les durées de nourrissage de 4 jours et plus ont été prises en compte dans la poursuite de l'étude.*

Les durées de nourrissages de 4 à 6 jours entraînent une réduction de la taille des chrysalides et du poids initial des larves écloses à la génération suivante, le poids diffère de manière significative ($p < 0,05$) de celui du témoin.

Le nourrissage ad libitum à la génération suivante ne fait pas apparaître de différence significative ($p > 0,05$) entre le témoin et les traitements pour ce qui concerne le poids d'une larve mature, la durée larvaire, le poids d'un cocon, le poids d'une coque et la richesse soyeuse. Les résultats indiquent que les caractères de la larve et du cocon sont déterminés génétiquement et que le stress dû aux différentes durées de nourrissage chez les parents n'a aucune influence sur ces caractères à la génération suivante.

INTRODUCTION

L'influence du mode de vie, des stress nutritionnels imposés et la robustesse et la qualité des individus de la génération parentale sur la qualité des larves et des cocons de la génération suivante est un sujet de controverse chez les experts. Il existe des études sur la restriction différencielle des durées de nourrissage et sur son effet sur la durée larvaire et les paramètres du cocon et de la croissance chez *Bombyx mori* (Muthukrishnan et coll., 1978 ; Radhakrishnan et coll., 1985 ; Mathavan et coll., 1987 ; Radhakrishna et Delvi, 1987). Ces études ont permis de confirmer certains effets négatifs de la restriction nutritionnelle sur les caractères de la larve et du cocon chez la génération parentale uniquement. Haniffa et coll. (1988) ont également observé que l'augmentation du nombre de nourrissages journaliers améliorait les qualités de la larve et du cocon chez la génération parentale. Mais aucune tentative n'a été faite pour déterminer si ces effets se transmettaient à la génération suivante. Cet article décrit l'impact du stress nutritionnel dû à la réduction du nombre de jours de nourrissage au cours de la vie larvaire des parents sur la génération suivante de *B. mori*.

MATERIELS ET METHODES

Des larves du cinquième âge larvaire ont été prélevées immédiatement après la quatrième mue sur un élevage stock et maintenues à une température de 18 à 23 °C et une humidité relative de 66 à 74 %. Les larves ont été alimentées de feuilles de mûriers de la variété S_1 quatre fois par jour et à volonté mais selon des nombres de jours de nourrissage différents et ont ensuite été privées de nourriture. Les larves alimentées pendant des nombres de jours différents de 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 jours sont considérées comme traitements et celles qui ont été nourries pendant la durée normale de 7,25 jours sont prises comme témoin. Chaque catégorie de traitement et le témoin comprennent 100 larves. En raison d'une mortalité larvaire de 100 % chez les larves nourries pendant un et deux jours et de la production d'un très faible nombre d'oeufs matures chez les femelles nourries pendant 3 jours, ces trois catégories de traitements n'ont pas été prises en compte dans les résultats. Les résultats obtenus à partir des traitements de nourrissage de 4, 5, 6 et 7 jours et du témoin ont été analysés. Chaque catégorie est composée de 4 réplicats. L'étude à la génération suivante est basée sur une ponte complète pour une femelle de chaque réplicat de chacune des catégories. Les paramètres considérés à la génération suivante sont : le poids de 100 larves écloses, le poids d'une larve mature, la durée larvaire, le poids d'un cocon, le poids d'une coque et la richesse soyeuse. Le sexage a été fait en ouvrant les cocons de chaque catégorie au 5e jour de la pupaison à l'aide d'une lame de rasoir aiguisée. Afin d'obtenir des oeufs viables, l'accouplement a été fait entre deux papillons issus d'une même catégorie de traitements et de témoin.

RESULTATS ET DISCUSSION

Le poids initial des larves écloses à la génération suivante augmente de manière significative lorsque le nombre de jours de nourrissage à la génération parentale augmente (Tableau I). Chez les insectes holométaboles comme *B. mori*, la source d'énergie permettant un développement rapide au cours de la vie pupale et la production d'oeufs par les femelles adultes provient du stockage nutritionnel au cours de la vie larvaire, particulièrement au cinquième âge. La larve du cinquième âge consomme à elle seule 87,67 % de la quantité totale de nourriture consommée sur l'ensemble de la vie larvaire (Matsumura et Takeuchi, 1950). De plus, la durée du cinquième âge larvaire est deux fois plus longue que celle des âges précédents et la quantité de nourriture consommée augmente jour après jour, cette quantité étant maximale le jour qui précède le filage (Horie et Watanabe, 1983). L'allongement de la période de nourrissage au cinquième âge correspond plus ou moins à une période de nourrissage facultative (Inagaki et Yamashita, 1986). Aussi le stress du jeûne imposé dans cette étude ne peut-il pas, au-delà du troisième jour, altérer totalement la vie larvaire et les performances suivantes. Le degré d'altération est en relation directe avec le stress imposé pour le nourrissage. C'est pourquoi les mauvaises performances obtenues pour le poids initial des larves écloses à la génération suivante sont dues aux restrictions nutritionnelles résultant des différences de durées de nourrissage au cours du dernier âge larvaire à la génération parentale.

La sous-alimentation au cours du dernier âge larvaire a un impact indiscutable sur le poids des oeufs à la génération suivante. Le poids des oeufs des individus soumis à l'expérience s'approche de celui des individus témoins proportionnellement à la quantité de nourriture donnée (Baud, 1955). Nos résultats révèlent une relation étroite entre le poids des oeufs et le poids des larves écloses. Le poids larvaire augmente en même temps que le poids des oeufs. Là encore, la quantité de feuilles de mûrier consommées et digérées est étroitement liée au gain de poids larvaire (Sunioka et coll., 1982) et, par conséquent, au poids des oeufs (Samson et Krishnaswamy, 1980).

Pour ce qui concerne la durée larvaire, le poids d'une larve mature, le poids d'un cocon, le poids d'une coque et la richesse soyeuse à la génération suivante, il n'y a aucune différence entre les traitements et entre chaque traitement et le témoin. Les caractères de la larve et du cocon obtenus chez

tous les traitements sont comparables à ceux obtenus chez les individus témoins. Ceci confirme l'hypothèse que le manque de nutrition imposé par la restriction du nombre de jours de nourrissage à la génération parentale ne peut pas modifier les caractères originaux déterminés génétiquement de la larve et du cocon de la génération suivante si la nourriture est donnée à volonté. Cette situation de manque chez les larves écloses est compensée progressivement au cours du développement larvaire. Ce résultat confirme une observation de Legay (1958). Il a également été observé que les souches de vers à soie maintenues à des faibles niveaux de nourrissage pendant 5 générations consécutives ont la possibilité de retrouver leurs caractères déterminés génétiquement si elles sont élevées à taux de nourrissage de 100 % aux générations suivantes (Pillai, 1989).

STUDY ON THE PRODUCTIVITY OF DIFFERENTIAL FEEDING AMOUNT IN SEX-LIMITED STRAINS OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L., FOR EGG AND LARVAL TRAITS

P. TZENOV & N. PETKOV

Sericultural Experiment Station, 24 Mito Orozov Street, Vratza 3000, Bulgaria.

*A study on the productivity of differential feeding amount has been carried out in the silkworm, **Bombyx mori** L., using sex-limited strains for egg and larval traits during the period of 1990-1992. It was found that in both strains the female larvae held a comparatively lower reduced feeding amount than the male ones.*

Traits such as mean cocoon weight, mean cocoon shell weight, cocoon filament length and number and weight of the normal eggs were affected to the highest extent by the feeding amount.

The feeding amount scarcely affected the reelability, raw silk percentage and weight of a single egg.

Keywords : Silkworm, *Bombyx mori* L. sex-limited strains for egg and larval traits, productivity, feeding amount.

INTRODUCTION

The sex separation of the individuals in ordinary breeds of silkworms (*Bombyx mori* L.) is a tedious work which requires skillfulness and labour during larval and pupal stages and is absolutely impossible at egg stage.

The first attempt to use genetically sex-limited lines was made by Tichomirov (1885) in silkworm breeds, followed by other researchers (Astaurov, 1940 ; Tazima, 1944 ; Hasimoto, 1948) and later by Lee *et al.* (1989) and others.

In recent years, some new sex-limited strains for egg and larval traits for commercial hybridization were made at the Sericultural Experiment Station (Vratza, Bulgaria).

Signal genes localized in the sex chromosomes and linked some morphological traits in some lines and breeds were used as initial material for breeding.

According to several authors (Horie *et al.*, 1976 ; Horie and Watanabe, 1983 ; Kafian, 1983), the male larvae in *Bombyx mori* utilize the food for silk production better than the female, therefore the worms have to be reared under favourable feeding amount for each sex.

The productivity of male and female larvae in two sex-limited silkworm, *Bombyx mori* L., strains for egg and larval traits raised at the Sericultural Experimental station (Vratza) was investigated under different feeding amounts in the present study.

MATERIALS AND METHODS

The study was carried out at the Sericultural Experiment Station (Vratza, Bulgaria) during the spring seasons of 1990-1992.

In the investigation, the strains T 15/4 and B 2/6 were used. Both strains were raised by using the intensive inbreed linear selection method at the 12th generation, using the Uzbekian sex-limited strain for egg colour Tashkentskaia 15 and the Japanese sex-limited strain for larval marking Belepol 2 as initial material.

In the T 15/4 strain, the eggs with a male embryo are yellow in colour and the eggs with a female embryo are coloured grey.

In the B 2/6 strain the male larvae are grey-white in colour and the female are parti-coloured with markings. During the 4th and 5th larval instars the experimental larvae were fed on different feeding amounts.

Three experimental groups were set up for each strain, comprising moderate feeding amount (group 1, control), reduced feeding amount (group 2) and excess feeding amount (group 3).

The different feeding amounts are shown in Table I.

Table I. Amount of leaves supplied.

Tableau I. Quantité de feuilles fournies.

Strain group	IVth instar	Vth instar	
	Fresh leaves (g/larva)	Fresh leaves (g/larva)	Dry matter (g/larva)
Souches et groupes	*4e âge*	*5e âge*	
	Feuilles fraîches (g/larve)	*Feuilles fraîches (g/larve)*	*Matière sèche (g/larve)*
T 15/4 :			
1 M	3.88	14.72	4.21
1 F	3.88	14.72	4.21
2 M	2.91	12.88	3.29
2 F	2.91	12.88	3.29
3 M	5.63	22.91	5.74
3 F	5.63	22.91	5.74
B 2/6 :			
1 M	3.22	14.72	4.21
1 F	3.22	14.72	4.21
2 M	2.91	12.88	3.29
2 F	2.91	12.88	3.29
3 M	4.67	22.49	5.64
3 F	5.31	22.49	5.64

M : Male / *Mâle* ; F : Female / *Femelle*.

In the 4th instar, each group consisted of 4 replicates of 100 larvae each and in the 5th instar each group consisted of 4 replicates of 50 larvae. To compensate the mortality during the 4th and 5th larval

instars, 2 reserve batches fed on the same feeding amount were maintained in parallel to each group. The larvae were reared on stands in paper boxes of $32 \times 22 \times 7$ cm (704 cm^2) for 50 larvae during the 5th instar, following the standard procedure (Petkov *et al.*, 1989).

The mulberry leaves were picked from low and middle stem mulberry plantations and the food was given 4 times a day.

The traits studied are the following :

- Biological traits : survival ratio of larvae, mean raw cocoon weight, mean cocoon shell weight, raw cocoon yield per 1 box of silkworm eggs (20 000 ± 200 survival eggs).
- Technological traits : filament length, reelability, raw silk percentage, size of cocoon filament (metrical number).
- Reproductive traits : percentage of moth emergence, number and weight of normal eggs per laying, mean weight of a single egg, egg yield per 1 kg of raw cocoons.

The data obtained were calculated on the basis of adopted and unified international methods and were statistically analysed (Lidansky, 1988).

RESULTS AND DISCUSSION

The data obtained are shown in Tables II-IV.

The survival rate of male worms in the sex-limited strain for egg colour, T 15/4, was the highest at the reduced feeding amount (94.25 %), followed by moderate (93.75 %) and excess feeding amount (82.50 %).

A contrary relationship was found in female worms. The survival rate of the larvae was the lowest at the reduced feeding amount (77.50 %) and the highest at the excess feeding amount (88.50 %).

The survival rate of larvae was the highest at the reduced feeding amount and the lowest at the excess feeding amount in the sex-limited strain for larval marking, B 2/6.

The highest mortality in larvae fed with excess feeding amount was probably due to the higher quantities of mulberry leaves which had been given during the period, respectively the higher quantities of ingested bacteria, which in some cases were proved to be pathogenic (Kurisu *et al.*, 1975 ; Sukumar and Ramalingam, 1986).

The highest mortality may also be considered to the disorganization of the digestive system, which may be due to the excessive feeding. With the exception of group 3 in T 15/4 strain, in all the other feeding groups male larvae showed a higher survival percentage in comparison with the female larvae, which is in agreement with the findings of other scientific workers (Sitarama *et al.*, 1975 ; Kafian, 1983 ; Strunnikov, 1987). The mean raw cocoon and cocoon shell weights shown on the same table manifested a significant dependence ($p < 0.001$) on the feeding amount.

The values of these traits were comparatively the highest at the excess feeding amount, followed by moderate and low feeding amounts. A similar relationship was detected by Sumioka *et al.* (1982), Nath *et al.* (1980) and Hideshi *et al.* (1982).

The marked reduction of cocoon and cocoon shell weight in reduced feeding amount was probably due to the lower quantity of ingested and digested food and also to the interlocking of reserve protein synthesis when the worms were put under starvation during the 5th instar (Tojo *et al.*, 1981). The restricted possibilities in *Bombyx mori* L. in comparison with the other insects to compensate the feeding decrease (Muthakrishnan *et al.*, 1978) were also probably involved.

In all the groups studied the cocoon weight was higher in female worms and the difference between sexes was comparatively the highest in the excess feeding amount, while in the other feeding amounts the differences were significantly less. This suggests that when fed with excess feeding amount the females should give a higher productivity than the males.

The study reveals that in the mean cocoon shell weight in B 2/6 strain there exists a relationship similar to that observed in the mean cocoon weight, while in the T 15/4 strain the females show a significantly lower cocoon shell weight than the males. It is known that the excess chromosomal parts cause some trouble in the physiology of the silkworm, resulting in the decrease in silk production.

The differences were the highest in the reduced feeding amount (+ 24.54 %) in favour of male silkworms and comparatively were the lowest at the excess feeding amount (+ 5.16 %).

Table II. Biological traits.

Tableau II. Caractères biologiques.

Strain group *Souches et groupes*	Survival ratio of larvae (%) $\bar{X} \pm S\bar{x}$ *Taux de survie des larves (%)* $\bar{X} \pm S\bar{x}$	Single cocoon weight (%) $\bar{X} \pm S\bar{x}$ *Poids d'un cocon (g)* $\bar{X} \pm S\bar{x}$	Single cocoon shell weight (cg) $\bar{X} \pm S\bar{x}$ *Poids d'une coque (cg)* $\bar{X} \pm S\bar{x}$	Raw cocoon yield per 1 box of silkworm eggs (kg) $\bar{X} \pm S\bar{x}$ *Rendement en cocons pour 1 boîte d'oeufs (kg)* $\bar{X} \pm S\bar{x}$
T 15/4 :				
1 M	93.75 ± 1.49	1.49 ± 0.024	37.3 ± 0.5	29.13 ± 0.95
2 M	94.25 ± 0.84	1.36 ± 0.028*	34.0 ± 0.9	28.98 ± 0.46
3 M	82.50 ± 2.30***	1.67 ± 0.049**	40.7 ± 0.4	25.53 ± 0.93**
1 F	87.00 ± 2.07	1.64 ± 0.024	34.0 ± 0.9	26.10 ± 0.91
2 F	77.50 ± 1.37**	1.42 ± 0.016**	27.3 ± 1.1***	21.03 ± 0.56**
3 F	88.50 ± 1.15	1.81 ± 0.05*	38.7 ± 1.1**	28.92 ± 0.78*
B 2/6 :				
1 M	97.50 ± 0.90	1.50 ± 0.019	36.7 ± 0.5	29.00 ± 0.87
2 M	97.50 ± 0.55	1.37 ± 0.033*	35.3 ± 1.1	27.50 ± 0.79
3 M	96.00 ± 1.39	1.73 ± 0.030**	43.3 ± 3.0*	34.90 ± 0.48**
1 F	92.00 ± 0.92	1.87 ± 0.024	42.0 ± 0.9	28.51 ± 0.77
2 F	92.50 ± 1.04	1.61 ± 0.034**	35.3 ± 0.8***	26.00 ± 0.30
3 F	83.00 ± 3.03**	2.28 ± 0.046***	48.0 ± 0.9***	31.10 ± 1.46

M : Male / *Mâle* ; F : Female / *Femelle*.
* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

On the basis of these results it may be suggested that the female worms did not hold the reduced feeding amount as well as the males.

The raw cocoon yield per 1 box of silkworm eggs is a complex trait and it depends on the hatchability of eggs, the survival amount of larvae and the cocoon weight.

The results obtained suggest that in both strains studied the raw cocoon yield per 1 box of eggs was lower in the females (except for group 3, T 15/4 strain) and it was probably due to the lower survival percentage of larvae. The information about the main technological traits of dry cocoons (Table III) did not show any significant differences, which were due to the feeding amount.

The trait filament length followed differences between sexes similar to those observed in the cocoon shell weight.

In the reelability and size of cocoon filament the differences between sexes were small, while in the percentage of raw silk the males exceeded significantly the females.

The data concerning reproductive traits (Table IV) showed that the percentage of moth emergence was comparatively the highest at the reduced feeding amount (87.00 and 75.00 %) and it was the lowest at the excess feeding amount (68.00 and 57.00 %).

Table III. Technological traits.

Tableau III. Caractères technologiques.

Strain group	Filament length (m) $\overline{X} \pm S\overline{x}$	Reelability (%) $\overline{X} \pm S\overline{x}$	Raw silk percentage $\overline{X} \pm S\overline{x}$	Size of cocoon filament (denier) $\overline{X} \pm S\overline{x}$
Souches et groupes	*Longueur du filament (en m)* $\overline{X} \pm S\overline{x}$	*Dévidabilité (%)* $\overline{X} \pm S\overline{x}$	*Pourcentage de soie grège* $\overline{X} \pm S\overline{x}$	*Taille de la bave du cocon (denier)* $\overline{X} \pm S\overline{x}$
T 15/4 :				
1 M	1157 ± 27	86.94 ± 0.76	46.07 ± 0.81	2.51 ± 0.02
2 M	1135 ± 82	84.77 ±1.27	47.61 ± 2.11	2.38 ± 0.12
3 M	1170 ± 57	85.01 ± 0.89	46.12 ± 1.07	2.61 ± 0.01
1 F	1055 ± 49	85.73 ± 0.76	40.85 ± 0.66	2.51 ± 0.13
2 F	971 ± 64	86.02 ± 1.02	41.75 ± 0.66	2.67 ± 0.15
3 F	1075 ± 61	85.44 ± 0.37	42.96 ± 1.04	2.79 ± 0.25
B 2/6 :				
1 M	1103 ± 46	85.33 ± 2.00	46.55 ± 1.78	3.33 ± 0.01
2 M	971 ± 25	87.48 ± 1.33	46.16 ± 0.52	2.97 ± 0.11*
3 M	1144 ± 57	88.98 ± 0.97	47.14 ± 1.44	3.46 ± 0.14
1 F	1139 ± 36	88.71 ± 0.55	45.71 ± 0.55	3.18 ± 0.15
2 F	929 ± 44*	87.04 ± 0.90	46.64 ± 0.68	3.13 ± 0.001
3 F	1078 ± 57	86.54 ± 0.25	45.80 ± 3.18	3.27 ± 0.003

M : Male / *Mâle* ; F : Female / *Femelle*.
* P < 0.05 ; ** P < 0.01 ; *** P < 0.001

There was a direct relationship between the survival percentage of larvae and the moth emergence. The number and weight of normal eggs laid showed a significant dependence on the feeding amount ($p < 0.001$), which is in agreement with Sumioka *et al.* (1982), Nath *et al.* (1990) and Legay (1975).

According to Mathavan *et al.* (1987), the ovary length and biomass increase at the excess feeding amount. Band (1973) demonstrated that forced starvation of the 5th instar larvae influenced not only the egg weight but decreased the quantity of spare carbohydrates and fats in the pupal body and the starch in the eggs as well. As for the influence of the feeding amount on the mean weight of a single egg our results confirm the results reported by other authors (Legay, 1975 ; Sumioka *et al.*, 1982 ;

Hideshi *et al.*, 1982) about the missing of such influence. The egg yield per 1 kg of raw cocoons depended largely on the moth emergence percentage and followed the regularities detected in this trait. A comparatively large number and high weight of eggs laid by the silkworms fed with excess feeding amount did not compensate the high differences in the moth emergence percentage.

Table IV. Reproductive traits.

Tableau IV. Caractères liés à la reproduction.

Strain group *Souches et groupes*	Moth emergence (%) $\overline{X} \pm S\overline{x}$ *Emergence des papillons (%)* $\overline{X} \pm S\overline{x}$	Number of normal eggs per laying $\overline{X} \pm S\overline{x}$ *Nombre d'oeufs normaux par ponte* $\overline{X} \pm S\overline{x}$	Weight of normal eggs per laying (cg) $\overline{X} \pm S\overline{x}$ *Poids des oeufs normaux issus d'une ponte (cg)* $\overline{X} \pm S\overline{x}$	Mean weight of a single egg (mg) $\overline{X} \pm S\overline{x}$ *Poids moyen d'un oeuf (mg)* $\overline{X} \pm S\overline{x}$	Egg yield per 1 kg of raw cocoons (g) $\overline{X} \pm S\overline{x}$ *Rendement en oeufs pour 1 kg de cocons frais (g)* $\overline{X} \pm S\overline{x}$
T 15/4 :					
1	71.00 ± 0.89	537 ± 11	29.5 ± 0.8	0.549 ± 0.006	66.77 ± 2.07
2	81.00 ± 1.60**	496 ± 18***	26.5 ± 1.2**	0.535 ± 0.023	77.41 ± 3.18**
3	68.00 ± 0.83**	605 ± 14***	34.0 ± 0.4***	0.562 ± 0.013	66.34 ± 0.68
B 2/6 :					
1	65.00 ± 1.77	593 ± 11	32.9 ± 1.0	0.555 ± 0.011	63.40 ± 2.15
2	75.00 ± 1.23***	522 ± 17**	27.0 ± 0.7*	0.517 ± 0.013	67.95 ± 3.18
3	57.00 ± 2.50**	599 ± 23	35.0 ± 2.3	0.584 ± 0.036	49.92 ± 4.06*

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

In conclusion, the results of our present investigation clearly bring out that the female larvae of the silkworm, *Bombyx mori* L., held comparatively poorly reduced feeding amount and that those traits as the mean cocoon weight, mean cocoon shell weight and filament length were highly affected by the feeding amount.

Traits such as mean cocoon weight, mean cocoon shell weight and number and weight of normal eggs per laying are highly influenced by the feeding amount, but those traits as reelability, raw silk percentage and mean weight of a single egg are hardly influenced by the feeding amount.

REFERENCES

ASTAUROV B.L. (1940) Artificial parthogenesis in the silkworm (*Bombyx mori*). An experimental study. USSR Acad. Press, Moscow, 221-240.
BAND Z. (1973) Contribution à l'étude de la physiologie du jeûne chez un insecte. II : Effets du jeûne larvaire sur les chrysalides et les oeufs de la génération suivante. Ann. Zool. Ecol. An. Im., 5(1), 1-2.
HASIMOTO H. (1948) Sex-limited zebra, an X-ray mutation in the silkworm. J.Sericult.Sci.Japan,16.
HIDESHI S., SHIGERU K., NARUMI Y. (1982) Feed efficiency and expression of several characters of the silkworm, *Bombyx mori*, under the restricted feeding. J. Sericult. Sci. Japan, 51(5), 415-419.
HORIE Y., INOKUCHI T., WATANABE K., NAKASONE S., YANAGAWA H. (1976) Quantitative study on food utilization by the silkworm, *Bombyx mori*, through its life cycle. I. Economy of dry matter and carbon. Bull. of Sericult. Exp. Sta. (Tokyo), 26(6), 411-442.
HORIE Y., WATANABE K. (1983) Daily utilization and consumption of dry matter in food by the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae). Appl. Ent. Zool., 18(1), 70-80.
KAFIAN A. (1982) Ocenka productivnosti samcov i samok tutovogo shelkopriada v zavisimosti ot norm kormlenia. Nauch. Tr. Gruz. sel. hos. in-ta, 125(3), 34-43.
KAFIAN A. (1983) Ispolozovanie raznokachestvennogo korma samcami i samkami tutovogo shelkopriada. Shelk, 1.
KURISU K., MATSUMOTO T., INOUE Y. (1975) Enhanced multiplication of enterococcus in the midgut rumen of the starved silkworm larvae, *Bombyx mori* L. J. Sericult. Sci. Japan, 44(1), 7-10.
LEE S.P., KIM S.E., KIM K.M., LEE S.M., LEE H.Z., LEE Y.I. (1989) Induction of sex-limited cocoon colour character by translocation of yellow blood gene Y (II-25,6) on to W chromosome by gamma irradiation in silkworm, *Bombyx mori*. Korean J. of Breeding, 21(3), 219-223.
LEGAY J.-M. (1975) Sur le déterminisme séquentiel de l'ovogenèse chez *Bombyx mori* : arrêt expérimental par le jeûne et interprétation. C.R. Acad. Sci., 280(23), 2689-2692.
LIDANSKI T. (1988) Statistischeski metodi v biologiata i selskoto stopanstvo. Sofia.
MATHAVAN S., SANTHI G., SETHURAMAN B. (1987) Effects of feeding regime on energy allocation to reproduction in the silkworm, *Bombyx mori*. Proc. Indian Acad. Sci. Anim. Sci., 96(3), 333-340.
MUTHUKRISHNAN J., MATHAVAN S., NAVARATHINA V. (1978) Effects of the struction of feeding duration on food utilization, emergence and silk production in *Bombyx mori* L. Monit. Zool. Ital., 12(2-3), 87-94.
NATH T., NATH S., SAMSUDDIN M., RAO G. (1990) Effect of food deprivation on dry matter utilization, shell and cocoon weight and fecundity of multivoltine silkworm, *Bombyx mori*, race Nistari. Indian J. Seric., 29(2), 174-181.
PETKOV N., PETKOV M., MANCHEV M., NACHEVA J., ALEKSANDROV A. (1989) Manual on Sericulture. Sofia, 107 p.
SITARAMA L., GUAESH N., TIKOO B. (1975) Studies on the differential viability of sexes in the sex-limited breeds of silkworm, *Bombyx mori* L., in use in India. Indian J. Seric., 14(1), 6-11.
STRUNNIKOV B. (1987) Geneticheskie metodi selekcii i regulacii pola tutovogo shelkopriada. Moscow.
SUKUMAR J., RAMALINGAM A. (1986) Studies on the phylloplane microflora of mulberry. I. Bacterial populations on healthy leaves. Sericologia, 26(4), 535-543.
SUMIOKA H., KURODA S., YOSHITAKE N. (1982) Feed efficiency and expression of several characters of the silkworm, *Bombyx mori*, under the restricted feeding. J. Sericult. Sci. Japan, 51(5), 415-419.
TIHOMIROV A. (1891) Osnovi prakticheskogo shelkovodstva. Moscow.
TOJO S., KIGUCHI K., KIMURA S. (1981) Hormonal control of storage protein synthesis and uptake by the fat body in the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol., 27(7), 491-497.

ETUDE SUR LA PRODUCTIVITE DE SOUCHES DE VER A SOIE *BOMBYX MORI* L. A MARQUAGE SEXUEL SUR L'OEUF ET LA LARVE SOUMISES A DIFFERENTS TAUX DE NOURRISSAGE

P. TZENOV & N. PETKOV

Sericultural Experiment Station, 24 Mito Orozov Street, Vratza 3000, Bulgarie.

Une étude sur la productivité de différents taux de nourrissage a été réalisée de 1990 à 1992 chez le ver à soie ***Bombyx mori*** *en utilisant une souche à marquage sexuel de l'oeuf et une souche à marquage sexuel de la larve.*

Chez les deux souches, les larves femelles absorbent une quantité de nourriture comparativement plus faible que les mâles.

Les caractères tels que le poids moyen du cocon, le poids moyen de la coque, la longueur du filament et le nombre et le poids des oeufs normaux sont très fortement affectés par le taux de nourrissage. Le taux de nourrissage a très peu d'incidence sur la dévidabilité, la richesse soyeuse et le poids d'un oeuf.

INTRODUCTION

Le sexage des individus des races ordinaires de vers à soie (*Bombyx mori* L.) est un travail fastidieux qui demande beaucoup de savoir-faire pour les stades larvaire et pupal et est absolument irréalisable au stade oeuf.

Tichomirov (1885) a tenté le premier d'utiliser des lignées à marquage génétique sexuel chez des souches de vers à soie, suivi par d'autres chercheurs (Astaurov, 1940 ; Tazima, 1944 ; Hasimoto, 1948) et plus tard par Lee et coll. (1989), etc.

Ces dernières années, de nouvelles souches à marquage sexuel de l'oeuf et de la larve destinées à l'hybridation commerciale ont été isolées à la Station d'expérimentation séricicole de Vratza, Bulgarie.

Des gènes signaux situés dans les chromosomes sexuels et liés à certains caractères morphologiques chez certaines lignées et certaines souches ont été utilisés comme matériel initial de sélection.

Plusieurs auteurs (Horie et coll., 1976 ; Horie et Watanabe, 1983 ; Kafian, 1983) ont observé que les larves mâles de *Bombyx mori* ont une meilleure utilisation de la nourriture pour la production de soie que les femelles. Les larves doivent donc être élevées en fonction des taux de nourrissage favorables pour chaque sexe.

On a étudié la productivité des larves mâles et femelles en fonction de différents taux de nourrissage chez deux souches à marquage sexuel de l'oeuf et de la larve du ver à soie *Bombyx mori* élevées à la Station d'expérimentation séricicole de Vratza.

MATERIELS ET METHODES

Cette étude a été réalisée à la Station d'expérimentation séricicole de Vratza (Bulgaric) pendant les élevages de printemps de 1990 à 1992 sur les souches T 15/4 et B 2/6.

Ces deux souches ont été isolées par la méthode de la sélection linéaire consanguine intensive à la 12e génération en utilisant la souche ouzbek à marquage sexuel de la couleur de l'oeuf Tashkentkaia 15 et la souche japonaise à marquage sexuel de la larve Belepol 2 comme matériel initial.

Chez la souche T 15/4, les oeufs contenant un embryon mâle sont jaunes et les oeufs contenant un embryon femelle sont gris.

Chez la souche B 2/6, les larves mâles sont de couleur gris-blanc et les femelles sont versicolores avec des marquages. Les larves des lots expérimentaux ont été soumises à différents taux de nourrissage au 4e et au 5e âge larvaire.

Pour chacune des souches, trois groupes expérimentaux correspondant au taux de nourissage modéré (group 1, témoin), au taux de nourrissage réduit (groupe 2) et au taux de nourrissage excédentaire (groupe 3) ont été mis en place.

Les différents taux de nourrissage sont présentés dans le tableau I.

Chaque groupe est composé de 4 réplicats de 100 larves au 4e âge et de 4 réplicats de 50 larves au 5e âge. Pour compenser la mortalité aux 4e et 5e âges larvaires, 2 lots nourris selon des taux de nourrissages identiques ont été élevés en parallèle. Les larves ont été élevées dans des boîtes en papier placées sur des étagères d'après la procédure standard (Petkov et coll., 1989).

Les feuilles de mûriers ont été ramassées sur les parties inférieure et médiane de la tige et le nourrissage a été effectué 4 fois par jour.

Les caractères étudiés sont les suivants :

- Caractères biologiques : taux de survie des larves, poids moyen d'un cocon frais, poids moyen de la coque, rendement en cocons frais pour 1 boîte d'oeufs de vers à soie (20 000 ± 200 oeufs survivants).
- Caractères technologiques : longueur du filament, dévidabilité, richesse soyeuse, taille du filament (mesure métrique).
- Caractères de la reproduction : pourcentage d'émergence des papillons, nombre et poids des oeufs normaux dans une ponte, poids moyen d'un oeuf, rendement en oeufs pour 1 kg de cocons frais.

Les données obtenues ont été calculées d'après les normes internationales et analysées statistiquement (Lidansky, 1988).

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données obtenues sont présentées dans les tableaux II à IV.

Le pourcentage de survie des larves mâles de la souche à marquage sexuel de la couleur de l'oeuf T 15/4 est maximal avec le taux de nourrissage réduit (94,25 %) devant le taux de nourrissage modéré (93,75 %) et le taux de nourrissage excédentaire (82,50 %).

On a observé une relation inverse chez les larves femelles : le pourcentage de survie des larves est minimal avec le taux de nourrissage réduit (77,50 %) et maximal avec le taux de nourrissage excédentaire (88,50 %).

Le pourcentage de survie des larves est maximal avec le taux de nourrissage réduit et minimal avec le taux de nourrissage excédentaire chez la souche à marquage sexuel de la larve B 2/6.

La mortalité maximale chez les larves soumises à un taux de nourrissage excédentaire est probablement due aux quantités élevées de feuilles de mûrier données comme aliment au cours de l'expérience, impliquant une ingestion plus importante de bactéries qui se sont, pour certaines, révélées toxiques (Kurisu et coll., 1975 ; Sukumar et Ragalingam, 1986).

La mortalité maximale peut également être consécutive à une désorganisation du système digestif due au nourrissage excessif. A l'exception du groupe 3 de la souche T 15/4, tous les autres groupes de nourrissage présentent un taux de survie plus élevé chez les mâles que chez les femelles, ce qui corrobore les conclusions d'autres chercheurs (Sitarama et coll., 1975 ; Kafian, 1983 ; Strunnikov,

1987). Le poids moyen d'un cocon frais et le poids moyen d'une coque, présentés dans le même tableau, donnent une corrélation significative ($p < 0,001$) avec le taux de nourrissage.

Les valeurs de ces caractères sont maximales avec le taux de nourrissage excédentaire, devant les taux de nourrissage modéré et faible. Une relation identique a été observée par Sumioka et coll. (1982), Nath et coll. (1980) et Hideshi et coll. (1982).

La diminution marquée des poids du cocon et de la coque observée avec le taux de nourrissage réduit est probablement due à la diminution de la quantité de nourriture ingérée et digérée ainsi qu'à la synthèse des protéines de réserve lorsque les larves sont soumises au jeûne au cours du 5e âge (Tojo et coll., 1981). Elle peut également s'expliquer par la capacité limitée de *Bombyx mori* L. à compenser la diminution du nourrissage par rapport à d'autres insectes (Muthakrishnan et coll., 1978).

Chez tous les groupes étudiés, le poids du cocon est plus élevé chez les femelles que chez les mâles et la différence entre les sexes est la plus forte avec le taux de nourrissage excédentaire tandis que pour les autres taux de nourrissage, la différence est moins marquée. Ceci suggère que, avec un taux de nourrissage excédentaire, les femelles devraient avoir une productivité supérieure à celle des mâles.

Cette étude révèle que, pour le poids moyen de la coque chez la souche B 2/6, il existe une relation identique à celle observée pour le poids moyen du cocon tandis que, chez la souche T 15/4, les femelles présentent un poids de la coque nettement inférieur à celui des mâles. On sait que les parties chromosomiques excédentaires provoquent des troubles de la physiologie chez le ver à soie entraînant une diminution de la production de soie.

Les différences sont maximales en faveur des mâles (+ 24.54 %) avec le taux de nourrissage réduit et minimales avec le taux de nourrissage excédentaire.

Ces résultats suggèrent que les larves femelles utilisent moins bien le taux de nourrissage réduit que les mâles.

Le rendement en cocons frais pour une boîte d'oeufs de vers à soie est un caractère complexe qui dépend du taux d'éclosion des oeufs, du pourcentage de survie des larves et du poids du cocon.

Les résultats obtenus indiquent que, chez les deux souches étudiées, le rendement en cocons frais pour une boîte d'oeufs est plus faible chez les femelles (à l'exception du groupe 3 de la souche T 15/4) ; ceci est probablement dû au fait que le pourcentage de survie des larves est inférieur. Les données concernant les principaux caractères technologiques des cocons secs (Tableau III) révèlent que le taux de nourrissage n'entraîne aucune différence significative.

La longueur du filament présente des différences entre les sexes, similaires à celles observées pour le poids de la coque.

Pour ce qui concerne la dévidabilité et la taille du filament, les différences entre les sexes sont faibles, tandis que, pour la richesse soyeuse, les mâles donnent des résultats nettement supérieurs à ceux obtenus pour les femelles.

Les données concernant les caractères de reproduction (Tableau IV) montrent que le pourcentage d'émergence des papillons est maximal avec le taux de nourrissage réduit (87,00 % et 75,00 %) et minimal avec le taux de nourrissage excédentaire (68,00 % et 57,00 %).

Il y a une relation directe entre le pourcentage de survie des larves et l'émergence des papillons. Le nombre et le poids d'oeufs pondus dépendent de manière significative ($p < 0,001$) du taux de nourrissage, ce qui corrobore les résultats de Sumioka et coll. (1982), de Nath et coll. (1990) et de Legay (1975).

D'après Mathavan et coll. (1987), la longueur des ovaires et la biomasse augmentent avec le taux de nourrissage excédentaire. Band (1973) a établi que le jeûne forcé des larves du 5e âge non seulement affectait le poids des oeufs mais entraînait une diminution des hydrates de carbones et des graisses libres chez les chrysalides ainsi que de l'amidon chez les oeufs. Nos résultats confirment l'absence d'influence du taux de nourrissage sur le poids moyen d'un oeuf, comme cela a été observé par d'autres auteurs (Legay, 1975 ; Sumiok et coll., 1982 ; Hideshi et coll., 1982). Le rendement en oeufs pour 1 kg de cocons frais est étroitement lié au pourcentage d'émergence des papillons et suit la régularité détectée dans ce caractère. Le nombre et le poids comparativement élevés d'oeufs pondus par les vers à soie soumis à un taux de nourrissage excédentaire ne permettent pas de compenser la différence obtenue pour le pourcentage d'émergence des papillons.

En conclusion, les résultats de notre étude font clairement apparaître que les larves femelles du ver à soie *Bombyx mori* L. utilisent moins bien le taux de nourrissage réduit et que les caractères tels que le poids moyen d'un cocon, le poids moyen de la coque et la longueur du filament sont fortement affectés par le taux de nourrissage.

Le taux de nourrissage affecte fortement les caractères tels que le poids moyen du cocon, le poids moyen de la coque et le nombre et le poids d'oeufs normaux par ponte mais n'a pratiquement aucune incidence sur les caractères tels que la dévidabilité, la richesse soyeuse et le poids moyen d'un oeuf.

STUDY ON THE FOOD UTILIZATION IN GENETIC SEX-LIMITED BREEDS FOR EGG AND LARVAL TRAITS OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L., AT MODERATE, REDUCED AND EXCESS FEEDING AMOUNTS

P. TZENOV

Sericultural Experiment Station, 24 Mito Orozov Street, Vratza 3000, Bulgaria.

Throughout the period 1990-1992 a study on the food utilization in sex -limited strains for egg and larval traits, namely T 15/4 and B 2/6 at three different feeding amounts was conducted at the Sericultural Experiment Station, Vratza, Bulgaria.

It was determined that the most important indices characterizing the food ingestion, digestion and utilization depend, to a great extent, on the feeding amount.

The female larvae in the T 15/4 strain utilized the food better for body matter at the moderate and excess feeding amounts.

The male larvae in the same strain utilized the food better than the female ones in respect of body matter at the reduced feeding amount and in respect of cocoon shell at all feeding amounts.

The female larvae in B 2/6 strain utilized the food better at reduced and moderate feeding amounts and the male larvae utilized the food better at the excess feeding amount.

Keywords : Silkworm, *Bombyx mori* L., sex-limited strains for egg and larval traits, feeding amounts, utilization.

INTRODUCTION

According to several scientific workers (Petkov *et al.*, 1981 ; Strunnikov, 1987) the use of some sex limited strains for egg and larval traits makes the silkworm egg production technology easier and also allows an opportunity to conduct sex-separated silkworms rearings.

The food utilization by the male and the female in the silkworm, *Bombyx mori* L., has been thoroughly studied in ordinary breeds (Horie *et al.*, 1976 ; Slansky and Scriber, 1982 ; Horie and Watanabe, 1983 ; Periasami and Radhakrishan, 1985).

Strunnikov (1987) reported that because of the translocation of a part of the X autosoma where the dominant factor W 2, controlling the coloration of the eggs, is located in the female sex chromosome the productivity of the females in the sex-limited strains for egg colour was lower than that of the females in the ordinary strains and they had considerably lower productivity than the males of sex-limited strains.

Accordingly, the information obtained from those strains cannot be applied directly to normal strains.

According to Kafian (1982) and Sumioka *et al.* (1982), the evaluation of the strains must be made on the basis of the food utilization efficiency under favourable conditions for each sex feeding amounts.

The present study has been carried out to elucidate the characteristics of food ingestion, food digestion and food utilization in male and female silkworms in the sex limited strains for egg and larval traits T 15/4 and B 2/6 of the silkworm, *Bombyx mori* L., at different feeding amounts.

MATERIALS AND METHODS

The investigation was carried out during the spring seasons of the period 1990-1992 by using the sex-limited strain for egg colour, T 15/4, and the sex-limited strain for larval marking, B 2/6.

The ingestion, digestion and utilization of the dry matter were determined following the gravimetrical method described by several authors (Walbauer, 1968 ; Horie *et al.*, 1976 ; Kogan and Parra, 1981 ; Horie and Watanabe, 1983). The experiments were conducted on 4th and 5th instar larvae and the larvae were fed on three different feeding amounts shown in our other article (Tzenov and Petkov, 1993). Three groups were set up for different feeding amounts. They were marked as moderate (group 1), reduced (group 2) and excess (group 3) feeding. After the third moult 3 experimental batches were set up for each strain and sex, and each batch consisted of 4 replicates of 100 larvae per replicate.

After the 4th moult 50 larvae in each replicate were left and reared up to the end of larval stage.

To compensate the mortality 2 reserve batches, consisting of 50 larvae each, were maintained in parallel with each experimental group.

In order to check the initial larval weight 20 larvae of each variant were taken without selection before starting the feeding and thereafter they were dried at 80-50 °C to constant weight. The larvae were reared in paper boxes of 32 cm × 22 cm × 7cm (704 cm^2) for 50 worms during the 5th instar, following the standard methods (Petkov *et al.*, 1989).

The larvae were fed 4 times a day on mulberry leaves which were harvested from the same age of low and middle stem plants of Nr 106 variety, cultivated at the Sericultural Experiment Station - Vratza.

Two samples of mulberry leaves were taken daily in the same volume as that in the given food and dried to constant weight. The final larval weight was checked for 20 larvae from each group after the final feeding. After finishing the feeding the remains of food and excreta were collected, separated and dried to a constant weight at 80-90 °C.

In order to determine the dry weight of the cocoon shell, pupae, moths and eggs samples were taken randomly from each group. The samples of the pupae and the cocoons shells were taken 9 days after the starting of the silk excretion, the samples of moths were taken after the oviposition had been finished and the samples of eggs were taken 16 days after being laid.

The indices, characterizing the food ingestion, food digestion and utilization were calculated using the following formulae :

$$CI = \frac{F}{T \times A}$$

where,
CI : consumption index,
F : dry weight of ingested food by a single larva at the 5th instar,
T : length of the feeding period (days),
A : mean dry weight of a single larva during the feeding period (g).

$$GR = \frac{G}{G \times A}$$

where,
GR : growth rate,
G : body weight gained during the feeding period.

$$AI = \frac{F}{LS} \times 100$$

where,
AI : approximate ingestibility,
LS : amount of leaves supplied (dry weight).

$$AD = \frac{F - F_1}{F} \times 100$$

where,
AD : approximate digestibility
F_1 : dry weight of excrements.

$$ECI = \frac{P}{F} \times 100$$

where,
ECI : efficiency of conversion of the ingested food into body matter (%).
P : dry weight of the products obtained (body gain of the larvae during the feeding period, cocoon shell obtained, pupae, moths and eggs).

$$ECD = \frac{P}{F - F_1} \times 100$$

where,
ECD : efficiency of conversion of the digested food into body substances (%).

$$RIF = \frac{F}{P}$$

where,
RIF : dry matter ingested per g of body dry weight gain (g) or g of dry cocoon shell.

$$RDF = \frac{F - F_1}{P}$$

where,
RDF : dry matter digested per g of body weight gain or g of dry cocoon shell.

$$R = \frac{F}{F_1}$$

where,
R : reference ratio.

The scheme of the food utilization economy was calculated following the formula of Petrusewica and Mack Fadien (1970) represented as $F = P + R + F_1 + U$, where R is the energy lost as heat due to the metabolism and U is the nitrogenous excretory products, which were not estimated because of their negligible quantity (Waldbauder, 1968).

The data obtained were analysed statistically (Lidanski, 1988).

RESULTS

The data obtained are shown in Tables I-IV.

In Table I, we can see that the quantity of the ingested food and ingestibility per larva during the 5th instar depended in both cases on the feeding amount and sex.

Table I. Quantities of dry matter ingested and digested by a single larva during the 5th instar, approximate digestibility, consumption indices and ingestibility.

Tableau I. Quantités de matière sèche ingérée et digérée par une larve au cours du cinquième âge, digestibilité approximative, indices de consommation et ingestibilité.

Strain group	Ingested food (g) $\bar{X} \pm S\bar{x}$	Digested food (g) $\bar{X} \pm S\bar{x}$	Approximate digestibility (%) $\bar{X} \pm S\bar{x}$	Consumption indices (mg) $\bar{X} \pm S\bar{x}$	Ingestibility (%) $\bar{X} \pm S\bar{x}$
Souches et groupes	*Nourriture ingérée (g)* $\bar{X} \pm S\bar{x}$	*Nourriture digérée (g)* $\bar{X} \pm S\bar{x}$	*Digestibilité approximative (%)* $\bar{X} \pm S\bar{x}$	*Indices de consommation (mg)* $\bar{X} \pm S\bar{x}$	*Ingestibilité (%)* $\bar{X} \pm S\bar{x}$
T 15 /4 :					
1 M	2.58 ± 0.04	1.16 ± 0.002	44.83 ± 0.60	0.656 ± 0.009	61.45 ± 1.32
2 M	2.35 ± 0.014*	0.77 ± 0.005*	32.56 ± 0.04*	0.611 ± 0.003**	71.53 ± 1.05
3 M	2.74 ± 0.022	1.16 ± 0.004	2.37 ± 0.34	0.643 ± 0.005	47.77 ± 0.87*
1 F	2.63 ± 0.004	1.18 ± 0.002	44.93 ± 0.06	0.638 ± 0.001	62.64 ± 0.80
2 F	2.30 ± 0.007***	0.85 ± 0.003***	36.86 ± 0.03	0.586 ± 0.004***	70.00 ± 1.20
3 F	2.78 ± 0.005	1.17 ± 0.006	41.96 ± 0.19	0.595 ± 0.002***	48.47 ± 0.93
B 2/6 :					
1 M	3.18 ± 0.21	1.20 ± 0.021	37.73 ± 0.74	0.722 ± 0.06	75.53 ± 1.73
2 M	2.74 ± 0.02**	0.91 ± 0.006	33.06 ± 0.26	0.651 ± 0.02	83.31 ± 0.74
3 M	3.23 ± 1.20	1.36 ± 0.006	41.93 ± 1.65	0.620 ± 0.03	57.38 ± 0.93
1 F	3.12 ± 0.11	1.29 ± 0.004	41.37 ± 1.36	0.700 ± 0.02	74.23 ± 0.65
2 F	2.69 ± 0.06	0.86 ± 0.003***	31.78 ± 0.59***	0.627 ± 0.015*	81.69 ± 1.56**
3 F	3.52 ± 0.03	1.57 ± 0.004***	44.52 ± 0.39*	0.661 ± 0.006	62.52 ± 1.44*

M : Male / *Mâle* ; F : Female / *Femelle*.
* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

The larvae fed under excess feeding amount ingested the highest quantity of food. They were followed by the larvae fed under moderate and reduced feeding amounts. Some differences (but not significant) between sexes existed in this index - at moderate and excess feeding amounts the female larvae in T 15/4 strain ingested more food (2.63 and 2.78 g) than the male ones (2.58 and 2.74 g). At the reduced feeding amount the male worms ingested a higher quantity of food than the female ones.

At the excess feeding amount the female larvae in B 2/6 strain ingested more food (3.52 g) than the male larvae (3.23 g), but in the other two feeding amounts the differences between sexes were not significant. There was a significant ($P < 0.001$) decrease in the digested food at reduced feeding amount, but the differences between the moderate and excess feeding amounts (except for the females in B 2/6 strain) were doubtful.

The sex differences in the food digested were not significant in the T 15/4 strain, while in the B 2/6 strain the females digested a higher quantity of food at excess feeding amount. The data obtained about the approximate digestibility shown in the same table (Table II) indicated that it was lower in the group of reduced feeding amount, while the differences between the larvae fed on moderate and excess feeding amounts were lower.

At the reduced feeding amount the female larvae in T 15/4 strain manifested a higher digestibility (36.86 %) than the male ones (32.56 %).

Table II. Growth rate and efficiencies of conversion of ingested food (ECI) into body substances, cocoon shell and eggs.

Tableau II. Vitesse de croissance, efficacités de conversion de la nourriture ingérée (ECI) en matières corporelles, coque et oeufs.

Strain group	Growth rate (mg) $\bar{X} \pm Sx$	ECI to body substances (%) $\bar{X} \pm Sx$	ECI to cocoon shell (%) $\bar{X} \pm Sx$	ECI to eggs (%) $\bar{X} \pm Sx$
Souches et groupes	*Vitesse de croissance (mg) $\bar{X} \pm Sx$*	*ECI en matières corporelles (%) $\bar{X} \pm Sx$*	*ECI en coque (%) $\bar{X} \pm Sx$*	*ECI en oeufs (%) $\bar{X} \pm Sx$*
T 15 /4 :				
1 M	0.187 ± 0.003	28.48 ± 0.41	14.14 ± 0.02	
2 M	0.188 ± 0.003	30.75 ± 0.12**	14.42 ± 0.08	
3 M	0.195 ± 0.009	30.47 ± 0.25*	14.84 ± 0.12	
1 F	0.190 ± 0.012	29.78	12.89	5.31 ± 0.008
2 F	0.192 ± 0.004	33.05 ± 0.09***	11.83 ± 0.04*	4.36 ± 0.01***
3 F	0.192 ± 0.01	32.21 ± 0.05***	13.91 ± 0.03*	4.85 ± 0.18
B 2/6 :				
1 M	0.183 ± 0.005	25.27 ± 0.08	11.54 ± 0.03	
2 M	0.179 ± 0.004	27.44 ± 0.26	12.85 ± 0.12	
3 M	0.195 ± 0.005	31.50 ± 1.10**	13.37 ± 0.47	
1 F	0.186 ± 0.005	26.56 ± 0.95	13.44 ± 0.49	6.12 ± 0.22
2 F	0.183 ± 0.004	29.19 ± 0.69	13.11 ± 0.28	4.88 ± 0.11***
3 F	0.191 ± 0.004	28.92 ± 0.24	13.60 ± 0.11	5.75 ± 0.005***

M : Male / *Mâle* ; F : Female / *Femelle*.
* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

In the B 2/6 strain the relationship was the opposite, namely the male worms showed higher digestibility at the reduced feeding amount (33.06 %) than the female worms (31.78 %), while at the moderate and excess feeding amounts the digestibility was higher in the females. The consumption index was the highest at the moderate feeding amount. In both strains the consumption index was higher in the male larvae. In relation to the growth rate index no significant differences were observed between batches under different feeding amounts and between sexes.

As shown in Table II, the efficiency of conversion of ingested food into body matter (ECI) was the lowest in the moderate feeding group and it was nearly equal in the reduced and excess feeding groups.

No clear relationship was detected between the efficiency of conversion of ingested food into cocoon shell and the feeding amount. As for the differences between sexes, the males in the T 15/4 strain exceeded definitely the females in respect to this index, while the ECI values to cocoon shell were higher in the female worms in the B 2/6 strain.

The efficiency of conversion of ingested food to eggs manifested a clear dependence on the feeding amount - the values were significantly higher ($p < 0.001$) at the reduced and excess feeding amounts than at the moderate feeding amount.

Table III. Efficiencies of conversion of digested food (ECD) into body matter, cocoon shell and eggs and reference ratio.

Tableau III. Efficacités de conversion de la nourriture digérée (ECD) en matières corporelles, coque et oeufs et rapport de référence.

Strain group	ECD to body matter (%) $\bar{X} \pm Sx$	ECD to cocoon shell (%) $\bar{X} \pm Sx$	ECD to eggs (%) $\bar{X} \pm Sx$	Reference ratio $\bar{X} \pm Sx$
Souches et groupes	*ECD en matières corporelles (%)* $\bar{X} \pm Sx$	*ECD en coque (%)* $\bar{X} \pm Sx$	*ECD en oeufs (%)* $\bar{X} \pm Sx$	*Rapport de référence* $\bar{X} \pm Sx$
T 15 /4 :				
1 M	63.52 ± 0.18	32.15 ± 0.05		1.81 ± 0.02
2 M	94.51 ± 0.60***	44.32 ± 0.28***		1.48 ± 0.01**
3 M	71.91 ± 0.25***	35.02 ± 0.12*		1.74 ± 0.001
1 F	66.27 ± 0.13	28.69 ± 0.06	11.81 ± 0.02	1.82 ± 0.005
2 F	89.68 ± 0.35***	32.11 ± 0.12**	11.83 ± 0.05	1.58 ± 0.003***
3 F	76.82 ± 0.23***	33.16 ± 0.06***	11.58 ± 0.03	1.72 ± 0.01**
B 2/6 :				
1 M	66.97 ± 1.14	30.58 ± 0.51		1.61 ± 0.02
2 M	83.01 ± 0.55*	38.89 ± 0.26***		1.49 ± 0.01***
3 M	75.11 ± 0.27	31.88 ± 0.12		1.72 ± 0.05***
1 F	64.21 ± 0.11	32.48 ± 0.09	14.79 ± 0.04	1.71 ± 0.04
2 F	91.91 ± 0.27***	41.28 ± 0.12***	15.38 ± 0.05	1.47 ± 0.02***
3 F	64.96 ± 0.17	30.55 ± 0.08	12.92 ± 0.03**	1.80 ± 0.01*

M : Male / *Mâle* ; F : Female / *Femelle*.
* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

The efficiency of conversion of digested food into body matter (ECD) shown in Table III was the highest in the batches fed at reduced feeding amount, followed by the worms fed on excess and moderate feeding amounts, the differences were highly significant ($p < 0.001$). The females in the T 15/4 strain exceeded the males in respect to this index at the moderate and excess feeding amounts by 2.75 % and 2.91 %, respectively, while the ECD values were significantly higher in the males (94.15 %) than in the females (89.68 %) in the reduced feeding group.

In the B 2/6 strain, the sex differences were in favour of the male worms at the moderate and excess feeding amounts and the differences were in favour of the females at the reduced feeding amount. The reference ratio index, which depends on the digestibility, was higher in the worms at the moderate feeding amount, followed by the worms at excess and reduced feeding amounts.

The differences in respect to this index were inessential. The values of dry matter ingested and digested for 1 g body matter and 1 g cocoon shell (RIF, RDF) are shown in Table IV.

Table IV. Dry matter ingested (RIF) and digested (RDF) for g of body dry weight gain and g of dry cocoon shell.

Tableau IV. Matière sèche ingérée (RIF) et digérée (RDF) en g de gain de poids sec du corps et g de coque sèche.

Strain group	RIF to g of body dry weight gain (g) $\bar{X} \pm Sx$	RIF to g of dry cocoon shell (g) $\bar{X} \pm Sx$	RDF to g of body dry weight gain (g) $\bar{X} \pm Sx$	RDF to g of dry cocoon shell (g) $\bar{X} \pm Sx$
Souches et groupes	*RIF en g de gain de poids sec du corps (g)* $\bar{X} \pm Sx$	*RIF en g de coque sèche (g)* $\bar{X} \pm Sx$	*RDF en g de gain de poids sec du corps (g)* $\bar{X} \pm Sx$	*RDF en g de coque sèche (g)* $\bar{X} \pm Sx$
T 15 /4 :				
1 M	3.51 ± 0.05	6.93 ± 0.10	1.57 ± 0.01	3.11 ± 0.005
2 M	3.25 ± 0.02***	6.93 ± 0.03	1.05 ± 0.007	2.25 ± 0.01***
3 M	3.28 ± 0.03***	6.73 ± 0.06*	1.39 ± 0.005	2.85 ± 0.01**
1 F	3.35 ± 0.005	7.75 ± 0.01	1.50 ± 0.003	3.48 ± 0.007
2 F	3.02 ± 0.009***	8.44 ± 0.03	1.11 ± 0.004	3.11 ± 0.01***
3 F	3.10 ± 0.006**	7.18 ± 0.01	1.30 ± 0.006	3.01 ± 0.01***
B 2/6 :				
1 M	3.95 ± 0.01	8.66 ± 0.03	1.49 ± 0.02	3.27 ± 0.06
2 M	3.64 ± 0.04***	7.77 ± 0.08**	1.20 ± 0.008**	2.57 ± 0.02***
3 M	3.17 ± 0.11***	7.47 ± 0.26**	1.33 ± 0.006*	3.13 ± 0.01
1 F	3.76 ± 0.13	7.44 ± 0.26	1.55 ± 0.005	3.07 ± 0.009
2 F	3.42 ± 0.08**	7.62 ± 0.17	1.08 ± 0.004***	2.42 ± 0.009
3 F	3.45 ± 0.03*	7.35 ± 0.06	1.53 ± 0.004	3.27 ± 0.004

M : Male / *Mâle* ; F : Female / *Femelle*.
* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

It was revealed that the RIF for 1 g body matter values were lower in the reduced and excess feeding groups than in the moderate one and the differences were significant. The males consumed more food for body matter than the females at all feeding amounts.

The food expenditure for production of 1 g cocoon shell followed a similar pattern of dependence upon the feeding amount such as that observed in body matter.

The female individuals in the T 15/4 strain had significantly higher values of RDF than the males, which was strongly expressed in the reduced feeding group.

DISCUSSION

The results obtained demonstrated that except for the worms fed on the reduced feeding amount, the female silkworms ingested and digested a higher quantity of food than the male ones in both strains, which is in agreement with the results reported by Horie *et al.* (1976) and Horie and Watanabe (1983). Simultaneously, our results are in agreement with those of Sumioka *et al.* (1982a, 1982b) and Hideshi *et al.* (1982) who observed that the feeding of the larvae during the 5th instar at the reduced feeding amount decreases significantly the quantities of ingested and digested food.

There is a positive relationship between the food ingested and digested as was detected by other scientific researchers (Yamamoto and Gamo, 1976). According to several authors (Horie and Watanabe, 1983 ; Periasami *et al.*, 1984), the food ingested and digested are, to a great extent, a strain-specific character.

According to Periasami and Radhakrishnan (1985) the bivoltine races ingest a higher quantity of food than the multivoltine ones.

Several scientific workers (Prakash *et al.*, 1987 ; Ramadevi *et al.*, 1992) reported that the quantities of food ingested and digested by silkworm, *Bombyx mori* L., larvae during the 5th instar were between 1.48 and 3.08 g and 0.55 and 1.34 g dry matter. The quantities of ingested and digested food in our experiments are 2.30-2.78 g and 0.76-1.18 g in T 15/4 strain and 2.69-3.52 g and 0.85-1.57 g in B 2/6 strain. According to Horie and Watanabe (1983), the quantities of food ingested and digested in the races and hybrids isolated lately in Japan are significantly higher than in the old races of *Bombyx mori* L. In some experiments with the hybrid Nr 134 × C 135, the values of ingested and digested food were 5.23-6.05 g and 2.18-2.56 g, respectively, which is significantly higher in comparison not only with the results of other authors, but with the results obtained in our experiments as well. These results could lead to the revision of the adopted feeding standards in the silkworm, *Bombyx mori* L., in respect to the race. The approximate digestibility is the lowest at the reduced feeding amount, which could be explained by the higher ingestibility, lower selectivity in relation to the mulberry leaves and the ingestion of harder digestible parts due to the lower quantity of given food. The results are in agreement with those reported by Petkov (1978) and contradict the results reported by Biren *et al.* (1987) and Sumioka *et al.* (1982).

Our results clearly show a positive relationship between the food ingested, the food digested and the approximate digestibility while, according to Yamamoto and Gamo (1976), the relation between the quantity of food ingested and food digested is negligible. Biren *et al.* (1987) detected a negative correlation between these two indices.

The values obtained by us for the approximate digestibility are in agreement with those reported by other authors (Horie *et al.*, 1976 ; Horie and Watanabe, 1983 ; Periasami *et al.*, 1992) and they are higher than the values reported by Petkov (1978).

According to Horie and Watanabe (1983) the sex differences in respect to the approximate digestibility are negligible and according to Joshi (1984) the digestibility is higher in the female larvae. Our results suggest that the sex differences depend, to a great extent, on the feeding amount.

The efficiency of conversion of the ingested and digested food into body substances depends on the food digestibility, its nutrition and the ingestion rate (Waldbauer, 1964 ; Bailey, 1976), the race (Ramadev *et al.*, 1992) and the sex (Horie and Watanabe, 1983 ; Joshi, 1984).

Our investigations detect that the ECI and ECD values to body matter depend, to a great extent, on the feeding amount and they are the highest at the reduced feeding amount followed by the excess feeding amount. Similar results were reported by Sumioka *et al.* (1982) and Nath *et al.* (1990) and could be explained by some physiological adaptation to nutritional stress conditions. The ECI/ECD

values obtained by us are higher than the values reported by Horie and Watanabe (1983), Perisiami *et al.* (1982) and Perisiami and Radhkrishnan (1985) and Ramadevi *et al.* (1992) in *Bombyx mori* L., which could be explained by the use of different silkworm races and mulberry varieties as well as some differences in the methods used. Our ECI/ECD values are higher than the values obtained by Waldbauer (1964) in *Manduca sexta*, Shroeder (1971) in *Hyalophora cecropia* and *Platisimia cecropia*, Scriber and Feeny (1979) in *Antheraea*, *Actias*, *Samia*, *Callosamia* and *Hyalophora*, Biren *et al.* (1987) in *Antheraea proylei*, they are near to those reported by Joshi (1984) in *Philosamia ricini*. The ECI/ECD to cocoon shell and egg values obtained in our investigation are higher than those reported by other authors, which could be explained by the different moments when the samples have been taken.

The analyses show that the most important indices, characterizing the ingestion, digestion and utilization of food depend on the feeding amount. In the silkworm, *Bombyx mori* L., in both the breeds studied, the food utilization is the best at reduced feeding amount, followed by excess and moderate feeding amounts.

The female larvae of T 15/4 strain better utilize the food than the male ones in respect to body matter at moderate and excess feeding amounts. The male silkworms of T 15/4 strain better utilize the food in respect to body substances at the reduced feeding amount and they utilize better the food in respect to cocoon shell in all feeding amounts.

The male silkworms of B 2/6 strain utilize the food better than the females at the excess feeding amount and the females of the same breed utilize the food better at reduced and moderate feeding amounts.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author is thankful to Prof. Naum Petkov, Director of the Sericultural Experiment Station (Vratza, Bulgaria), for the encouragement to undertake the present experiments.

REFERENCES

BAILEY C.C. (1976) A quantitative study of consumption and utilization of various diets in the bertha armyworm, *Mamestra configurata* (Lep. : Noct.). Can. Ent., 108, 1319-1326.

BIREN R., PRASAD B., NIGAM M.P. (1987) Consumption and utilization of food by oak-tasar silkworm, *Antheraea proylei* Jolly (Lepidoptera : Saturniidae). Sericologia, 27(1), 11-19.

HIDESHI S., SHIGERU K., NARUMI T. (1982) Feed efficiency and expression of several characters of the silkworm, *Bombyx mori*, under the restricted feeding. J. Sericult. Sci. Japan, 51(5), 415-419.

HORIE Y., INOKUCHI T., WATANABE K., NAKASONE S., YANAGAWA H. (1976) Quantitative study on food utilization by the silkworm, *Bombyx mori*, through its life cycle. I. Economy of dry matter, energy and carbon. Bull. Sericult. Exp. Sta. (Tokyo), 26(6), 411-442.

HORIE Y., WATANABE K. (1983) Daily utilization and consumption of dry matter in food by the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae). Appl. Ent. Zool., 18(1), 70-80.

JOSHI K.L. (1984) Sex-specific consumption and utilization of food by eri silkworm, *Philosamia ricini* Hutt (Lep. : Saturniidae). Sericologia, 24(1), 21-27.

KAFIAN A. (1982) Ocenka produktivnosti samcov i samok tutovogo shelkopriada v zavisimosti ot norm kormlenia. Nauch. trudi Gruz. sel. hoz. in-ta, 1-5(3), 34-43.

KAFIAN A. (1983) Ispolzovanie paznokachestvennogo korma samcmi i samkami tutovogo shelkopriada. Shelk, 1.

KOGA M., PARRA J.R.P. (1981) Techniques and applications of measurements of consumption of food by phyphagous insects. *In* Current Topics : "Insect Endocrinology and Nutrition". Ed. G. Bhaskaran, S. Friendman and J.G. Rodriguez, Plenum Press, New York, 337-352.

LIDANSKI T. (1988) Statisticheski metodi v biologiata i selskoto stopanstvo. Sofia.

NATH T., NATH S., SHAMSUDDIN M., RAO G. (1990) Effect of food deprivation on dry matter utilization, shell and cocoon weight and fecundity of multivoltine silkworm, *Bombyx mori*, race Nistari. Indian J. Seric., 29(2), 174-181.

PERIASAMI K., NARAYANAPRAKASH R., RADHAKRISHNAN S. (1984) Food utilization in exotic and indigenous races of *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae). Sericologia, 24(1), 43-50.
PERIASAMI K., RADHAKRISHNAN R. (1985) Quantitative study of food utilization and silk production in *Bombyx mori* L. for evaluation of superior varieties. Sericologia, 25(4), 491-500.
PETKOV M. (1978) Investigations on the utilization of mulberry leaves from some varieties at different silkworm feeding norms and seasons. I. Degree of eating and assimilation of the mulberry leaf. Animal Science, 25(7), 111-118.
PETKOV N., MLADENOV G., NACHEVA J. (1981) Problemi na genetichnite i seleckcionni izsledvania pri koprinenata buba. Sofia.
PETKOV N., PETKOV M., MANCHEV M., NACHEVA J., ALEKSANDROV A. (1989) Manual on Sericulture. Sofia.
PETRUSEWICA K., MACK FADIEN A. (1970) Productivity of terrestrial animals. IBP Handbook, para. 13, Oxford and Edinburg Blackwell Scientific Publications, 190 p.
PRAKASH R. N., DELVI M.R. (1987) Food utilization in different races of silkworm, *Bombyx mori L. Sericologia, 27(3), 391-397.*
RAMADEVI O.K., MAGADUM S., SHIVASHANKAR N., BENCHAMIN K.V. (1992) Evaluation of food utilisation efficiency in some polyvoltine breeds of silkworm, *Bombyx mori* L. Sericologia, 32(1), 61-66.
SCHROEDER L.A. (1971) Energy budget of larvae of *Hyalophora cecropia* (Lep.) fed on *Acer negundo*. Oikos, 22, 256-259.
SCHROEDER L.A. (1972) Energy budget of larvae of cecropia moth, *Plastisamia cecropia* (Lep. : Sat.) fed on on lilac leaves. Ann. Ent. Soc. Am., 65(2), 267-272.
SCRIBER J.M., FEENY P. (1979) Growth of herbivorous caterpillars in relation to feeding specialization to the growth form of their food plants. Ecology, 60, 829-850.
SLANSKY F.J., SCRIBER J.M. (1982) Selected bibliography and summary of quantitative food utilization by immature insects. Entomol. Soc. America Bull., 43-55.
SUMIOKA H., KURODA S., YOSHITAKE N. (1982a) Relationships among food ingestion, food digestion and body weight gain in the silkworm, *Bombyx mori*, larvae under the restricted feeding by indexes. J. Sericult. Sci. Japan, 51(1), 51-56.
SUMIOKA H., KURODA S., YOSHITAKE N. (1982b) Feed efficiency and expression of several characters of the silkworm, *Bombyx mori*, under the restricted feeding. J. Sericult. Sci. Japan, 51(5), 415-419.
TZENOV P., PETKOV N. (1993) Study on the productivity of differential feeding amount in sex-limited strains of the silkworm, *Bombyx mori* L., for egg and larval traits. Sericologia, 33(2), 235-241.
WALDBAUER G.P. (1964) The consumption, digestion and utilization of solanaceous and non-solanaceous plants by tobacco hornworm, *Protoparce sexta* (Johan), (Lep. : Sphin.). Ent. Ext. Appl., 7, 253-269.
WALDBAUER G.P. (1968) Consumption and utilization of food by insects. *In* Advances in Insect Physiology. Eds. J.W.L. Beament, J.W. Treherne, V.B. Wigglesworth, Academic Press, New York.
YAMAMOTO T., GAMO T. (1976) Studies on the breeding in relation to the improvement of food utilization in the silkworm, *Bombyx mori* L. I. Mutual relations among the amount of food ingested, the amount of food digested, digestibility and several quantitative characters in the silkworm reared on artificial diet. J. Sericult. Sci. Japan, 45(1), 81-86.

ETUDES SUR L'UTILISATION DE LA NOURRITURE CHEZ DES SOUCHES DE VER A SOIE *BOMBYX MORI* L. A MARQUAGE SEXUEL DE L'OEUF ET DE LA LARVE EN FONCTION DES TAUX DE NOURRISSAGE MODERE, REDUIT ET EXCEDENTAIRE

P. TZENOV

Sericultural Experiment Station, 24 Mito Orozov Street, Vratza 3000, Bulgarie.

De 1990 à 1992, une étude sur l'utilisation de la nourriture chez des souches à marquage sexuel de l'oeuf et de la larve, à savoir T 15/4 et B 2/6, soumises à trois différents régimes de nourrissage a été effectuée à la Station d'expérimentation séricicole de Vratza, Bulgarie.

Il est apparu que les indices les plus importants qui caractérisent l'ingestion, la digestion et l'utilisation de la nourriture sont en étroite corrélation avec le taux de nourrissage.

Les larves femelles de la souche T 15/4 convertissent mieux la nourriture en matière corporelle lorsqu'elles sont soumises aux taux de nourrissage modéré et excédentaire.

Les larves mâles de la même souche utilisent mieux la nourriture que les femelles pour ce qui concerne la matière corporelle lorsqu'elles sont soumises au taux de nourrissage réduit et pour ce qui concerne la coque soyeuse à tous les taux de nourrissage.

Les larves femelles de la souche B 2/6 utilisent mieux la nourriture lorsqu'elles sont soumises aux taux de nourrissage réduit et modéré et les mâles utilisent mieux la nourriture au taux de nourrissage excédentaire.

INTRODUCTION

Selon plusieurs chercheurs (Petkov et coll., 1981 ; Strunnikov, 1987), l'utilisation de certaines souches à marquage sexuel de l'oeuf et de la larve facilite grandement le grainage et permet de mener des élevages séparés des deux sexes. L'utilisation de la nourriture par le mâle et la femelle chez le ver à soie *Bombyx mori* L. a été étudiée de manière approfondie chez les souches ordinaires (Horie et coll., 1976 ; Slansky et Scriber, 1982 ; Horie et Watanabe, 1983 ; Periasami et Radhakrishnan, 1985).

Strunnikov (1987) a observé que, du fait de la translocation d'une partie de l'autosome X où est situé le facteur dominant W2, qui contrôle la couleur des oeufs, dans le chromosome de la femelle, la productivité de la femelle chez les souches à marquage sexuel de la couleur de l'oeuf est inférieure à celle des femelles des souches ordinaires et très nettement inférieure à celle des mâles des souches à marquage sexuel.

Les données obtenues avec ces souches ne peuvent donc pas être appliquées directement aux souches normales.

D'après Kafian (1982) et Sumioka et coll. (1982), l'évaluation des souches doit être basée sur l'efficacité de l'utilisation de la nourriture en fonction des quantités de nourrissage optimales pour chaque sexe.

Cette étude a été entreprise afin de déterminer les caractéristiques de l'ingestion, de la digestion et de l'utilisation de la nourriture chez les larves mâles et femelles des souches à marquage sexuel de

l'oeuf et de la larve T 15/4 et B 2/6 du ver à soie *Bombyx mori* L. en fonction de différents taux de nourrissage.

MATERIELS ET METHODES

L'étude a été réalisée aux élevages de printemps de 1990 à 1992 sur la souche à marquage sexuel de la couleur de l'oeuf T 15/4 et la souche à marquage sexuel de la larve B 2/6.

L'ingestion, la digestion et l'utilisation de la matière sèche ont été déterminées selon la méthode gravimétrique décrite par plusieurs auteurs (Waldbauer, 1968 ; Horie et coll., 1976 ; Kogan et Parra, 1981 ; Horie et Watanabe, 1983). Les expériences ont été réalisées sur des larves des 4e et 5e âges soumises à trois différents taux de nourrissage comme indiqué dans notre précédent article (Tzenov et Petkov, 1993). Trois groupes correspondant au taux de nourissage modéré (group 1, témoin), au taux de nourrissage réduit (groupe 2) et au taux de nourrissage excédentaire (groupe 3) ont été mis en place. Après la troisième mue, les larves ont été réparties en trois lots expérimentaux pour chaque souche et chaque sexe et comprenant 4 réplicats de 100 larves.

Après la 4e mue, 50 larves ont été maintenues dans chaque réplicat et élevées jusqu'à la fin du stade larvaire.

Pour compenser la mortalité, 2 lots de réserve comprenant 50 larves ont été élevés parallèlement à chaque groupe expérimental.

Afin de déterminer le poids initial des larves, 20 larves de chaque lot ont été prélevées au hasard avant le début du nourrissage et séchées entre 80 et 50 °C jusqu'à obtention d'un poids constant. Les larves ont été élevées dans des boîtes en papier de 32 cm × 22 cm × 7 cm (704 cm^2) contenant 50 larves du 5e âge selon les méthodes standard (Petkov et coll., 1989).

Les larves ont été nourries 4 fois par jour avec des feuilles prélevées au même âge sur les parties inférieure et médiane de la tige de la variété de mûrier Nr 106 cultivée à la Station d'expérimentation séricicole de Vratza.

Deux échantillons de feuilles de mûrier d'un volume identique à celui des feuilles données comme aliment ont été collectés quotidiennement et séchés jusqu'à obtention d'un poids constant. Le poids final des larves a été relevé sur 20 larves de chacun des groupes après le dernier nourrissage. A la fin du nourrissage, les restes de nourriture et les excréments ont été prélevés, séparés et séchés entre 80 et 90 °C jusqu'à obtention d'un poids constant.

Afin de déterminer le poids sec de la coque, des échantillons de chrysalides, de papillons et d'oeufs ont été prélevés au hasard dans chaque groupe. Les échantillons de chrysalides et les coques ont été prélevés 9 jours après le début de l'excrétion de la soie, les échantillons de papillons ont été prélevés après la fin de l'oviposition et les échantillons d'oeufs 16 jours après la ponte.

Les indices caractérisant l'ingestion, la digestion et l'utilisation de la nourriture ont été calculés d'après les formules suivantes :

$$CI = \frac{F}{T \times A}$$

où :
CI : indice de consommation,
F : poids sec de nourriture ingérée par une larve au 5e âge,
T : durée de la période de nourrissage (jours),
A : Poids sec moyen d'une seule larve au cours de la période de nourrissage (g).

$$GR = \frac{G}{G \times A}$$

où :
GR : taux de croissance,
G : gain de poids pendant la période de nourrissage.

$$AI : \frac{F}{LS} \times 100$$

où :
AI : ingestibilité approximative,
LS : quantité de feuilles fournies (poids sec).

$$AD = \frac{F - F_1}{F} \times 100$$

où :
AD : digestibilité approximative,
F_1 : poids sec des excréments.

$$ECI = \frac{P}{F} \times 100$$

où :
ECI : efficacité de conversion de la nourriture ingérée en matières corporelles (%),
P : poids sec des produits obtenus (gain de poids des larves au cours de la période de nourrissage, coque, chrysalides, papillons et oeufs).

$$ECD = \frac{P}{F - F_1} \times 100$$

où :
ECD : efficacité de conversion de la nourriture digérée en substances corporelles (%).

$$RIF = \frac{F}{P}$$

où :
RIF : matière sèche ingérée par gramme de gain de poids sec du corps ou gramme de coque sèche.

$$RDF = \frac{F - F_1}{P}$$

où :
RDF : matière sèche digérée par gramme de gain de poids sec du corps ou gramme de coque sèche.

$$R = \frac{F}{F_1}$$

où :
R : rapport de référence

Le plan d'économie de l'utilisation de la nourriture a été calculé selon la formule de Petrusewica et Mack Fadyen (1970) définie de la façon suivante : $F = P + R + F_1 + U$, où R est l'énergie perdue sous forme de chaleur en raison du métabolisme et U représente les produits excrétoires azotés, ces derniers n'ont pas été estimés étant donné leur quantité négligeable (Waldbauer, 1968).

Les données obtenues ont été analysées statistiquement (Lidanski, 1988).

RESULTATS

Les données obtenues sont présentées dans les tableaux I à IV.

Le tableau I révèle que la quantité de nourriturée ingérée et le taux d'ingestion par larve au cours du 5e âge dépendent tous deux du taux de nourrissage et du sexe.

Les larves soumises à un taux de nourrissage excédentaire ingèrent la quantité maximale de nourriture, devant les larves soumises aux taux de nourrissage modéré et réduit. Cet indice fait apparaître quelques différences qui ne sont pas significatives entre les sexes : aux taux de nourrissage modéré et excédentaire, les femelles de la souche T 15/4 ingèrent davantage de nourriture (2,63 g et 2,78 g) que les mâles (2,58 g et 2,74 g). Au taux de nourrissage réduit, les mâles ingèrent davantage de nourriture que les femelles.

Au taux de nourrissage excédentaire, les larves femelles de la souche B 2/6 ingèrent davantage de nourriture (3,52 g) que les larves mâles (3,23 g) mais les différences ne sont pas significatives pour les deux autres taux de nourrissage. On observe une diminution significative ($p < 0,001$) de la nourriture ingérée au taux de nourrissage réduit, mais les différences entre les taux de nourrissage modéré et excédentaire sont peu sensibles (sauf pour les femelles de la souche B 2/6).

Les différences entre les sexes pour la nourriture ingérée ne sont pas significatives chez la souche T 15/4 ; tandis que, chez la souche B 2/6, les femelles digèrent davantage de nourriture au taux de nourrissage excédentaire. Les données obtenues pour la digestibilité approximative présentées dans le même tableau II indiquent que celle-ci est plus faible chez le groupe soumis au taux de nourrissage réduit, tandis que les différences entre les larves soumises aux taux de nourrissage modéré et réduit sont moins sensibles.

Au taux de nourrissage réduit, les femelles de la souche T 15/4 présentent une digestibilité plus élevée (36,86 %) que les mâles (32,56 %).

La souche B 2/6 présente une relation inverse : les mâles présentent une digestibilité plus élevée au taux de nourrissage réduit (33,06 %) que les femelles (31,78 %) tandis qu'aux taux de nourrissage modéré et excédentaire, la digestibilité est plus forte chez les femelles. L'indice de consommation est maximal au taux de nourrissage modéré. Chez les deux souches, l'indice de consommation est supérieur chez les mâles. L'indice du taux de croissance ne fait apparaître aucune différence significative entre les taux de nourrissage et entre les sexes.

Comme le montre le tableau II, l'efficacité de conversion de la nourriture ingérée en matière corporelle (ECI) est minimale chez le lot soumis au nourrissage modéré et pratiquement identique chez les groupes soumis aux taux de nourrissage réduit et excédentaire.

Les valeurs de l'ECI sont supérieures chez les larves femelles et les différences sont plus fortes chez le groupe traité au taux de nourrissage réduit.

Aucune relation bien définie n'a été détectée entre l'efficacité de conversion de la nourriture ingérée en coque soyeuse et le taux de nourrissage. Pour ce qui concerne les différences entre les sexes, les mâles de la souche T 15/4 donnent des indices nettement supérieurs à ceux obtenus pour les femelles, tandis que les valeurs de l'efficacité de conversion de la nourriture ingérée en coque sont supérieures chez les femelles de la souche B 2/6.

L'efficacité de conversion de la nourriture ingérée en oeufs est en nette corrélation avec la quantité de nourriture : les valeurs sont significativement plus fortes ($p < 0,001$) aux taux de nourrissage réduit et excédentaire qu'au taux de nourrissage modéré.

L'efficacité de conversion de la nourriture digérée en matière corporelle (ECD) présentée dans le tableau III est maximale chez les lots soumis au taux de nourrissage réduit, devant les taux de nourrissage excédentaire et modéré ; les différences sont fortement significative ($p < 0,001$). Les femelles de la souche T 15/4 donnent des valeurs supérieures à celles obtenues pour les mâles pour cet indice lorsqu'elles sont soumises aux taux de nourrissage modéré (+ 2,75 %) et excédentaire (+ 2,91 %), tandis que les valeurs de l'ECD sont nettement plus fortes chez les mâles (94,15 %) que chez les femelles (89,68 %) des groupes soumis au taux de nourrissage réduit.

Chez la souche B 2/6 les mâles donnent de meilleurs résultats aux taux de nourrissage modéré et excédentaire et les femelles donnent de meilleurs résultats au taux de nourrissage réduit. L'indice du rapport de référence, qui est fonction de la digestibilité, est supérieur chez les larves soumises aux taux de nourrissage excédentaire et réduit.

Les différences pour cet indice sont peu sensibles. Les valeurs de la matière sèche ingérée et digérée par gramme de corps (RIF) et par gramme de coque (RDF) sont données dans le tableau IV.

Il apparaît que les valeurs RIF pour un gramme de corps sont inférieures chez les groupes soumis aux taux de nourrissage réduit et excédentaire. Les mâles utilisent plus de nourriture que les femelles quel que soit le taux de nourrissage.

La dépense de nourriture pour la production d'un gramme de coque présente la même relation avec le taux de nourrissage que le poids du corps.

Les individus femelles de la souche T 15/4 donnent des valeurs de RDF significativement supérieures à celles obtenues pour les mâles, cette tendance est très nette chez le groupe soumis au taux de nourrissage réduit.

DISCUSSION

Les résultats obtenus montrent que, à l'exception des larves soumises au taux de nourrissage réduit, les femelles ingèrent et digèrent davantage de nourriture que les mâles chez les deux souches, ce qui confirme les résultats d'Horie et coll. (1976) et Horie et Watanabe (1983). Nos résultats confirment également ceux de Sumioka et coll. (1982a, 1982b) et Hideshi et coll. (1982) qui ont démontré qu'un taux de nourrissage réduit des larves du 5e âge entraînait une diminution significative des quantités de nourriture ingérée et digérée.

On observe une corrélation positive entre la nourriture ingérée et digérée, comme l'ont détecté d'autres chercheurs (Yamamoto et Gamo, 1976). D'après plusieurs auteurs (Horie et Watanabe, 1983 ; Periasami et coll., 1984), les taux de nourriture ingérée et digérée sont des caractères liés principalement à la nature de la souche.

D'après Periasami et Radhakrishnan (1985), les races bivoltines ingèrent davantage de nourriture que les races polyvoltines.

Plusieurs chercheurs (Prakash et coll., 1987 ; Ramadevi et coll., 1992) ont observé que les quantités de nourriture ingérée et digérée au cours du 5e âge par les larves de vers à soie varient respectivement de 1,48 à 3,08 g et de 0,55 0 1,34 g de matière sèche. Les quantités de nourriture ingérée et digérée obtenues dans notre expérience varient respectivement de 2,30 à 2,78 g et de 0,76 à 1,18 g pour la souche T 15/4 et de 2,69 à 3,52 et de 0,85 à 1,57 g pour la souche B 2/6. D'après Horie et Watanabe (1983), les quantités de nourriture ingérée et digérée chez les races et hybrides isolés récemment au Japon sont nettement plus élevées que chez les races traditionnelles de *Bombyx mori* L. Certaines expériences réalisées sur l'hybride Nr 134 × C 135 ont donné des valeurs situées entre 5,23 et 6,05 g pour la nourriture ingérée et entre 2,18 et 2,56 g pour la nourriture digérée, valeurs significativement supérieures non seulement à celles obtenues par d'autres chercheurs mais également à celles obtenues dans cette étude. Ces résultats pourraient entraîner la révision des normes de nourrissage du ver à soie *Bombyx mori* L. en fonction de la race. La digestibilité approximative est minimale au taux de nourrissage réduit, ce qui pourrait s'expliquer par l'augmentation de l'ingestibilité, la diminution de la sélectivité par rapport aux feuilles de mûrier et l'ingestion des parties les plus dures due à la diminution de la quantité de nourriture donnée. Ces résultats sont conformes à ceux de Petkov (1978) mais en désaccord avec ceux de Biren et coll. (1987) et de Sumioka et coll. (1982).

Nos résultats révèlent une corrélation positive entre la nourriture ingérée, la nourriture digérée et la digestibilité approximative, alors que, selon Yamamoto et Gamo (1976), la corrélation entre la quantité de nourriture ingérée et la quantité de nourriture digérée est négligeable. Par ailleurs, Biren et coll. (1987) ont détecté une corrélation négative entre ces deux indices.

Les valeurs que nous avons obtenues pour la digestibilité approximative sont comparables à celles observées par d'autres chercheurs (Horie et coll., 1976 ; Horie et Watanabe, 1983 ; Periasami et coll., 1992) et supérieures à celles observées par Petkov (1978).

D'après Horie et Watanabe (1983), les différences entre les sexes pour ce qui concerne la digestibilité sont négligeables et, selon Joshi (1984), la digestibilité est supérieure chez les larves femelles. Nos résultats suggèrent que les différences entre les sexes sont étroitement liées au taux de nourrissage.

L'efficacité de conversion de la nourriture ingérée et digérée en substances corporelles dépend de la digestibilité de la nourriture, de sa qualité nutritive, du taux d'ingestion (Waldbauer, 1964 ; Bailey, 1976), de la race (Ramadev et coll., 1992) et du sexe (Horie et Watanabe, 1983 ; Joshi, 1984).

Nos recherches montrent que les valeurs de l'efficacité de conversion de la nourriture ingérée et digérée en matière corporelle sont étroitement liées au taux de nourrissage et qu'elles sont maximales au taux de nourrissage réduit devant le taux de nourrissage excédentaire et qu'elles sont minimales au taux de nourrissage modéré. Des résultats similaires ont été obtenus par Sumioka et coll. (1982) et Nath et coll. (1990) et peuvent s'expliquer par une adaptation physiologique aux conditions de stress nutritionnel. Les valeurs que nous avons obtenues pour l'ECI et l'ECD sont supérieures à celles obtenues par Horie et Watanabe (1983), Perisiami et coll. (1982), Perisiami et Radhakrishnan (1985) et Ramadevi et coll. (1992) chez *Bombyx mori* L., ce qui pourrait s'expliquer par l'utilisation de différentes races de vers à soie et différentes variétés de mûrier ainsi que par des différences dans les méthodes utilisées. Nos valeurs ECI et ECD sont supérieures à celles obtenues par Waldbauer (1964) chez *Manduca sexta*, par Schroder (1971) chez *Hyalophora cecropia* et *Platisimia cecropia*, par Scriber et Feeny (1979) chez *Antheraea actias*, *Samia*, *Callosamia* et *Hyalophora*, par Biren et coll. (1987) chez *Antheraea proylei*, mais s'approchent de celles observées par Joshi (1984) chez *Philosamia ricini*. Les valeurs obtenues pour l'efficacité de conversion de la nourriture ingérée et digérée en coque et en oeufs obtenues dans cette étude sont supérieures à celles obtenues par d'autres chercheurs, ce qui pourrait s'expliquer par les différences de période de prélèvement des échantillons.

Les analyses montrent que les indices les plus importants, qui caractérisent l'ingestion, la digestion et l'utilisation de la nourriture, dépendent du taux de nourrissage. Chez les deux souches de ver à soie *Bombyx mori* L. étudiées, la nourriture est mieux utilisée au taux de nourrissage réduit, devant les taux de nourrissage exédentaire et modéré.

Les larves femelles de la souche T 15/4 utilisent mieux la nourriture que les mâles pour ce qui concerne la matière corporelle aux taux de de nourrissage modéré et excédentaire. Les mâles de la souche T 15/4 utilisent mieux la nourriture pour ce qui concerne les substances corporelles au taux de nourrissage réduit et pour ce qui concerne la coque quel que soit le taux de nourrissage.

Les mâles de la souche B 2/6 utilisent mieux la nourriture que les femelles au taux de nourrissage réduit et les femelles de la même souche utilisent mieux la nourriture aux taux de nourrissage réduit et modéré.

THE SPROUTING BROCCOLI (*BRASSICA OLERACEA* VAR. *ITALICA*) : ACCEPTABILITY OF THE NON - HOST PLANTS BY *BOMBYX MORI*

T. SHIMIZU & M. YAZAWA[1]

Department of Insect Physiology and Behavior, National Institute of Sericulture and Entomological Science, Ohwashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

The acceptability of the non-host plant, sprouting broccoli, by ***Bombyx mori*** *was investigated. Most larvae,* ***Bombyx mori*** *(J 137 × C 146) ate the leaf of the sprouting broccoli (****Brassica oleracea*** *var. italica), but these larvae exhibited toxic symptoms, while a "the polyphagous strain" of* ***Bombyx mori*** *(Asagiri : J 601 × C 601) did not show any toxic symptoms. Presence of glucosides as a common toxic substance in the cruciferae was observed. Therefore, two high performance liquid chromatography (HPLC)-systems were used for analysing glucosides. Eight peaks which are glucosides and glucosinolates containing fructose, glucose and sucrose were detected.*

Keywords : *Bombyx mori*, sprouting broccoli, glucosides, the non-host plant, sinigrin.

INTRODUCTION

Although the larvae of the silkworm eat a few kind of leaves other than mulberry, for example fig and lettuce, these do not support normal growth (Watanabe, 1958). Recently, "polyphagous strains" of *Bombyx mori* (Asagiri and Sawa J) have been developed in our Institute. They eat a wider range of plants than normal due to R-receptor defect of taste cells (Yazawa *et al.*, 1991). However, even though these polyphagous *B. mori* eat leaves other than mulberry they do not develop successfully.

We have discovered that apparently normal *B. mori* larvae (J 137 × C 146) reared in the industry feed on sprouting broccoli, *Brassica oleracea* var. *italica*. We explore this behaviour in the present paper.

MATERIALS AND METHODS

Plants :

Freshly picked leaves of field-cultivated sprouting broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) were used.

Insects :

Larvae were reared on an artificial diet (Yakuruto Co., Japan) until the final instar, and then leaves of sprouting broccoli were offered to normal (J 137 × C 146) and "polyphagous strain" larvae (Asagiri : J 601 × C 601).

---

1. To whom correspondence should be addressed.

Feeding test :

Leaves of sprouting broccoli were offered to two-day-old, final instar larvae (J 137 × C 146) which had been deprived of food for 24 hr, and consumption weight during a 7 hr feeding period was measured individually.

Extraction of glucosides :

Leaves of sprouting broccoli (20 g) were homogenized in 100 ml 80 % methanol and the suspension was filtered through filter paper. These crude extracts were concentrated using a rotary evaporator under vacuum at 4 °C, and divided into three samples. One sample was further concentrated with a rotary frizzed evaporator to 1260 µl. After filtration (0.45 µm, SJHV 013 NS, millipore), 25 µl or 20 µl of this sample were injected onto the high performance liquid chromatography (HPLC)-column.

High performance liquid chromatography (HPLC):

Two HPLC-systems were used for analysing glucosides. Carbohydrates and glucosides were detectable in system 1 and glucosinolates in system 2.

System 1 : The chromatograph was operated at 30 °C in the constant flow mode at 1.0 ml/min. The column type was Shim-pack (LC-NH_2, Shimadzu, Co., Ltd) and was eluted with 70 % acetonitrile.

System 2 : The mobile phase was 0.07 M phosphate buffer (pH 7.0)-methanol (95:5), and flow rate was 0.7 ml/min. A 250 × 4.6 mm ID Zorbax ODS column (DuPont) was used.

Systems 1 and 2 were performed with a refractive index (RI) detector (ERC-7520, Erma Optical Works, Ltd). Peak areas and retention times were measured using a C-R 1B Chromatopac (Shimadzu, Co., Ltd).

Chemicals :

(-)-Sinigrin monohydrate (98 %) was purchased from Aldrich Chem. Co.

RESULTS

Acceptability and toxicity :

When a picked leaf was offered to normal *Bombyx mori* after starvation for 48 hr from day 1 of the last instar, larvae consumed this leaf (Fig. 1). After 24 hr deprivation most animals ate at least some broccoli over a 7 hr period (Fig. 2). Following feeding these larvae exhibited toxic symptoms over the next day or two, but generally did not die. Typically four toxic symptoms were observed : 1) swollen thorax (Fig. 3), 2) regurgitation with rolling of the body, 3) bending of the body into a loop, 4) immobilization of both the thoracic and abdominal legs. These larvae also stop feeding and these toxicity symptoms are repeatable. In marked contrast, Asagiri, the "polyphagous strain" of *Bombyx mori*, did not show any toxic syptoms over the two days.

Glucosides from HPLC-system 1 :

As shown in Fig. 4, four peaks were detected. Peak 2 (with retention time (RT) 7.0) was fructose. The RTs of glucose and sucrose are 7.7 and 9.4 min. respectively, and these were detected.

Glucosides from HPLC-system 2 :

Four peaks of glucosides were detected in the HPLC-system 2 (Fig. 5-A). Sinigrin was not detected. The RT of the sinigrin added as a control was 4.92 min (Fig. 5-B).

In short from the HPLC-system 1 and 2, a total of 8 compounds of glucosides and/or carbohydrates were detected.

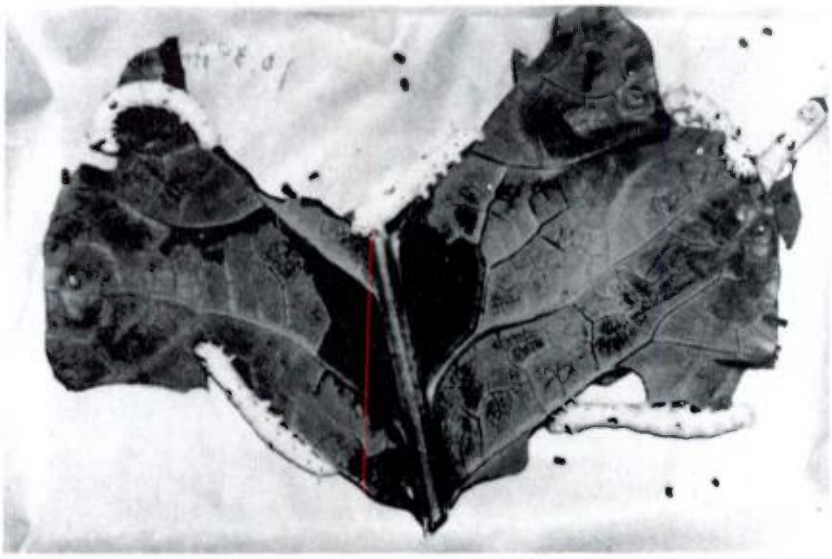

Fig. 1 : Normal *Bombyx mori* (J 137 × C 146) feeding a picked leaf of sprouting broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*).

After starvation was carried during 48 hr from day 1 of the last instar, leaves were offered.

***Fig. 1 : Larves normales de* Bombyx mori *(J 137 × C 146) se nourrissant d'une feuille de brocoli(*Brassica oleracea *var.* italica)**

Les feuilles sont distribuées après un jeûne de 48 h débutant au premier jour du dernier stade larvaire.

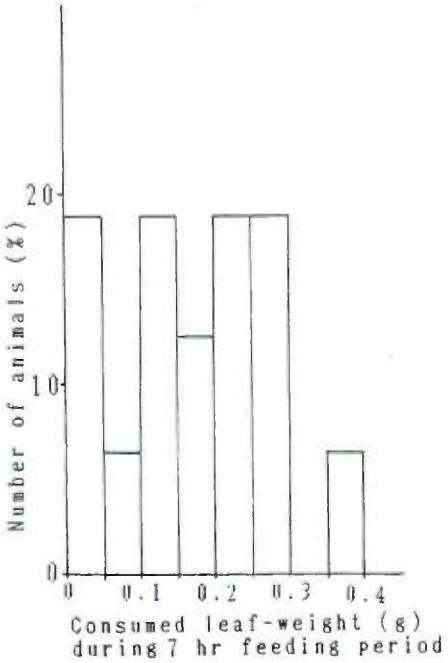

Fig. 2 : Consumption pattern of a picked leaf of sprouting broccoli by two-day-old, final instar normal *Bombyx mori* (J 137 × C 146).

Consumption (g) during a 7 hr feeding period was measured individually (n = 16).

Fig. 2 : Profil de consommation d'une feuille de brocoli coupée par des larves normales de* Bombyx mori *(J 137 × C 146) au deuxième jour du 5e âge larvaire.

La consommation (en g) au cours d'une période de nourrissage de 7 hr a été mesurée individuellement (n = 16).

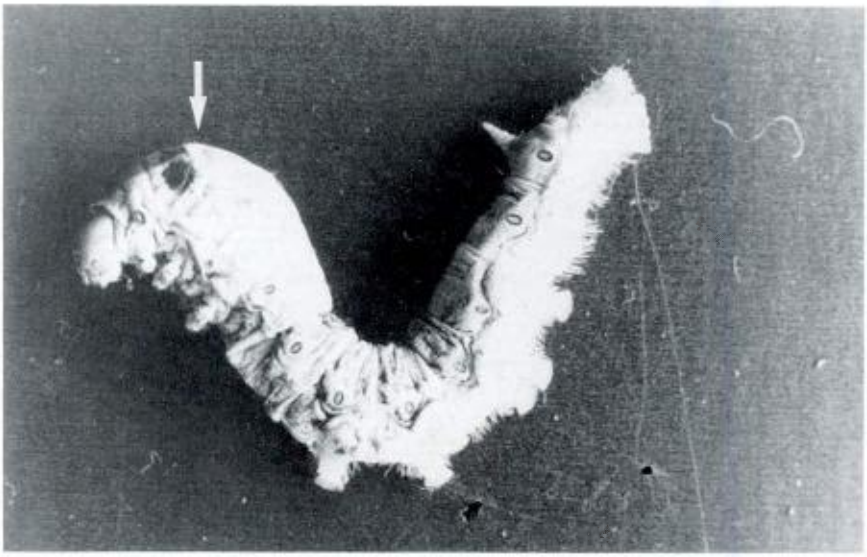

Fig. 3 : A typical toxic symptom following offering the leaf of sprouting broccoli.

An arrow indicates the swollen thorax part.

Fig. 3 : Symptôme caractéristique de la toxicité à la suite du nourrissage avec une feuille de brocoli.

La flèche indique la partie thoracique hypertrophiée.

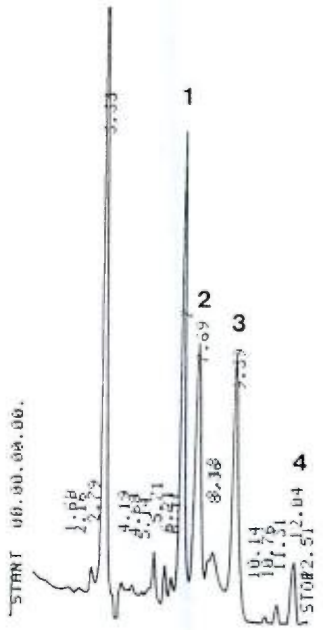

Fig. 4 : HPLC elution pattern of glucosides of the sample in system 1.

Peak numbers 1, 2 and 3 are fructose, glucose and sucrose, respectively. Peak number 4 is an unknown compound.

Fig. 4 : Profil d'élution en HPLC des glucosides de l'échantillon dans le système 1.

Les pics 1, 2 et 3 correspondent respectivement au fructose, au glucose et au sucrose. Le pic 4 correspond à un composé inconnu.

DISCUSSION

This is the first report on the relation between normal *Bombyx mori* and the non-host plant, sprouting broccoli, in the laboratory. It has been already reported that a "polyphagous strain" of Sawa J and Asagiri eats some plants other than mulberry (Yazawa *et al.*, 1991). It has been reported that it is the presence of three stimulants ; namely attractants, biting factor and a swallowing factor which induces the preferential selection of mulberry leaves as food by silkworm larvae (Hammamura *et al.*, 1962). Considering from the acceptability, there is possibility of the presence of similar "three factors" in sprouting broccoli leaves. This speculation that was deduced from the present experiment has a risk since the silkworms were starved for considerable duration and it was not normal feeding.

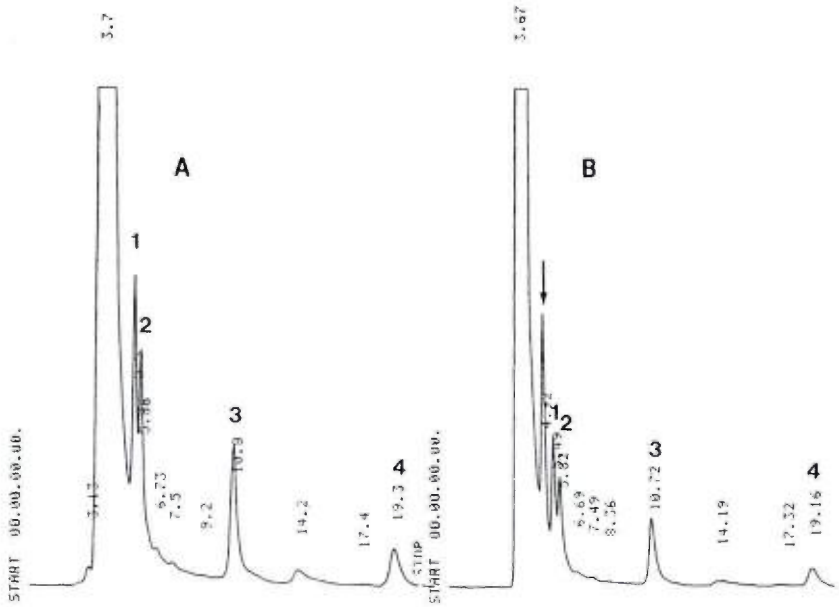

Fig. 5 : Chromatogram of glucosides of the sample (A) and chromatogram added with an authentic sinigrin (B) (indicated with an arrow) in the HPLC-system 2.

This HPLC-system 2 is detectable glucosinolates.

Fig. 5 : Chromatogramme des glucosides de l'échantillon (A) et chromatogramme additionné de sinigrine authentique (B) (indiqué par la flèche) dans le système HPLC 2.

Ce système HPLC 2 déctecte les glucosinolates.

As toxic substances, glucosinolates has been found in all members of the cruciferae, especially 2-phenylethylisothiocyianate derived from glucosinolates has been identified in members of cruciferae, turnips, cabbage, and horseradish (Stahmann *et al.*, 1943 ; Lichtenstein *et al.*, 1962) and has the insecticidal activity against the German cockroach, *Blatella germanica*, (Lichtenstein *et al.*, 1962). It is famous that an isothiocyanate compound, a metabolite from sinigrin, is agonist for an acethylcholine receptor in the CNS of the cockroach, *Periplaneta americana* (Gepner *et al.*, 1978). All available commercial compounds of isothiocyanates having R-N=C=S were checked and all compounds induced toxic symptoms observed with offering the leaves of sprouting broccoli when they are injected to normal *Bombyx mori* (Shimizu, unpublished data).

In the present HPLC-systems 1 and 2, eight peaks were detected, but the peak of 2-phenylethylisothiocyanate was found not identical. We further must check toxicity of eluted peaks.

The sprouting broccoli is the host-plant of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae*. A "polyphagous strain" of *Bombyx mori* (Asagiri) did not show any toxic symptoms as compared with that of normal *Bombyx* larvae. Therefore, this toxic substance (s) of broccoli might not act to species-specific; rather depend on detoxicity of toxic factor, for phytophagous lepidopterous larvae.

REFERENCES

GEPNER J. I., HALL L. M., SATTELE D.B. (1978) Insect acetylcholine receptors as a site of insecticide action. Nature, 276, 188-190.

HAMMAMMURA Y., HAYASHIYA K., NAITO K., MATSUMURA K., NISHIDA J. (1962) Food selection by silkworm larvae. Nature, 194, 754-755.

LICHTENSTEIN E. P., STRONG F. M., MORGAN D. G. (1962) Identification of 2-phenylethylisothiocyanate as an insecticide occurring naturally in the edible part of turnips. Agr. Food Chem., 10, 30-33.

STAHMANN M. A., LINK K. P., WALKER J. C. (1943) Mustard oils in crucifers and their relation to resistance to clubroot. J. Agr. Research, 67, 49-63.

WATANABE M. (1958) Substances in mulberry leaves which attract sikworm larvae (*Bombyx mori*). Nature, 182, 325-326.

YAZAWA M., HIRAO T., ARAI N., YAGI S. (1991) Feeding and gustatory responses in the "polyphagous strain" of the silkworm, *Bombyx mori* L. J. Sericult. Sci. Japan, 60, 363-371.

LE BROCOLI (*BRASSICA OLERACEA* VAR. *ITALICA*) : ACCEPTATION DE PLANTES NON-HOTES PAR *BOMBYX MORI*

T. SHIMIZU & M. YAZAWA

Department of Insect Physiology and Behavior, National Institute of Sericultural and Entomological Science, Ohwashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japon.

On a étudié l'acceptation par ver à soie ***Bombyx mori*** *du brocoli, une plante non-hôte. La plupart des larves de* ***Bombyx mori*** *(J 137 × C 146) mangent la feuille de brocoli (****Brassica oleracea*** *var.* ***italica****), mais ces larves présentent des symptômes de toxicité, alors qu'aucun symptôme n'apparaît chez une souche polyphage de* ***Bombyx mori*** *(Asagiri : J 601 × C 146). Les glucosides sont des substances toxiques connues chez les crucifères. Deux systèmes de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ont été donc été mis en place afin d'analyser les glucosides. Huit pics, qui correspondent aux glucosides et aux glucosinolates comportant du fructose, du glucose et du sucrose, ont été détectés.*

INTRODUCTION

Les larves de vers à soie se nourrissent de mûrier, mais également de quelques autres plantes comme par exemple la figue et la laitue, mais ces végétaux ne permettent pas une croissance normale des larves (Watanabe, 1958). Récemment, des souches polyphages de *Bombyx mori* (Asagiri et Sawa J) ont été isolées par notre Institut. Elles se distinguent des autres races car elles mangent un large éventail de plantes, ceci est dû à la défectuosité du récepteur R des cellules gustatives (Yazawa et coll., 1991). Bien que les larves polyphages de *Bombyx mori* se nourrissent d'autres feuilles que les feuilles de mûrier, elles ne parviennent pas à se développer avec succès.

Nous avons pu observer que des larves apparemment normales de *Bombyx mori* élevées à l'échelle industrielle, mangeaient le brocoli *Brassicae oleracea* var. *italica*. Nous étudions ce comportement dans le présent article.

MATERIELS ET METHODES

Végétaux :

On a utilisé des feuilles fraîchement récoltées dans des champs de brocoli (*B. oleracea* var. *italica*).

Insectes :

Les larves ont été élevées sur un milieu artificiel (Yakuruto Co., Japon) jusqu'au dernier stade larvaire, puis on a donné des feuilles de brocoli aux larves normales (J 137 × C 146) et aux souches polyphages (Asagiri : J 601 × C 601).

Test de nourrissage :

Des feuilles de brocoli ont été données aux larves du deuxième jour du cinquième âge larvaire (J 137 × C 146) après un jeûne d'un jour, et le poids de feuilles consommées pendant une période de nourrissage de 7 heures a été mesuré individuellement.

Extraction de glucosides :

Les feuilles de brocoli ont été broyées dans 100 ml de méthanol à 80 % et la suspension a été filtrée à travers un papier. Ces extraits bruts ont été concentrés sous vide à 4 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif puis divisés en trois échantillons. Un échantillon a été ensuite concentré dans un évaporateur rotatif réfrigéré jusqu'à 1 260 µl. Après la filtration (filtre 0,45 µm, SJHV 013 NS, Millipore), 25 µl ou 20 µl de cet échantillon ont été injectés sur une colonne en chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) :

Deux systèmes HPLC ont été utilisés pour l'analyse des glucosides. On a détecté des hydrates de carbone et des glucosides dans le système 1 et des glucosinolates dans le système 2.

Système 1 : La chromatographie a été effectuée à 30 °C sous un flux à mode constant de 1,0 ml/min. Il s'agit d'une colonne de type Shim-pack (LC-NH_2, Shimadzu Co. Ltd.) éluée avec de l'acétonitrile à 70 %.

Système 2 : La phase mobile est un tampon phosphate de 0,07 M (pH 7,0)-méthanol (95 : 5) et le flux est égal à 0,7 ml/min. Une colonne 250 ± 4,6 mm ID de type Zorbax ODS (DuPont) a été utilisée.

Les systèmes 1 et 2 ont été réalisés par HPLC (Shimadzu LC-6A) avec un détecteur d'indice de réfraction (RI) (ERC-7520, Erma Optical Works, Ltd.). Les pics et les temps de rétention ont été mesurés à l'aide d'un Chromatopac C-R 1B (Shimadzu, Co., Ltd.).

Produits chimiques :

La (-) - sinigrine monohydrate à 98 % a été achetée chez Aldrich Chem. Co.

RESULTATS

Acceptation et toxicité :

Lorsqu'une feuille coupée est donnée comme aliment à des larves de *B. mori* normales après un jeûne forcé de 48 heures à partir du 1er jour du dernier âge larvaire, les larves consomment cette feuille (Fig. 1). Après 24 heures de jeûne, la plupart des individus mangent une partie du brocoli pendant environ 7 heures (Fig. 2). A la suite du nourrissage, les larves présentent des symptômes de toxicité dans les deux jours suivants, mais ne meurent généralement pas. Quatre symptômes de toxicité typiques ont pu être observés : 1) hypertrophie du thorax (Fig. 3), 2) régurgitation accompagnée d'un renversement du corps, 3) recroquevillement du corps en boucle, 4) immobilisation des pattes thoraciques et abdominales. Ces larves cessent également de s'alimenter et les symptômes de toxicité sont récurrents. Par contraste, les larves d'Asagiri, la "souche polyphage" de *B. mori*, n'ont présenté aucun des symptômes de toxicité pendant les deux jours.

Glucosides obtenus par le système HPLC 1 :

Comme le montre la figure 4, quatre pics ont été détectés. Le pic 2 (pour un temps de rétention (Rt) de 7,0) correspond au fructose. Les temps de rétention du glucose et du sucrose qui ont pu être détectés sont respectivement de 7,7 et 9,4 minutes.

Glucosides obtenus par le système HPLC 2 :

Quatre pics de glucosides ont été détectés dans le système HPLC 2 (Fig. 5a). La sinigrine n'a pas été détectée. Le temps de rétention de la sinigrine ajoutée comme témoin est de 4,92 minutes (Fig. 5b).

En résumé, des systèmes HPLC 1 et 2, 8 composés de glucosides et/ou d'hydrates de carbone ont été détectés.

DISCUSSION

Cet article constitue la première étude de la relation entre les larves normales de *B. mori* et une plante non-hôte, le brocoli, en laboratoire. Il a déjà été observé qu'une "souche polyphage" de Sawa J et Asagiri consommait des feuilles issues d'autres plantes que le mûrier (Yazawa et coll., 1991). On a établi que c'est la présence de trois stimulants, à savoir : les attractants, le facteur de mastication et le facteur d'ingurgitation, qui induit la sélection préférentielle des feuilles de mûrier par les larves de vers à soie (Hammamura et coll., 1962). Du point de vue de l'acceptation, "trois facteurs" similaires pourraient être présents dans les feuilles de brocoli. Cette hypothèse, qui a été déduite de l'expérience décrite ici, n'est pas totalement fiable car les vers à soie ont été soumis à un jeûne forcé d'une durée considérable ne correspondant pas aux conditions normales de nourrissage.

Pour ce qui concerne les substances toxiques, les glucosinolates ont été observés chez tous les membres des crucifères, en particulier le 2-phényléthylisothiocyanate, dérivé des glucosinolates, a été détecté, le navet, le choux et le raifort (Stahmann et coll., 1943 ; Lichtenstein et coll., 1962) et présente une activité insecticide chez la phyllodromie *Blatella germanica* (Lichtenstein et coll., 1962). On sait qu'un composé isothiocyanate, un métabolite tiré de la sinigrine, est agoniste pour un récepteur de l'acétylcholine dans le système nerveux central de la blatte *Periplaneta americana* (Gepner et coll., 1978). Tous les composés d'isothiocyanates disponibles sur le marché et possédant R-N=C=S ont été vérifiés et tous ces composés induisent les symptômes de toxicité observés arpès nourrissage avec des feuilles de brocoli lorsqu'ils sont injectés dans des larves de *B. mori* normales (Shimizu, non publié).

Dans les systèmes HPLC 1 et 2 décrits ici, 8 pics ont été détectés mais le pic du 2-phényléthylisothiocyanate est différent des autres. Il sera nécessaire de vérifier la toxicité des pics élués.

Le brocoli est la plante hôte de la chenille de la leucanie du choux *Mamestra brassicae*. Une "souche polyphage" de *B. mori* (Asagiri) ne présente aucun symtôme de toxicité par comparaison avec les larves normales de *B. mori*. Il se peut donc que la(les) substance(s) toxique(s) du brocoli n'agisse(nt) pas de façon spécifique sur une espèce, mais dépende(nt) de la détoxicité chez les larves lépidoptères polyphages.

SENSITIVITY OF MALE GERM CELLS TO MITOMYCIN C FOR INDUCTION OF DOMINANT LETHALS IN THE MULBERRY SILKWORM, *BOMBYX MORI* L. (LEPIDOPTERA : BOMBYCIDAE)

R.K. SINHA

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

*The sensitivity of male germ cells in three multivoltine races (Nistari, G and Pure Mysore) of the mulberry silkworm, **Bombyx mori** L., to mitomycin C (MC) was studied by treating meiotic and postmeiotic stages of gametogenesis in three different concentrations (0.05, 0.10 and 0.15 %). The male parents treated at different stages of development, viz. first day of the fifth instar, 2-day and 7-day old pupae (representing spermatocytes, spermatids and spermatozoa stages of germ cells respectively in the gonads) were mated to untreated females, and the number of eggs laid and percentage of hatching were recorded.*

Sensitivity of various stages of male germ cells to mitomycin C for induction of dominant lethality was different. At 0.15 % concentration of MC, the relative dominant lethality (RDL) was 12.02, 20.22 and 98.58 % for spermatocytes, spermatids and spermatozoa stages of germ cells respectively in Nistari, in the case of the race G the RDL was recorded to be 12.50, 18.69 and 86.38 % while for Pure Mysore it was 9.24, 15.27 and 83.50 %. Thus, the scale of sensitivity to MC was in order : spermatozoa > spermatids > spermatocytes. It indicates that MC can act upon the spermatozoa DNA where DNA synthesis is no more in progress.

Keywords : *Bombyx mori* L., Nistari, G, Pure Mysore, mitomycin C, dominant lethal mutation, spermatocytes, spermatids, spermatozoa.

INTRODUCTION

Mutagenesis is an effective supplement to the classical breeding method. It generates a wide base of variations, facilitating selection for genetic correction of specific traits particularly in the inbred population. The mutagenic action of mitomycin C has been extensively studied in a wide variety of organisms viz., bacteria (Boyce and Howard-Flonder, 1964), plants (Merz, 1961), mammals *in vitro* (Cohen and Shaw, 1964 ; Shaw and Cohen, 1965 ; Natarajan and Schemid, 1971 ; Bourgeois, 1974 ; Gupta and Sharma, 1980, 1982), *in vivo* (Ehling, 1971 ; Gilliovod and Leonard, 1971 ; Leonard and Linden, 1972 ; Adler, 1973) and in insects (Suzuki, 1965).

In oriental races of the silkworm plenty of information is available with regard to the mutagenic action of mitomycin C (Tazima and Onimaru, 1966 ; Tazima, 1974, 1978 ; Onimaru and Tazima, 1966 ; Murakami, 1984), but in Indian multivoltine races very little information is available (Sengupta *et al.*, 1976).

In order to take up an elaborate mutation experiment with mitomycin C it is imperative to study the sensitivity of different germ cells to MC and also the mutagenic efficacy of the mutagen. For such assessment, specific loci methods are used with relative ease and the methods with egg colour mutants have been used extensively in the silkworm (Tazima, 1964, 1978 and 1980). However, the methods with eggs colour mutants can hardly be applied to multivoltine strains like Nistari, G and Pure Mysore,

which lay non-pigmented egg. Under such circumstances, studies on the induction of dominant lethals provide an alternative method for such assessment. Though less competent in fidelity than that of specific loci method, it could be used for obtaining approximate estimate of mutagen sensitivity. Slightly poorer in objective, such an assay of dominant lethal mutation is very simple and is widely used to test the mutagenicity of unknown chemicals and to prepare a comparative chart of the mutagenic efficiency of mutagens (Ehling, 1971 ; Murato and Murakami, 1977 ; Datta *et al.*, 1971). The methods can be further extended to know the extent of interpopulational or interracial difference in sensitivity to a certain mutagen.

In the present communication, attempts have, therefore, been made to study the sensitivity of male germ cells to MC for the induction of dominant lethals in three popular Indian multivoltine races of *Bombyx mori* L.

MATERIALS AND METHODS

Three multivoltine races of the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L., viz., Nistari, G and Pure Mysore, were used for the present study. First day of fifth instar male larvae of nearly equal weight, as well as two and seven day old male pupae, all maintained at 24-26 °C and 70-80 % relative humidity, were injected to mitomycin C treatment. The germ cells of first day of fifth instar larvae correspond to primary and secondary spermatocytes. The second day of the pupal period corresponds mostly to spermatids and spermatozoa, while the late pupal stage (7th day) does so mostly to spermatozoa (Datta *et al.*, 1975)

Mitomycin C (MC) of Sigma Chemical Company (St. Louis, USA) was used for the present investigation. Three concentrations, viz., 0.05, 0.10 and 0.15 %, were prepared in 0.85 % saline solution. The different concentrations of MC were injected in the silkworm larvae (V stage) through the last abdominal leg using a microsyringe (Hemilton make). The pupae were injected through their wing bud (Datta *et al.*, 1975 and 1978). A dose of 0.04 ml of solution was injected in each individual while in control lots only 0.85 % saline solution in an equal volume (0.04 ml) was injected.

The silkworms of treated and control batches were reared separately on mulberry leaves. The pupae were maintained at 25 ± 1 °C. The male moths that emerged out of the treated lot were crossed with untreated females. The fertilized moths were allowed to lay the eggs. After incubation and brushing of hatched worms the egg sheets were removed for scoring fecundity, fertility and hatching. Dominant lethal is defined as a dominant mutation that kills the zygote. Therefore, for the determination of dominant lethality, it is essential to start from the confirmation of the fertilized eggs. However, since the multivoltine races, viz, Nistari, G and Pure Mysore used, deposited non-pigmented eggs it made it difficult to discriminate the zygotic lethals from unfertilized eggs. Fortunately, a great majority of induced lethals manifested themselves at the late embryonic stage (i.e., non-hatching blue of egg in Tables I, II and III), supporting a view that most of the unhatched eggs could be regarded as those due to dominant lethal mutations (Datta *et al.*, 1978). Hence, as in organisms like drosophila, mice etc., the relative dominant lethal mutation rate was determined from the following relationship (Datta *et al.*, 1978) :

$$\text{Relative dominant lethality (\%) (RDL)} = \left(1 - \frac{\text{\% of larvae hatched from amongst the eggs laid by females mated to treated males}}{\text{\% of larvae hatched from amongst the eggs laid by females mated to untreated male (control variant)}}\right) \times 100$$

RESULTS AND DISCUSSION

The results presented in Tables I, II and III show the effects of 0.05, 0.10 and 0.15 % MC on the meiotic and postmeiotic germ cells of three silkworm races, i.e. Nistari, G and Pure Mysore.

The results as a whole indicated that dominant lethal mutations were induced in the cells of all three stages of germ cells, namely spermatocytes, spermatids and spermatozoa. However, the sensitivity of different stages of germ cells was different. In all the cases, the fecundity expressed in

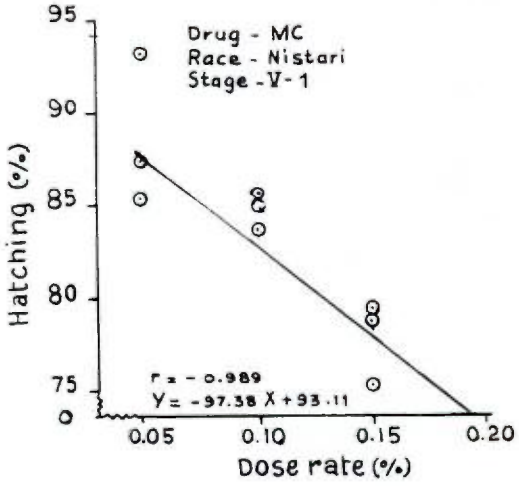

Fig. 1.

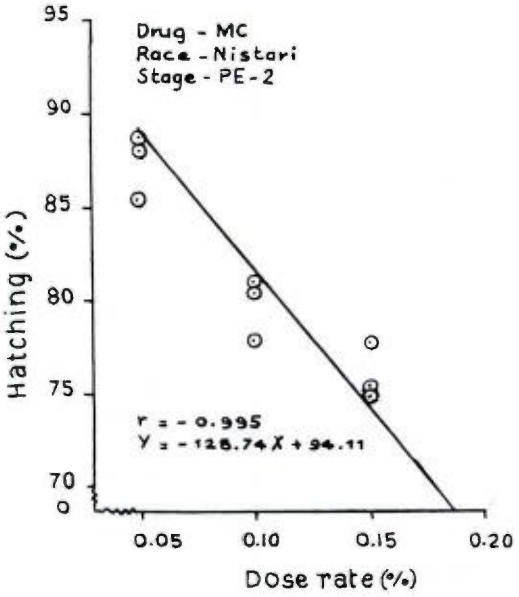

Fig. 2.

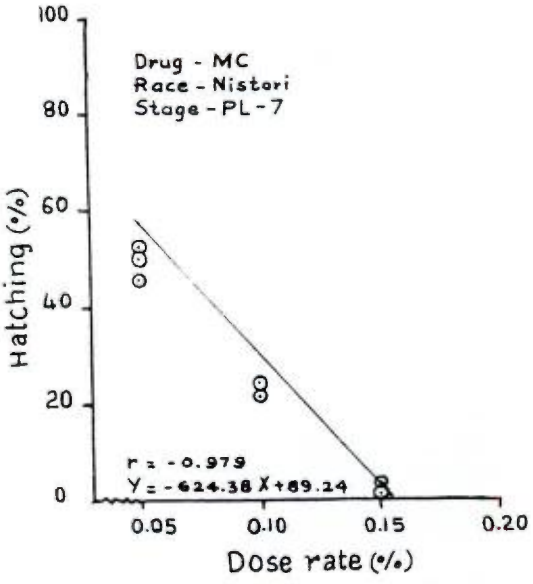

Fig. 3.

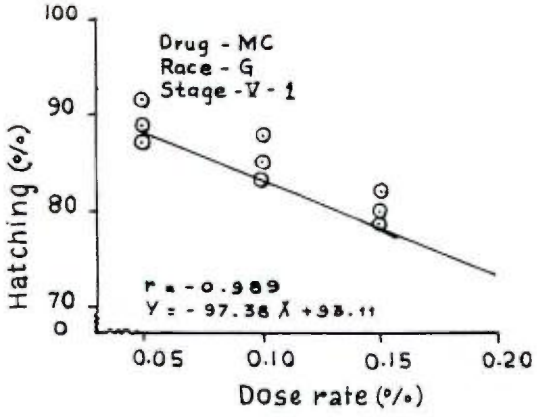

Fig. 4.

terms of eggs laid by untreated females mated with male treated with different concentrations of MC, was at par with that of the control batch. But the percentage of hatching was significantly affected with difference in their doses.

Table I. Induction of dominant lethals by mitomycin C (MC) in the male germ cells of *Bombyx mori*, race : Nistari.

Tableau I. Induction de mutations létales dominantes par la mitomycine C (MC) dans les cellules germinales mâles de* Bombyx mori, *race Nistari.

Stage of germ cells (Silkworm age) / *Stade des cellules germinales (Age du ver à soie)*	MC concentration (%) / *Concentration en MC (%)*	Average no. of eggs per female / *Nombre moyen d'oeufs par femelle*				Hatching (%) / *Eclosion %*	Relative dominant lethality (%) / *Létaux dominant relatifs (%)*
		Total / *Total*	Blue / *Bleu*	Sterile / *Stérile*	Hatched / *Eclos*		
Meiotic germ cells / *Cellules germinales méiotiques* :							
Primary and secondary	0.05	369	23	20	326	88.83 ± 2.57	3.88
spermatocytes / *Spermatocytes*	0.10	425	36	30	359	84.47 ± 0.36	8.60
primaires et secondaires	0.15	402	46	35	312	77.61 ± 1.16	16.02
(V - 1)	cont.	396	12	18	366	92.42 ± 1.70	-
CD at 5 % level	-	-	-	-	-	6.54	-
Postmeiotic germ cells / *Cellules germinales post-méiotiques* :							
a) Spermatids / *Spermatides*	0.05	442	34	22	386	87.33 ± 1.01	8.63
(PE - 2)	0.10	441	52	32	357	80.95 ± 1.27	15.31
	0.15	379	59	31	289	76.25 ± 1.07	20.22
	cont.	385	7	10	368	95.58 ± 1.41	-
CD at 5 % level	-	-	-	-	-	4.02	-
b) Spermatozoa	0.05	403	194	32	197	48.88 ± 1.17	49.45
Spermatozoïdes	0.10	410	207	110	93	22.68 ± 0.71	76.55
(PL - 7)	0.15	439	317	115	06	1.37 ± 0.14	98.58
	cont.	425	11	4	411	96.70 ± 1.10	-
CD at level 5 %	-	-	-	-	-	3.04	-

The germ cells of the first day of fifth instar larvae (V-1) when treated with different concentrations of MC, the percentage of egg hatched was reduced with the increase in the concentration of MC in all the three races. The frequency of RDL recorded from the results, indicated that induction of dominant lethals was dependent on the concentration of MC as RDL % increased with the increase in the concentrations. RDL % at 0.15 % concentration was recorded to be 16.12, 12.50 and 9.24 % in Nistari, G and Pure Mysore, respectively.

In the lot where 2-day old pupae (PE-2) were injected, the percentage of hatching sharply declined and RDL at 0.15 % concentration of MC in Nistari, G and Pure Mysore were recorded to be 20.22,

18.69 and 15.77 %, respectively. The late pupal stage (PL-7) which corresponds to spermatozoa stage, was found to be most sensitive to MC where minimum hatching was recorded. At 0.15 % concentration RDL was 98.58, 86.38 and 83.50 % in Nistari, G and Pure Mysore, respectively.

Table II. Induction of dominant lethals by mitomycin C in the male germ cells of *Bombyx mori*, race : 'G'.

Tableau II. Induction de létaux dominants par la mitomycine C dans les cellules germinales mâles de* Bombyx mori, *race "G".

Stage of germ cells (Silkworm age) / *Stade des cellules germinales (Age du ver à soie)*	MC concentration (%) / *Concentration en MC (%)*	Average no. of eggs per female / *Nombre moyen d'oeufs par femelle*				Hatching (%) / *Eclosion (%)*	Relative dominant lethality (%) / *Létaux dominant relatifs (%)*
		Total / *Total*	Blue / *Bleu*	Sterile / *Stérile*	Hatched / *Eclos*		
Meiotic germ cells / *Cellules germinales méiotiques* :							
Primary and secondary	0.05	395	35	8	352	89.11 ± 1.45	2.46
spermatocytes / *Spermatocytes*	0.10	372	43	11	318	85.48 ± 1.29	6.44
primaires et secondaires	0.15	369	41	33	295	79.94 ± 1.20	12.50
(V - 1)	cont.	382	25	8	349	91.36 ± 1.47	-
CD at 5 % level	-	-	-	-	-	5.21	-
Postmeiotic germ cells / *Cellules germinales post-méiotiques* :							
a) Spermatids / *Spermatides*	0.05	345	16	21	308	89.27 ± 0.93	4.61
(PE - 2)	0.10	367	31	40	296	80.65 ± 1.20	13.82
	0.15	385	42	50	293	79.10 ± 0.90	18.69
	cont.	390	13	12	365	93.59 ± 0.88	-
CD at 5 % level	-	-	-	-	-	2.5	-
b) Spermatozoa	0.05	410	173	25	212	51.70 ± 0.76	45.46
Spermatozoïdes	0.10	390	192	58	140	35.89 ± 0.76	62.14
(PL - 7)	0.15	395	261	83	51	12.91 ± 1.11	86.38
	cont.	385	12	8	365	94.80 ± 1.83	-
CD at level 5 %	-	-	-	-	-	4.00	-

Besides this, a sharp increase in the number of unhatched blue eggs with the treatment of MC in all three stages as compared with sterile eggs were recorded, which indicated that MC produces more embryonic lethals than zygotic ones. However, a parallel increase in both lethals was recorded with an increase in the concentration of MC.

Statistical analysis showed that in all the three stages, the difference in respect of percentage of eggs hatched was significant ($P > 0.01$) (Table IV). The relationship of dose-rate with hatching percentage in the three stages for MC is found to be negatively related in all the three races (Table V).

A regression analysis was also done for the combinations showed significant correlation. The coefficient of regression worked out for the dose rate-hatching percentage for MC in the three stages is negative and significant in all the three races (Table V, Fig. 1 to 9).

Table III. Induction of dominant lethals by mitomycin C in the male germ cells of *Bombyx mori*, race : Pure Mysore.

Tableau III. Induction de létaux dominants par la mitomycine C dans les cellules germinales mâles de* Bombyx mori, *race Pure Mysore.

Stage of germ cells (Silkworm age) / *Stade des cellules germinales (Age du ver à soie)*	MC concentration (%) / *Concentration en MC (%)*	Average no. of eggs per female / *Nombre moyen d'oeufs par femelle*				Hatching (%) / *Eclosion (%)*	Relative dominant lethality (%) / *Létaux dominant relatifs (%)*
		Total / *Total*	Blue / *Bleu*	Sterile / *Stérile*	Hatched / *Eclos*		
Meiotic germ cells / *Cellules germinales méiotiques* :							
Primary and secondary	0.05	362	15	7	340	93.92 ± 0.88	1.17
spermatocytes / *Spermatocytes*	0.10	354	19	14	321	90.68 ± 1.00	4.58
primaires et secondaires	0.15	349	32	17	301	86.25 ± 1.44	9.24
(V - 1)	cont.	388	10	8	370	95.03 ± 0.63	-
CD at 5 % level	-	-	-	-	-	3.53	-
Postmeiotic germ cells / *Cellules germinales post-méiotiques* :							
a) Spermatids / *Spermatides*	0.05	345	23	10	312	90.43 ± 1.11	2.28
(PE - 2)	0.10	365	23	40	302	82.74 ± 1.02	10.59
	0.15	372	34	48	290	77.95 ± 0.59	15.77
	cont.	335	15	10	310	92.54 ± 1.21	-
CD at 5 % level	-	-	-	-	-	3.39	-
b) Spermatozoa	0.05	339	126	20	193	56.93 ± 1.24	39.66
Spermatozoïdes	0.10	349	194	52	103	29.51 ± 1.07	68.72
(PL - 7)	0.15	351	209	88	54	15.57 ± 0.64	83.50
	cont.	354	9	11	334	94.35 ± 1.52	-
CD at level 5 %	-	-	-	-	-	4.45	-

It is evident from the present investigation that MC acts directly on the genetic material of meiotic and postmeiotic stages and induces dominant lethals at spermatocyte, spermatid and spermatozoa stage, among which the spermatozoa are highly sensitive and the spermatocytes are least so. This result is in comformity with the findings of Tazima and his collaborators which were observed for specific locus mutations (Tazima, 1978 ; Murota and Murakami, 1977). However, it is in contrast to the results obtained from EMS and radiation experiments where spermatids and spermatocytes respectively have been found to be most sensitive for induction of dominant lethal mutations in them (Tazima, 1972 ; Tazima, 1974 ; Datta *et al.*, 1965).

Table IV. Three-way analysis of variance for hatching percentage with mitomycin C.

Tableau IV. Analyse de variance tridimensionnelle du pourcentage d'éclosion obtenu avec la mitomycine C.

Source of variation *Source de variation*	Sum of squares *Somme des carrés*	Degree of freedom *Degré de liberté*	Mean square *Carré moyen*	F - value *Valeur de F*
Between sets / *Entre les ensembles*	77 975.06	32	2 227.86	519.76**
Race / *Race*	354.43	2	177.21	41.34**
Stage / *Stade*	38 243.46	2	19 121.73	4 461.12**
Drug concentration *Concentration chimique*	21 682.51	3	7 227.50	1 686.18**
Race × stage / *Race × stade*	231.55	4	57.89	13.51**
Stage × drug concentration *Stade × concentration chimique*	17 032.49	6	2 838.75	662.28**
Race × stage × drug concentration *Race × stade × concentration chimique*	193.42	12	16.12	3.76**
Within sets / *A l'intérieur des ensembles*	308.61	72	4.29	
Total / *Total*	78 283.67	107		

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

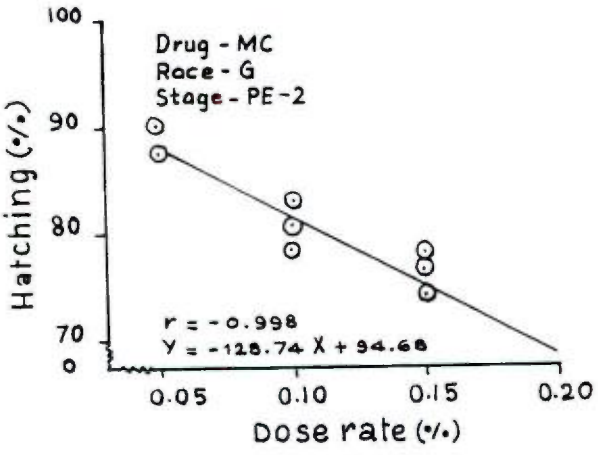

Fig. 5.

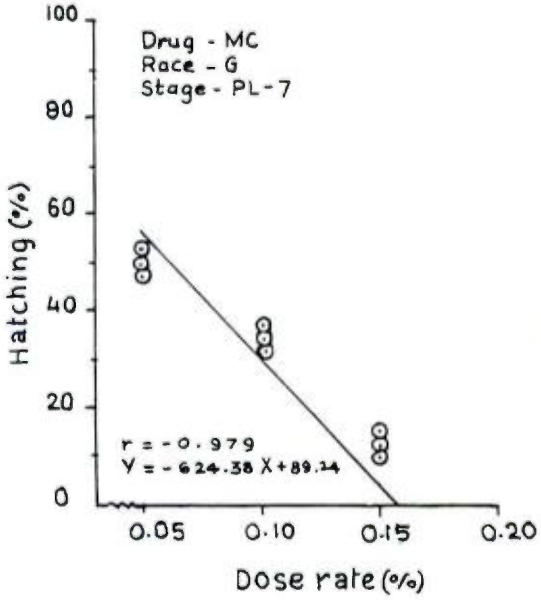

Fig. 6.

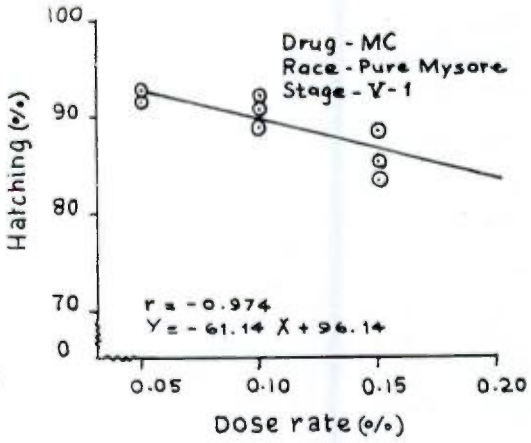

Fig. 7.

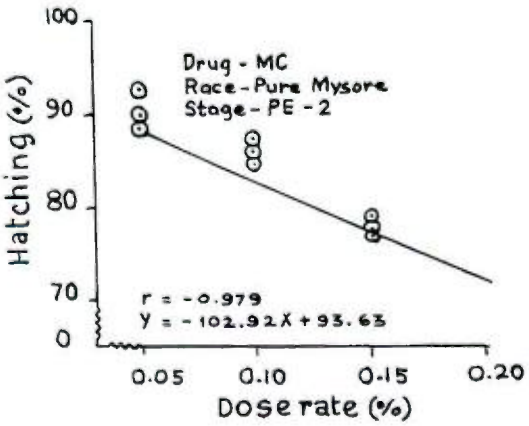

Fig. 8.

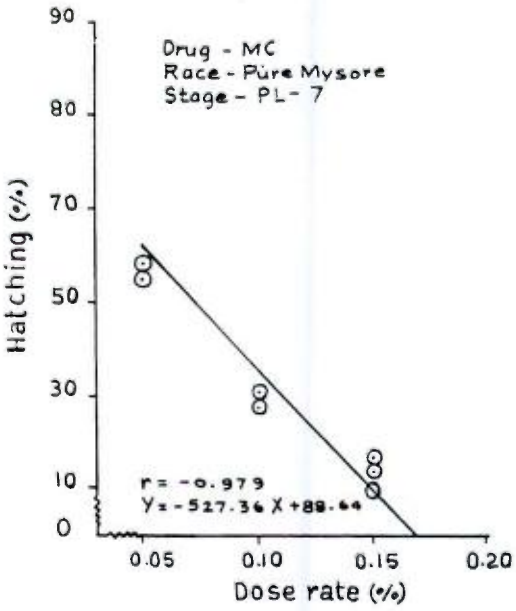

Fig. 9.

In the silkworm (Tazima, 1980 ; Murakami, 1982, 1983) and in mammals (Ehling, 1971), where the spermatozoa are followed by spermatids in their sensitivity to the mutagenic action of MC, Tazima *et al.* (1966) suggested that it is perhaps due to the possibility that MC can act on one of the double helices of spermatozoa DNA where DNA synthesis is no more in progress.

Table V. Correlation values and regression data on mitomycin C dose and hatching percentage in Nistari, G and Pure Mysore.

Tableau V. Valeurs de corrélation et données de régression entre la mitomycine C et le pourcentage d'éclosion chez Nistari, G et Pure Mysore.

Sl No. / *N° de série*	Correlation combinations / *Combinaisons de corrélation*	Correlation coefficient (r) / *Coefficient de corrélation (r)*	Slope (b) / *Inclinaison (b)*	Intercept (a) / *Entre 2 points (a)*	Value of 'T' / *Valeur de "T"*
	(a) Meiotic germ cells / *Cellules geminales méiotiques* (V - 1) :				
	Dose rate / *Dose*				
1.	H % for N / *H % pour N*	- 0.989*	- 97.38	93.11	- 9.336*
2.	H % for G / *H % pour G*	- 0.979*	- 76.01	92.18	- 7.266*
3.	H % for PM / *H % pour PM*	- 0.974*	- 61.14	96.14	- 6.492
	(b) Postmeiotic germ cells / *Cellules germinales post-méiotiques* :				
	(i) Spermatids / *Spermatides* (PE-2)				
	Dose rate / *Dose*				
4.	H % for N / *H % pour N*	- 0.995**	- 128.74	94.68	- 11.464**
5.	H % for G / *H % pour G*	- 0.989*	- 122.18	94.07	- 10.301**
6.	H % for PM / *H % pour PM*	- 0.979*	- 102.92	93.63	- 7.010
	(ii) Spermatozoa / *Spermatozoïdes* (PL - 7)				
	Dose rate / *Dose*				
7.	H % for N / *H % pour N*	- 0.979*	- 624.38	89.24	- 7.167*
8.	H % for G / *H % pour G*	- 0.979*	- 523.68	88.07	- 6.550*
9.	H % for PM / *H % pour PM*	- 0.979*	- 527.36	88.64	- 7.094*

* Significant at 5 % level / *Significatif au seuil de 5 %.*
** Significant at 1 % level / *Significatif au seuil de 1 %.*
H % : Hatching percentage / *Pourcentage d'éclosion.*
N = Nistari.
PM = Pure Mysore.
Table value of 'T' / *Valeur table de "T"* : P = 0.05 : 4.303 ; P = 0.01 : 9.925.

REFERENCES

ADLER J.D. (1973) Cytogenetic effect of mitomycin C in mouse spermatogonia. Mutat. Res., 21, 20-21.

BOURGEOIS C.A. (1974) Distribution of mitomycin C induced damage in human chromosomes wiht specific reference to region of repetitive DNA. Chromosoma, 48, 203-211.

BOYCE R., HOWARD FLONDER P. (1964) Genetic control of DNA breakage and repair in *E. Coli* treated with mitomycin C or ultraviolet light. Z. Veretbungsl., 95, 345-350.

COHEN M.M., SHAW M.W. (1964) Effect of mitomycin C on human chromosome. J. Cell. Biol., 23, 386-395.

DATTA R.K., DAS S.K., ROY G.C., SENGUPTA K. (1975) Sensitivity of meiotic and postmeiotic germ cells of mulberry silkworm to ethyl methanesulfonate. Proc. 2nd All India Cong. Cytol. Genet., J. Cytol. Genet. Cong. (suppl.) 86-70.

DATTA R.K., SENGUPTA K., DAS S.K. (1978) Sensitivity of male germ cells in silkworm to EMS. Muta. Res., 51, 299-304.

EHLING U.H. (1971) Comparison of radiation and chemically induced dominant lethal mutation in male mice. Muta. Res., 11, 35-44.

GILLIOVOD N., LEONARD A. (1971) Test for mutagenic effects of chemical in mice. I. Effects of mitomycin C on spermatogonia. Muta. Res.,13, 324-325.

GUPTA P., SHARMA T. (1980) Preferential effect of mitomycin C on constitutive heterochromatin of the Indian muntjac, *Muntiacus muntigona*. Muta. Res.,20,726-730.

GUPTA P., SHARMA T. (1982) Effect of mitomycin C, hydroxylamine and bromodioxycridine on cell cycle kinetics and sister chromatid exchange frequency of muntajac lymphocytes. Ind. J. Expt. Biol., 20, 726-730.

IYER U.M., SZYBALSKY W. (1963) A molecular mechanism of mitomycin action. Linkage of complementary DNA strand. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash), 50, 355-362.

LEONARD A., LINDEN C. (1972) Observation of dividing spermatocytes for chromosome aberration induced in mouse spermatogonia by chemical mutagens. Muta. Res., 16, 297-300.

LIPSETT M. N., WEISSBAK A. (1965) The role of alkylation of nucleic acid by mitomycin C. Biochemistry, 4, 206-211.

MERZ T. (1961) Effect of mitomycin C on leteral root tip chromosome of *Vicia faba*. Science, 133, 329-330.

MURAKAMI A. (1982) Studies on the effect of environmental chemicals. Res. Rept. to the Min. of Education Sci. and Culture (Japan). B., 124, 1220-1225, 64-67.

MURAKAMI A. (1983) In environmental and human body. II. Environmental mutagens (ed. Chuma I.), University of Tokyo Press, Tokyo, 105-122.

MURAKAMI A. (1984) Dose response relationships for mutation induced by chemicals in the silkworm. Problems of threshold in chemical mutagens (ed. Y. Tazima, 1984).

MUROTA T., MURAKAMI A. (1977) Induction of dominant lethal mutation by alkylating agents in germ cells of silkworm *Bombyx mori* L. J. Sericult. Sci. Jap., 46(3), 205-212.

NATARAJAN A.T., SCHEMID W. (1971) Differential response of constitutive and facultative heterochromatin in the manifestation of mitomycin C - induced chromosome aberration in Chinese hamster cell *in vitro*. Chromosome (Berl.), 33, 48-62.

ONIMARU K., TAZIMA Y. (1966) Delayed mutagenic effect of mitomycin C and EMS observed in silkworm. Ann. Rept. Nat. Inst. Genet. Jap., 19, 63.

SENGUPTA K., DAS S.S., GUPTA G.C. (1976) Chemical mutagenesis in sikworm, *Bombyx mori* L. and its bearing on the improvement of the local breed. Dunn. Dobzh. Symp. Genet. Univ., Mysore (India).

SHAW M.N., COHEN M.M. (1965) Chromosome exchange in human leucocytes induced by mitomycin C. Genetics, 51, 181-190.

SUZUKI D.T. (1965) Effect of mitomycin C on chrossing over in *Drosophila melanogaster*. Genetics, 51, 635-640.

TAZIMA Y. (1964) The genetics of the silkworm. Logos Press Academic Press, London.

TAZIMA Y., ONIMARU K. (1966) Mechanism of mutation induction by mitomycin C in silkworm. Ann. Rept. Nat. Inst. Genet. Jap., 17, 94.
TAZIMA Y. (1972) Studies on strain difference in radiosensitivity in the silkworm. XIV. Further data on dominant lethality. Ann. Rept. Nat. Inst. Genet. Jap., 22, 57-59.
TAZIMA Y. (1974) Some problems in the methodology of chemical mutagenesis in the silkworm. Ind. J. Genet. Plant Breeding, 34, 302-310 (Proc. 2nd SABRAO, 1973).
TAZIMA Y. (1978) The silkworm : an important laboratory tool. Kodansha (ed. Y. Tazima) Tokyo, Japan.
TAZIMA Y. (1980) Chemical mutagens (ed. De Serres, FJ and A. Hollainder) Plenum Press, New York, 8, 203.
WEISSBABAK A., LISIO A. (1965) Alkylation of nucleic acid by mitomycin C and porfiromycin. Biochemistry, 4, 196-200.

ETUDE DE LA SENSIBILITE DES CELLULES GERMINALES MALES A LA MITOMYCINE C PAR MESURE DE L'INDUCTION DE MUTATIONS LETALES DOMINANTES CHEZ LE VER A SOIE DU MURIER *BOMBYX MORI* L. (LEPIDOPTERA : BOMBYCIDAE)

R.K. SINHA

Central Tasar Research and Training Institute, Piska Nagri, Ranchi - 835 303, Inde.

La sensibilité à la mitomycine C (MC) des cellules germinales mâles chez trois races polyvoltines (Nistari, G et Pure Mysore) du ver à soie du mûrier ***Bombyx mori*** *L. a été étudiée par traitement des stades méiotiques et post-méiotiques de la gamétogenèse selon trois concentrations différentes (0,05, 0,10 et 0,15 %). Les parents mâles traités à différents stades du développement, soit au premier jour du cinquième âge larvaire, au deuxième et au septième jour du stade pupal (représentant respectivement les stades spermatocytes, spermatides et spermatozoïdes des cellules germinales dans les gonades) ont été accouplés à des femelles non traitées. Le nombre d'oeufs pondus et le pourcentage d'éclosion ont été enregistrés.*

La sensibilité à la mitomycine C des cellules germinales mâles à différents stades mesurée par l'induction de mutations létales dominantes varie. A la concentration de 0,15 % de MC, la létalité dominante relative (LDR) est de 12,02, 20,22 et 98,58 % respectivement pour les stades spermatocyte, spermatide et spermatozoïde des cellules germinales chez Nistari, de 12,50, 18, 69 et 86,38 % chez la race G et de 9,24, 15,27 et 83,50 % chez Pure Mysore. L'échelle de la sensibilité à la MC est donc par ordre croissant : spermatozoïdes > spermatides > spermatocytes. Ceci indique que la MC peut agir sur l'ADN des spermatozoïdes lorsque la synthèse d'ADN est terminée.

INTRODUCTION

La mutagenèse constitue un complément efficace aux méthodes de sélection classiques. Elle génère une large gamme de variations, facilitant la sélection et la correction génétique de caractères spécifiques, particulièrement chez les populations consanguines. L'action mutagène de la mitomycine C a été étudiée de manière extensive chez un grand nombre d'organismes comme les bactéries (Boyce et Howard-Flonder, 1964), les végétaux (Merz, 1961), les mammifères *in vitro* (Cohen et Shaw, 1964 ; Shaw et Cohen, 1965 ; Natarajan et Schemid, 1971 ; Bourgeois, 1974 ; Gupta et Sharma, 1980, 1982), *in vivo* (Ehling, 1971 ; Gilliovod et Leonard, 1971 ; Leonard et Linden, 1972 ; Adler, 1973) et chez les insectes (Suzuki, 1965).

On dispose d'une vaste documentation sur l'action mutagène de la mitomycine C chez les races orientales du ver à soie (Tazima et Onimaru, 1966 ; Tazima, 1974, 1978 ; Onimaru et Tazima, 1966 ; Murakami, 1984) mais très peu pour les races polyvoltines indiennes (Sengupta et coll., 1976).

Afin de mettre en place une expérience élaborée sur la mutation à l'aide de la mitomycine C (MC), il est indispensable d'étudier la sensibilité de différentes cellules germinales à la MC ainsi que l'efficacité mutagénique du mutagène. Pour une telle évaluation, les méthodes spécifiques pour un locus sont facilement utilisables et les méthodes portant sur les mutations de la coloration de l'oeuf ont été largement utilisées chez le ver à soie (Tazima, 1964, 1978 et 1980). Cependant, les méthodes utilisant les mutations de la coloration de l'oeuf sont difficilement applicables aux souches

polyvoltines comme Nistari, G et Pure Mysore car ces souches donnent des oeufs non pigmentés. Dans ces conditions, des études sur l'induction de mutations létales dominantes constituent une méthode de substitution pour ce type d'évaluation. Bien qu'elle soit moins fiable que la méthode des locus spécifiques, elle peut permettre d'obtenir une estimation approximative de la sensibilité au mutagène. Malgré son objectif moins important, cette évaluation des mutations létales dominantes est très simple et est largement répandue dans les tests de mutagénicité des substances chimiques inconnues et pour l'élaboration d'un tableau comparatif de l'efficacité mutagénique des mutagènes (Ehling, 1971 ; Murato et Murakami, 1977 ; Datta et coll., 1971). Ces méthodes peuvent être élargies afin de déterminer l'étendue des différences de sensibilité à un mutagène donné entre populations ou entre races.

Dans cette communication, nous avons étudié la sensibilité des cellules germinales mâles à la MC pour l'induction de mutations létales dominantes chez trois races polyvoltines indiennes couramment utilisées de *Bombyx mori* L.

MATERIELS ET METHODES

Trois races polyvoltines du ver à soie du mûrier *Bombyx mori* L., soit Nistari, G et Pure Mysore, ont été utilisées dans cette étude. On a injecté de la mitomycine C à des larves mâles au premier jour du cinquième âge d'un poids à peu près égal ainsi que sur des chrysalides mâles âgées de deux et sept jours, toutes maintenues à 24-26 °C et 70-80 % d'humidité relative. Les cellules germinales des larves du cinquième âge correspondent aux spermatocytes primaires et secondaires. Le deuxième jour de la période pupale correspond surtout aux spermatides et aux spermatozoïdes, tandis que la fin de la période pupale (7e jour) correspond surtout aux spermatozoïdes (Datta et coll., 1975).

La mitomycine C (MC) utilisée dans cette étude a été obtenue de Sigma Chemical Company (Saint Louis, USA). Trois concentrations, à savoir 0,05, 0,10 et 0,15 %, ont été préparées dans une solution saline à 85 %. Les différentes concentrations de MC ont été injectées dans des larves de vers à soie (5e âge) dans la dernière patte abdominale à l'aide d'une microseringue (marque Hemilton). L'injection des chrysalides a été faite dans le bourgeon alaire (Datta et coll., 1975 et 1978). Un volume de 0,04 ml de solution a été injecté dans chaque individu tandis que les lots témoins ont été traités avec un même volume (0,04 ml) d'une solution saline à 0,85 %.

Les vers à soie des lots traité et témoin ont été maintenus séparément sur des feuilles de mûrier. Les chrysalides ont été conservées à 25 ± 1 °C. Les papillons mâles issus du lot traité ont été croisés avec des femelles non traitées. Les papillons fécondés ont été mis à pondre. Après incubation et levée des larves écloses, les feuilles de ponte ont été prélevées afin d'enregistrer la fécondité, la fertilité et le taux d'éclosion. La mutation létale dominante se définit comme la mutation dominante tuant le zygote. Il est donc essentiel, pour déterminer la létalité dominante, de commencer dès la confirmation des oeufs fécondés. Cependant, étant donné que les races polyvoltines utilisées, Nistari, G et et Pure Mysore, pondent des oeufs non pigmentés, il est difficile de discerner les létaux zygotiques des oeufs non fécondés. Heureusement, la majorité des mutations létales induites se manifestent à la fin du stade embryonnaire (c'est-à-dire la non éclosion des oeufs bleus, voir tableaux I, II et III) ; ceci corrobore l'hypothèse que la plupart des oeufs non éclos peuvent être considérés comme résultant de mutations létales dominantes (Datta et coll., 1978). De ce fait, comme chez certains organismes tels que la drosophile, la souris, etc., le taux de mutations létales dominantes est déterminé d'après la relation suivante (Datta et coll., 1978) :

$$\text{Létalité dominante relative (\%) (LDR)} = \left(1 - \frac{\text{\% de larves écloses dans les oeufs pondus par des femelles accouplées à des mâles traités}}{\text{\% de larves écloses dans les oeufs pondus par des femelles accouplées à des mâles non traités (témoin)}}\right) \times 100$$

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats présentés dans les tableaux I, II et III montrent les effets de la MC à 0,05, 0,10 et 0,15 % sur les cellules germinales méiotiques et post-méiotiques de trois races de vers à soie, Nistari, G et Pure Mysore.

Dans l'ensemble, les résultats indiquent que des mutations létales dominantes sont induites aux trois stades dans les cellules germinales, à savoir les spermatocytes, les spermatides et les spermatozoïdes. Cependant, la sensibilité des cellules germinales varie en fonction des différents stades. Dans tous les cas, la fécondité, exprimée en termes d'oeufs pondus par des femelles non traitées accouplées avec des mâles traités avec différentes concentrations de MC, est comparable à celle du lot témoin mais le pourcentage d'éclosion est affecté de manière significative par les différentes doses.

Le traitement des cellules germinales des larves au premier jour du cinquième âge (V-1) à différentes concentrations de MC entraîne une diminution du pourcentage d'éclosion proportionnelle à l'augmentation de la concentration de MC chez les trois races. La fréquence de LDR obtenue à partir de ces résultats indique que l'induction de mutations létales dominantes dépend de la concentration de MC car l'augmentation du pourcentage de LDR est fonction de l'augmentation de la concentration. Le pourcentage de LDR à la concentration de 0,15 % est de 16,12, 12,50 et 9,24 respectivement chez Nistari, G et Pure Mysore.

Chez le lot de chrysalides âgées de deux jours (PE-2), le pourcentage d'éclosion chute et les LDR obtenues à la concentration de MC à 0,15 % chez Nistari, G et Pure Mysore sont respectivement de 20,22, 18,69 et 15,77 %. La fin du stade pupal (PL-7), qui correspond au stade spermatozoïde, est le plus sensible à la MC et donne une éclosion minimale après traitement. A la concentration de 0,15 %, la LDR est de 98,58, 86,38 et 83,50 % respectivement chez Nistari, G et Pure Mysore.

En outre, le nombre d'oeufs non éclos bleus après traitement MC aux trois stades augmente de manière marquée par rapport à celui des oeufs stériles, ce qui indique que la MC produit davantage de mutations létales embryonnaires que zygotiques. Cependant, une augmentation parallèle des deux types de mutations létales a été enregistrée lorsque la concentration de MC augmente.

L'analyse statistique montre que, pour les trois stades, le pourcentage d'oeufs éclos diffère de manière significative ($P > 0,01$) (Tableau IV). Le dosage est en corrélation négative avec le pourcentage d'éclosion aux trois stades pour la MC chez les trois races (Tableau V).

L'analyse de corrélation réalisée pour ces combinaisons révèle une corrélation significative. Le coefficient de régression obtenu pour la relation dose-pourcentage d'éclosion pour la MC aux trois stades est négatif et significatif pour les trois races (Tableau V, Fig. 1 à 9).

Cette étude montre clairement que la MC agit directement sur le matériel génétique des stades méiotiques et post-méiotiques et induit des mutations létales dominantes aux stades spermatocytes, spermatides et spermatozoïdes, la sensibilité étant maximale chez les spermatozoïdes et minimale chez les spermatocytes. Ces résultats sont conformes à ceux de Tazima et ses collaborateurs sur les mutations spécifiques de locus (Tazima, 1978, Murota et Murakami, 1977). Cependant, ils contredisent ceux obtenus après des expériences d'irradiation et de EMS, pour lesquels les spermatides et les spermatocytes sont les plus sensibles à l'induction de mutations létales dominantes (Tazima, 1972, Tazima, 1974 ; Datta et coll., 1965).

Chez le ver à soie (Tazima, 1980 ; Murakami, 1982, 1983) et chez les mammifères (Ehling, 1971) où les spermatozoïdes sont suivis par les spermatides pour leur sensibilité à l'action mutagénique de la MC, Tazima et coll. (1966) ont suggéré que ceci pouvait être dû à la possibilité que la MC agit sur l'une des doubles hélices de l'ADN des spermatozoïdes lorsque la synthèse d'ADN est terminée.

INFLUENCE OF ABIOTIC FACTORS ON UZIFLY, *EXORISTA SORBILLANS* (WIEDEMANN) BECK, INFESTATION ON THE SILKWORM (*BOMBYX MORI* L.) AND ASSESSMENT OF CROP LOSS IN MALDA DISTRICT (WEST BENGAL, INDIA)

S.S. BHATTACHARYA, N.G. CHAKRABORTY, B.P. NAIR & A.K. SAHAKUNDU

Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore - 742 101, West Bengal, India.

The incidence of uzifly infestation at the 4th and 5th larval and cocoon stages of silkworms was studied in relation to abiotic factors in 8 successive well-defined commercial rearing seasons in Malda District (West Bengal, India) from May 1988 to February 1990. Maximum infestation (11.6 %) was recorded during May 1988 and minimum (0.008 %) during November 1988 at 5th larval stage. A positive significant correlation of coefficient was noted between uzifly infestation and temperature, humidity as well as rainfall. A multiple regression equation for predicting the rate of uzi-infestation during different seasons has been worked out. Assessment of crop loss due to uzifly infestation during the period May 1988-February 1990 has been made and found to be 12.25 % in Malda District.

Keywords : Uzifly, silkworm, infestation rate, cocoon crop loss.

INTRODUCTION

Exorista sorbillans (Wiedemann) Beck is a serious parasitoid of silkworm larvae (*Bombyx mori*) in West Bengal, Bihar and Assam (Mukherjee, 1899 ; Jameson, 1922 ; Dasgupta, 1962). Published reports indicate its prevalence in many other East Asian countries (Ghosh, 1949). Attack by this tachinid fly was first reported from the Southern part of India, especially in Karnataka, by Jolly (1981).

Uzi-infestation is common in the traditional sericultural districts of West Bengal. Malda, being the largest silk-producing district, contributes 70 % of the total cocoon production of West Bengal. The attack of the fly pest often becomes a menace to the silk industry in the district. In view of its economic importance, Krishnaswami *et al.* (1964) studied the incidence of uzi-infestation on the larval and cocoon stages in Malda District during May to December in 1962. Murty *et al.* (1988) reported the range of uzi-infestation in West Bengal and Andhra Pradesh, based on a random sample survey conducted during 1985-86 and 1986-87. Systematic surveys of uzi-infestation leading to the assessment of failure of the cocoon crop all through the commercial rearing seasons of a year has not been made yet.

We made a thorough study on the incidence of uzi-infestation and assessment of cocoon crop loss based on a cluster sample survey from different commercial zones of Malda District, consecutively from May 1988 to February 1990. An equation has been developed to predict the expected uzi-infestation and eventually assessment of crop loss in different seasons. This report also furnishes the influence of abiotic factors like temperature, humidity and rainfall on the incidence of uzi-infestation in the region.

MATERIALS AND METHODS

Investigation on uzi-infestation to silkworms was made in Malda District during four well-defined commercial rearing seasons of one year, i.e. February crop (Chaitra), May crop (Jaistha),

August crop (Bhaduri) and November crop (Agrahayani). During every commercial rearing season, ten villages under Kaliachak block I and II of Malda District were selected at random (which constitutes 5 % of the total sericultural villages) for the present study, where the incidence of uzi infestation is very common. To begin with, 10 rearing houses were considered as cluster size but due to some practical difficulties data could not be collected from some of these houses as planned and were subsequently deleted. After the deletion the cluster sizes for different seasons varied as follows :

Season	No. of rearers	Cluster size
May '88	81	6-10
August '88	62	6-7
November '88	57	6-9
February '89	60	6
May '89	60	6
August '89	60	6
November '89	60	6
February '90	71	7-8

The rearing trays containing silkworms of a rearing house were classified into 3 strata (top, middle and bottom) where there were 15 trays or less and if the number of trays was more than 15, they were classified into 4 strata (top, upper middle, lower middle and bottom). As maximum uzi-infestation followed by larval mortality and crop loss is found in the 4th and 5th larval stage and cocoon stage, investigation was made during these stages following the symptoms of black scars on the larval bodies and uzi-pierced cocoons. From each selected rearing house 400 worms were taken from each stratum (preliminary studies revealed that a sample size of 400 worms is sufficient) once during the 4th and once during the 5th instar ; 400 cocoons were picked up from the total harvest for studying the rate of uzi-infestation.

The date of brushing for every rearing season and meteorological data such as temperature, humidity (both maximum and minimum) and rainfall prevailing during each observation were recorded. In order to predict the rate of uzi-infestation in relation to the influence of abiotic factors for different seasons, a multiple regression equation has been fitted in the form of $Y = 1 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 + b_5X_5$, where X_1 = maximum temperature, X_2 = minimum temperature, X_3 = maximum relative humidity, X_4 = minimum relative humidity X_5 = rainfall and a, b_1 ... b_5 are regression coefficients.

For the purpose of crop loss estimation, 10 clusters (villages) consisting of varying numbers of rearers per cluster were selected. Cluster size varied from 6 to 10. The estimates for mean and variance were calculated as suggested by Sukhatme *et al.* (1984). Crop loss was estimated by taking the ratio of the number of worms (in disease-free layings) infested to the total number of worms reared (in disease-free layings) and expressed as percentage. The number of disease-free layings (dfls) reared and yield per 100 dfls were also recorded from the respective rearing houses during every season.

RESULTS

The rate of uzi-infestation with reference to temperature, humidity and rainfall during 4th and 5th larval and cocoon stages are depicted in Fig. 1.

During the 4th instar, minimum infestation (0.02 % to 0.41 %) was observed during winter (November-February) [the minimum temperature ranged from 10.64 °C to 24.31 °C, maximum temperature from 18.12 °C to 31.54 °C, minimum humidity from 38.35 % to 63.43 %, maximum humidity from 53.51 % to 79.83 % and rainfall from 0.05 mm to 1.24 mm]. The infestation gradually

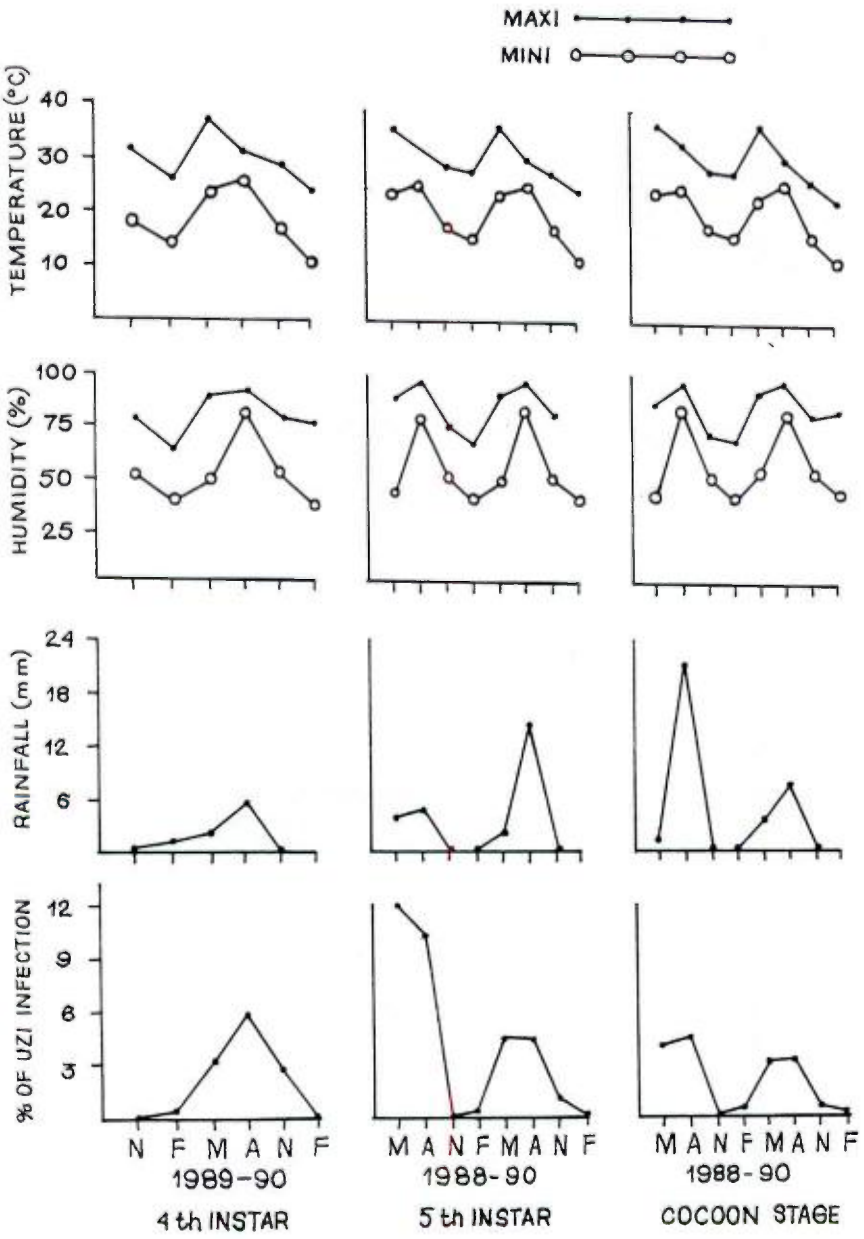

Fig. 1. : Effect of temperature, humidity, rainfall on rate of uzi-infestation in Malda District, West Bengal.

Fig. 1. : Effet de la température, de l'humidité et de la pluie sur le taux d'infestation uzi dans le district de Malda, Bengale occidental.

increased during the summer (May) and maximum infestation (5.7 %) was observed during the rainy season (August) [minimum temperature of 26.34 °C and maximum temperature of 31.85 °C, minimum humidity of 80.45 %, maximum humidity of 96.23 % and rainfall ranged from 4.75 mm to 5.62 mm].

Table I. Coefficient of correlation between uzi-infestation rate and abiotic factors at different developmental stages of silkworms.

Tableau I. Coefficient de corrélation entre le taux d'infestation par la mouche uzi et les facteurs abiotiques à différents stades du développement du ver à soie.

Infestation *Infestation*	Maximum temperature *Température maximale*	Minimum temperature *Température minimale*	Maximum humidity *Humidité maximale*	Minimum humidity *Humidité minimale*	Rainfall (mm) *Pluviométrie (mm)*
4th instar / *4e âge*	0.4866**	0.7784**	0.7870**	0.8005**	0.7442**
5th instar / *5e âge*	0.7281**	0.7265**	0.6722**	0.3517**	0.3800**
Cocoon stage *Stade cocon*	0.7300**	0.7948**	0.7244**	0.5387**	0.6703**

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

Minimum infestation (0.008 % to 1.03 %) during the 5th instar was found during winter (November-February) [minimum temperature ranged from 11.05 °C to 17.82 °C, maximum temperature from 24.83 °C to 29.34 °C, minimum humidity from 40.62 % to 51.4 %, maximum humidity from 67.51 % to 80.91 % and rainfall from 0.01 mm to 0.02 mm].

Table IIa. Regression equation for predicting uzi-infestation for any given season for different developmental stages of silkworms.

Tableau IIa. Equation de régression permettant de prévoir l'infestation uzi en fonction de la saison et du stade de développement du ver à soie.

Stages *Stades*	Equation *Equation*	R square *Carré de R*
4th / *4e*	$Y = 12.0356 - 1.4272\ X_1 + 1.7973\ X_2 + 0.1496\ X_3 - 0.1946\ X_4 - 1.2392\ X_5$	0.876**
5th / *5e*	$Y = 42.0745 - 4.1594\ X_1 + 4.7009\ X_2 + 0.4940\ X_3 - 0.7685\ X_4 - 0.8417\ X_5$	0.682*
Cocoon / *Cocon*	$Y = -2.5267 - 0.1208\ X_1 + 0.3357\ X_2 + 0.0706\ X_3 - 0.0935\ X_4 + 0.1795\ X_5$	0.758**

X_1 = Maximum temperature / *Température maximale*. X_2 = Minimum temperature / *Température minimale*. X_3 = Maximum RH / *Humidité relative maximale*. X_4 = Minimum RH / *Humidité relative minimale*. X_5 = Rainfall *Pluviométrie*. Y = Uzi infestation (%) / *Infestation uzi (%)*.
* Significant at 5 % level / *Significatif au seuil de 5 %.*
** Significant at 1 % level / *Significatif au seuil de 1 %.*

The maximum infestation (11.6 %) was observed during May [minimum temperature was 23.93 °C, maximum temperature was 36.31 °C, minimum humidity was 44.83 %, maximum humidity 88.7 % and rainfall ranged from 2.03 mm to 3.92 mm].

Like in the 4th and 5th instars, minimum infestation (0.067 % to 0.35 %) at cocoon stage was also observed during November-February [the minimum temperature during this period ranged from 11.83 °C to 16.03 °C, maximum temperature from 25.71 °C to 29.27 °C, minimum humidity from 40.72 % to 54.6 %, maximum humidity from 68.04 % to 81.90 %, whereas rainfall was nil]. The maximum infestation was noticed during August (4.26 %), when the minimum temperature remained 25.8 °C, maximum temperature 33.82 °C, minimum humidity 83.54 %, maximum humidity 96.51 % and rainfall 14.52 mm to 25.48 mm.

To quantify the relationship between uzi-infestation and abiotic factors, correlation of coefficient was calculated ; the data are given in Table I. The rate of infestation at 4th and 5th instars and cocoon stage is positively correlated with the temperature, humidity and rainfall at 1 % level.

Table IIb. Comparison of the expected infestation rate with the observed rate in three developmental stages.

Tableau IIb. Comparaison entre le taux d'infestation estimé et le taux d'infestation observé à trois stades du développement.

Seasons	4th instar		5th instar		Cocoon stage	
	% of observed infestation	% of expected infestation	% of observed infestation	% of expected infestation	% of observed infestation	% of expected infestation
Saisons	*4e âge*		*5e âge*		*Stade cocon*	
	Infestation observée (%)	*Infestation estimée (%)*	*Infestation observée (%)*	*Infestation estimée (%)*	*Infestation observée (%)*	*Infestation estimée (%)*
May '88 *Mai 1988*	-	-	11.600	9.600	3.710	3.443
Aug. '88 *Août 1988*	-	-	10.130	7.420	4.260	4.674
Nov. '88 *Nov. 1988*	0.02	0.019	00.008	1.783	0.090	0.202
Feb. '89 *Fév. 1989*	0.41	0.408	00.340	0.001	0.320	0.418
May '89 *Mai 1989*	3.22	3.217	04.380	6.701	2.880	3.070
Aug. '89 *Août 1989*	5.70	5.696	04.110	5.160	2.870	2.957
Nov. '89 *Nov. 1989*	2.85	2.874	01.030	3.437	0.350	0.001
Feb. '90 *Fév. 1990*	0.33	0.328	00.060	0.001	0.067	0.185

- Data not recorded / *Données non relevées.*

Table III. Estimation of crop loss due to uzi infestation.

Tableau III. Estimation de la perte de récolte due à l'infestation uzi.

Sampling Seasons / *Saisons étudiées*	No. of Rearers / *Nombre d'éleveurs*		Yield/ 100 dfls (kg) / *Rendement pour 100 pontes (kg)*	Av. dfls reared / *Nombre moyen de pontes saines élevées*	Mean infestation/100 dlfs / *Infestation moyenne/ 100 pontes saines*			Variance of infested worms / *Variance du taux de larves infestées*			Total dlfs infested / *Total de pontes saines infestées*	% of crop loss / *% de perte de récolte*
	Total / *Total*	Sample / *Echantillon*			4th / *4e*	5th / *5e*	Cocoon / *Cocon*	4th / *4e*	5th / *5e*	Cocoon / *Cocon*		
May '88 *Mai 1988*	743	81	23.80	270.68	-	1171.33	360.67	-	11736.21	3015.95	7702.69	3.83
Aug. '88 *Août 1988*	797	62	19.87	249.60	-	940.48	426.43	-	11811.71	4200.04	6797.91	3.42
Nov. '88 *Nov. 1988*	916	57	30.25	250.00	10.59	3.33	9.76	13.92	10.90	18.50	135.63	0.06
Feb. '89 *Fév. 1989*	981	60	36.35	169.59	40.00	46.67	31.67	296.72	190.09	106.92	492.15	0.30
May '89 *Mai 1989*	973	60	18.09	280.00	323.33	438.33	280.00	1362.32	1587.35	578.06	7094.79	2.60
Aug. '89 *Août 1989*	990	60	20.46	170.17	2195.00	1556.00	1150.00	17993.74	8712.30	10107.18	20641.58	12.25
Nov. '89 *Nov. 1989*	1044	60	32.14	162.50	285.00	96.67	33.33	1230.23	51.20	17.45	1760.20	1.04
Feb. '90 *Fév. 1990*	1079	72	35.76	158.33	30.56	22.22	8.33	18.98	20.95	13.75	261.01	0.15

- Data not recorded / *Données non relevées.*

A multiple regression equation was fitted for predicting uzi-infestation at 4th and 5th instars and cocoon stage with reference to abiotic factors and the respective coefficients of determination (R^2) are shown in Table II(a). The coefficient of determination (R^2) was calculated to be 0.88 in the 4th instar, 0.68 in the 5th instar and 0.76 at cocoon stage, indicating the predictability of uzi-infestation with reference to abiotic factors. The efficiency of the fitted equation furnished in Table II(b) indicates that there is a close relationship between the predicted and observed values for the 4th and 5th instars and the cocoon stage.

Crop loss due to uzi-infestation was estimated for 8 different seasons on the basis of cluster sampling (Table III) and revealed that the percentage of crop loss due to uzi-infestation varied from 0.06 % in November 1988 to 12.25 % during May 1988.

DISCUSSION

Krishnaswami *et al.* (1964) reported maximum uzi-infestation (62.4 %) during the 5th instar in September, while our thorough investigation revealed maximum infestation (11.6 %) in May during the 5th instar.

In search of a general trend of the incidence of uzi-infestation with reference to different commercial rearing seasons, it was observed that the infestation was very low during winter (November to February) and gradually increased as the temperature, humidity and rainfall increased in the following seasons. The infestation was recorded maximum during summer and rainy seasons (May to August). Our observations clearly indicate that the extent of cocoon crop loss due to uzi-infestation in Malda District was 12.25 %, which is far lower than the loss reported by Krishnaswami *et al.* (1964) and Murty *et al.* (1988).

It is experienced from the field observations that rearers follow a particular date of brushing in the entire commercial zones for every rearing season. If any brushing is done earlier to this particular date, the rate of infestation is likely to be heavy. It might be due to this reason that the uzi-population of that area has an early access to attack silkworms in that particular rearing house. The high rate of infestation reported by Krishnaswami *et al.* (1964) might be attributed to this reason.

Multiple regression equation for predicting the incidence of uzi-infestation with reference to different abiotic factors indicate the observed value of infestation during the 4th instar and cocoon stage to be close to the predicted value. The minimum temperature, maximum and minimum humidity and rainfall have greater influence for infestation during these stages. For the 5th instar, the predicted value shows slightly wider difference with the observed value. Among the abiotic factors, only minimum and maximum temperature are found to play a significant role for infestation during the 5th instar.

ACKNOWLEDGEMENTS

We express our gratitude to the Director, CSR & TI (Berhampore, India), for providing laboratory facilities. We also offer our sincere thanks to the Deputy Director, Regional Sericultural Research Station (Mothabari) and to the research workers, Technical Service Centre of Sujapur, Mothabari and Aiho of Malda District (West Bengal) for their assistance in collecting the survey data.

REFERENCES

DASGUPTA K.P. (1962) Observations on the behaviour of uzifly maggots. Indian J. Seric., 1(2), 16-18.

GHOSH C.C. (1949) Silk Production and Weaving in India. Govt. Printing Press, Calcutta, 1-232.

JAMESON A.P. (1922) Report on the diseases of silkworm in India. Govt. Printing Press, Calcutta, 62-64.

JOLLY M.S. (1981) Uzifly and its identification, prevention and control. Bull. of CSRTI Mysore, 4.

KRISHNASWAMI S., JOLLY M.S., DUTTA R.K. (1964) A study on the fly pest infestation of the larvae and cocoon of *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 3, 7-12.

MUKHERJEE N.G. (1899) Handbook of Sericulture. Monograph, Silk Fabrics of Bengal, Calcutta.
MURTY S.V., JYOTHI K.N., JAMIL K. (1988) Environmental factors governing the infestation of uzi-fly (*Exorista sorbillans*), an endoparasite of mulberry silkworm, *Bombyx mori*, in certain areas of West Bengal and Andhra Pradesh. Proc. National Symposium on Nutritional Ecology of Insects and Envrionment, Muzaffarnagar.
SUKHATME P.V., SUKHATME B.V., ASOK C. (1984) Sampling theory of survey with applications. Iowa State Univ. Press & ISAS, New Delhi, p. 526.

INFLUENCE DES FACTORS ABIOTIQUES SUR L'INFESTATION PAR LA MOUCHE UZI *EXORISTA SORBILLANS* (WIEDEMANN) BECK DU VER A SOIE (*BOMBYX MORI* L.) ET EVALUATION DES PERTES DE RECOLTE DANS LE DISTRICT DE MALDA (BENGALE OCCIDENTAL, INDE)

S.S. BHATTACHARYA, N.G. CHAKRABORTY, B.P. NAIR & A.K. SAHAKUNDU

Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore - 742 101, West Bengal, Inde.

L'incidence de l'infestation par la mouche uzi au 4e et au 5e âge larvaire ainsi qu'au stade cocon a été étudiée en fonction des facteurs abiotiques au cours de 8 saisons consécutives nettement définies d'élevage commercial dans le district de Malda (Bengale occidental) de mai 1988 à février 1990. L'infestation maximale (11,6 %) a été relevée en mai 1988 et l'infestation minimale (0,008 %) en novembre 1988 au 5e âge larvaire. On a observé un coefficient de corrélation positif et significatif entre l'infestation par la mouche uzi, d'une part, et la température, l'humidité et la pluviosité, d'autre part. On a défini une équation de régression multiple visant à prévoir le taux d'infestation par la mouche uzi au cours des différentes saisons. Une évaluation des pertes de récolte dues à l'infestation, réalisée de mai 1988 à février 1990, a montré qu'elles s'élevaient à 12,25 % dans le district de Malda.

INTRODUCTION

Exorista sorbillans (Wiedemann) Beck est un dangereux parasite des larves du ver à soie (*Bombyx mori*) dans le Bengale occidental, le Bihar et l'Assam (Mukherjee, 1899 ; Jameson, 1922 ; Dasgupta, 1962). Des rapports font état de sa prédominance dans de nombreux autres pays d'Asie orientale (Ghosh, 1949). Jolly (1981) a décrit le premier l'infestation par ce tachinide dans la partie méridionale de l'Inde, en particulier dans le Karnataka.

L'infestation par la mouche uzi est commune dans les zones sériciccoles traditionnelles du Bengale occidental. Malda, le district producteur de soie le plus important, contribue pour 70 % dans la production totale de cocons du Bengale occidental. L'infestation par la mouche uzi constitue souvent une menace pour l'industrie sériciccole de cette région. Du fait de son impact économique, Krishnaswami et coll. (1964) ont étudié l'incidence de l'infestation par la mouche uzi sur les stades larvaires et les cocons dans le district de Malda de mai à décembre 1962. Murty et coll. (1988) ont décrit la gamme des infestations par la mouche uzi dans le Bengale occidental et dans l'Andhra Pradesh, à partir d'une étude sur des échantillons aléatoires, effectuée de 1985 à 1986 et de 1986 à 1987. Des études systématiques sur l'infestation par la mouche uzi conduisant à une évaluation de la perte de récolte des cocons tout au long de l'année n'ont pas encore été réalisées.

Nous avons fait une étude complète de l'incidence de l'infestation par la mouche uzi et de l'évaluation de la perte de récolte de cocons basée sur un échantillonnage de cocons issus de différentes régions commerciales du district de Malda, de mai 1988 à février 1990. On a défini une équation visant à prévoir le taux d'infestation par la mouche uzi afin d'évaluer les pertes de récolte en fonction des différentes saisons. Ce rapport décrit également l'influence de facteurs abiotiques tels la température, l'humidité et la pluie sur l'incidence de l'infestation par la mouche uzi dans la région.

MATERIELS ET METHODES

Des travaux sur l'infestation du ver à soie par la mouche uzi ont été réalisés dans le district de Malda au cours de quatre saisons nettement définies d'un élevage commercial annuel, les récoltes de février (Chaitra), de mai (Jaistha), d'août (Bhaduri) et de novembre (Agrahani). Pour chacune de ces saisons, dix villages situés dans les blocs I et II du district de Malda, dans lesquels l'infestation par la mouche uzi est très courante et qui constituent 5 % du total des villages séricicoles, ont été sélectionnés de façon aléatoire pour cette étude. Au début, chaque échantillon comprenaient dix fermes d'élevage mais en raison de certaines difficultés pratiques, les données n'ont pas pu être relevées dans certains de ces centres comme cela était prévu et ont été par la suite annulées. Après l'annulation, les échantillons pour des saisons différentes ont été répartis ainsi :

Saisons	Nombre d'éleveurs	Taille des groupes
Mai 1988	81	6-10
Août 1988	62	6-7
Novembre 1988	57	6-9
Février1989	60	6
Mai 1989	60	6
Août 1989	60	6
Novembre 1989	60	6
Février 1989	71	7-8

Les litières contenant des vers à soie d'un même centre d'élevage ont été empilés en trois claies (haut, milieu et bas) de quinze litières maximum. Lorsque le nombre de litières dépassaient quinze,elles ont été classées en quatre claies (haut, moyen supérieur, moyen inférieur et bas). La recherche a été réalisée au cours des 4e et 5e âges larvaires et du stade cocon étant donné que l'infestation par la mouche uzi et la perte de récolte est maximale à ces stades, d'après l'observation de la présence de cicatrices noires sur les corps larvaires et les cocons infestés par la mouche uzi. Quatre cents vers ont été ensuite prélevés sur chaque claie de chaque ferme d'élevage sélectionnée (des études préliminaires ont révélé qu'un échantillon de 400 vers était suffisant), une fois pendant le 4e et une autre fois lors du 5e âge larvaire. Quatre cents cocons ont été prélevés sur la récolte totale pour l'étude du taux d'infestation par la mouche uzi.

On a relevé la date de levée pour chaque saison d'élevage et les indices météorologiques, telles la température, l'humidité (maximale et minimale) et la pluviométrie. Afin de prévoir le taux d'infestation par la mouche uzi en fonction de l'inflluence des facteurs abiotiques pour différentes saisons, on a établi l'équation de régression multiple suivante : $Y = a + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_4 X_4 + b_5 X_5$ where X_1 = température maximale, X_2 = température minimale, X_3 = humidité relative maximale, X_4 = humidité relative minimale, X_5 = pluviométrie (cumulée), Y = taux d'infestation uzi et a, b_1 ... b_5 sont les coefficients de régression.

Pour l'évaluation de la perte de récolte, dix groupes (villages) constitués d'un nombre varié d'éleveurs (6 à 10) ont été analysés. Les estimations de la moyenne et la variance ont été réalisées selon la méthode de Sukhatme et coll. (1984). La perte de récolte a été estimée à partir du nombre total de vers élevés (de pontes saines) converti en pourcentage. Le nombre de pontes saines et le rendement en cocons pour 100 pontes saines a également été enregistré dans chaque centre d'élevage pour toutes les saisons.

RESULTATS

Les taux d'infestation par la mouche uzi en fonction de la température, de l'humidité et de la pluviométrie au cours des 4e et 5e stades larvaires et au cours du stade cocon sont indiqués dans la figure 1.

Lors du 4e âge larvaire, l'infestation est minimale (0,02 % to 0,41 %) en hiver (novembre-février) ; la température minimale se situait entre 10,64 °C et 24,31 °C, la température maximale entre 18,12 °C et 31,54 °C, l'humidité minimale de 38,35 % à 63,43 %, l'humidité maximale de 53,51 % à 79,83 % et la pluviométrie entre 0,05 mm et 1,24 mm. L'infestation augmente graduellement pendant l'été (mai) et l'infestation maximale (5,7 %) a été observée pendant la saison des pluies (août) ; température minimale de 26,34 °C et maximale de 31,85 °C, humidité minimale de 80,45 %, maximale de 96,23 % et pluviométrie allant de 4,75 mm à 5,62 mm.

L'infestation est minimale (0,008 % à 1,03 %) au 5e âge larvaire pendant l'hiver (novembre-février) ; température minimale allant de 11,05 °C à 17,82 °C, température maximale de 24,83 °C à 29,34 °C, humidité minimale de 40,62 % à 51,4 %, maximale de 67,51 % à 80,91 % et pluviométrie allant de 0,01 mm à 0,02 mm. L'infestation maximale (11,6 %) a été constatée en mai ; température minimale de 23,93 °C, température maximale de 36,31 °C, humidité minimale de 44,83 %, maximale de 88,7 % et pluviométrie allant de 2,03 mm à 3,92 mm.

Comme aux 4e et 5e âges larvaires, l'infestation est également minimale au stade cocon (0,067 % à 0,35 %) de novembre à février ; température minimale de 11,83 °C à 16,03 °C, température maximale de 25,71 °C à 29,27 °C, humidité minimale de 40,72 % à 54,6 %, humidité maximale de 68,04 % à 81,90 % et pluviométrie nulle. L'infestation est maximale en août (4,26 %), alors que la température minimale se maintient à 25,8 °C et la température maximale à 33,82 °C, l'humidité minimale à 83,54 % et l'humidité maximale à 96,51 %, la pluviométrie variant de 14,52 mm à 25,48 mm.

Afin de mesurer la relation entre l'infestation par la mouche uzi et les facteurs abiotiques on a calculé les coefficients de corrélation ; les données sont présentées dans le tableau I. Le taux d'infestation aux 4e et 5e âges larvaires et au stade cocon est vraisemblablement lié à la température, à l'humidité et à la pluviométrie à 1 %.

On a défini une équation de régression multiple afin de prévoir l'infestation par la mouche uzi au 4e et au 5e stades larvaires et au stade cocon en fonction des facteurs abiotiques ; les coefficients respectifs de détermination (R^2) sont présentés dans le tableau IIa. Le coefficient de détermination a été calculé pour atteindre 0,88 au 4e stade larvaire, 0,68 au 5e stade larvaire et 0,76 au stade cocon, ce qui démontre la prévisibilité de l'infestation par la mouche uzi en fonction des facteurs abiotiques. L'efficacité de cette équation montrée dans la tableau IIb fait apparaître une étroite relation entre les valeurs attendues et les valeurs observées au 4e et 5e stades larvaires et au stade cocon.

La perte de récolte due à l'infestation par la mouche uzi a été estimée pour 8 saisons différentes à partir d'un échantillonnage de groupes. Ces résultats (Tableau III) révèlent que la perte de récolte due à l'infestation par la mouche uzi varie de 0,06 % en novembre 1988 à 12,25 % en mai 1988.

DISCUSSION

Krishnaswami et coll. (1964) ont observé que l'infestation maximale (62,4 %) au 5e âge larvaire était obtenue en septembre, alors que nos travaux révèlent que l'infestation est maximale au 5e âge larvaire en mai.

L'étude de l'infestation par la mouche uzi en fonction des différentes saisons d'élevage commercial indique que l'infestation est très faible en hiver (novembre-décembre) et qu'elle augmente graduellement lorsque la température, l'humidité et la pluviométrie augmentent au cours des saisons suivantes. L'infestation maximale a été enregistrée pendant l'été et les saisons pluvieuses (mai à août). Nos observations indiquent clairement que l'accroissement de la perte de cocons à la récolte due à l'infestation par la mouche uzi dans le district de Malda est de 12,25 %, ce qui est nettement plus faible que la perte enregistrée par Krishnaswami et coll. (1964) et Murty et coll. (1988).

Les observations sur le terrain ont permis de démontrer que les éleveurs suivent une date de levée particulière à chaque zone commerciale et pour chaque saison. Si une levée est pratiquée avant cette

date précise, le taux d'infestation est nettement plus important. Ceci peut s'expliquer par le fait que la population uzi dans cette zone a un accès plus précoce à cette magnanerie. Le taux élevé d'infestation observé par Krishnaswami et coll. (1964) peut être attribué à cette raison.

L'équation de régression multiple visant à prévoir l'incidence de l'infestation uzi en fonction de différents facteurs abiotiques révèle que la valeur observée au 4e et 5e stades larvaires et au stade cocon se rapproche très étroitement de la valeur estimée. La température minimale, l'humidité minimale et maximale et la pluviométrie ont une forte influence sur l'infestation à ces stades. Pour le 5e âge larvaire, les valeurs estimées font apparaître une différence un peu plus importante par rapport aux valeurs observées. Parmi les facteurs abiotiques, seules les températures minimale et maximale semblent jouer un rôle significatif dans l'infestation au 5e âge larvaire.

ASSESSMENT OF GENERATION MEANS : A STUDY FROM *ANTHERAEA MYLITTA* D.

A.A. SIDDIQUI*, A.K. SENGUPTA, P.K. SRIVASTAV & A.K. GOEL

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

*The present study was undertaken to obtain information on gene effects controlling the shell weight and its components by analysing generation means in two crosses $GE_1 \times GF_3$ and $R_{57} \times L_8$ of **A. mylitta** D. The six-parameter model revealed the significance of additive ($\hat{d}$) and non-additive ($\hat{h}$) components for all the characters, viz. fecundity, hatching percentage, larval weight, cocoon weight, shell weight and silk ratio in both the crosses. The non-additive component was found to be larger than the additive for all the characters except for hatching percentage in $R_{57} \times L_8$ cross. From amongst the interaction parameters, generally all the three additive × additive ($\hat{i}$), additive × dominance ($\hat{j}$) and dominance × dominance ($\hat{l}$) components were found to be significant for fecundity, hatching percentage, larval weight and silk ratio in both crosses.*

The duplicate type of epistasis has been found to be in operation for all the characters under study in both crosses except for cocoon weight and silk ratio respectively in $R_{57} \times L_8$ and $GE_1 \times GF_3$. The heterosis as expected was not found to be significant for all the characters where the duplicate-type epistasis was found except for fecundity in $GE_1 \times GF_3$ cross.

Keywords : Generation mean, inheritance, epistasis, gene action, *Antheraea mylitta* D.

INTRODUCTION

Yield improvement is considered to be one of the major objectives of plant and animal breeding programme. Non availability of improved varieties in *A. mylitta* D., however, remained a major obstacle in the industry and, as a consequence, marked upsurge of silk production could not be achieved per unit area. Such an increase in output is possible only when the knowledge on gene action is acquired through selective breeding experiments followed by framing a proper breeding plan to exploit gene actions. We communicate in this paper the assessment of generation means of two cross combinations to elucidate the gene actions involved and to frame a future breeding plan.

MATERIALS AND METHODS

The experimental materials (*A. mylitta* D.) consisted of six populations including parents, (P1, P_2), back crosses (BC_1, BC_2), F_1 and F_2 generations of two crosses $R_{57} \times L_8$ and $GE_1 \times GF_3$. The experiment was laid out in a randomised block design with four replications during the commercial crop of 1987 at the farm of Central Tasar Research and Training Institute (Ranchi, India). Observations were recorded randomly in parents P1, P2, F_1, F_2, BC_1 and BC_2 respectively, for fecundity, hatching percentage, larval weight, cocoon weight, shell weight and silk ratio.

---

* Present address : Regional Muga Research Station, Boko - 781 123, Kamrup, Assam, India.

Parameters pertaining to the effect due to additive, dominant and epistatic gene actions and components of heterosis were estimated according to the method evolved by Hayman (1958) and Jinks and Jones (1958).

Heterosis in percentage over mid and better parent were calculated following the equations given below :

$$\text{Over mid parent (MP)} = \frac{\overline{F_1} - \overline{MP}}{\overline{MP}} \times 100 \; ; \qquad \text{Over better parent (BP)} = \frac{\overline{F_1} - \overline{BP}}{\overline{BP}} \times 1000$$

Where,
$\overline{F_1}$ = mean of F_1 generation,
$\overline{MP}$ = mean of the two parental values,
$\overline{BP}$ = mean of the better parent value.

χ^2 was computed following the equation of Singh and Chaudhary (1985) :

$$\chi^2 = (O - E) \times W$$

Where,
O = observed frequency,
E = expected frequency and
W = weight.

Following χ^2, the value of additive (d) and dominance (h) were tested to see the adequacy of the method.

RESULTS

Generation means :

The means of parents and the segregating generations of two crosses in respect of six characters are presented in Table I. The two parents involved in both crosses differed from each other for all the six characters. However, the differences between the parents GE_1 and GF_3 was less marked for hatching percentage, larval weight and cocoon weight.

The F_1 mean values for fecundity, larval weight and cocoon weight were higher than the mean values of better parent in $GE_1 \times GF_3$ cross, whereas the F_2 values for fecundity, larval weight, cocoon weight and shell weight were higher than the values of mid parent in $R_{57} \times L_8$ cross. The mean values of BC_1 for fecundity and silk ratio were higher than those of better parent values in $GE_1 \times GF_3$ cross. The mean values of F_2 and BC_2 for larval weight and those of F_1 and F_2 for cocoon weight were found to be higher than those of mid parent values in $R_{57} \times L_8$ cross. The mean values for silk ratio in F_2, BC_1 and BC_2 were found to be higher than those of better parent whereas the F_1 mean value for the same character was higher than that of the mid parent in $GE_1 \times GF_3$ cross. The F_2 mean value for silk ratio was higher than that of better parent in $R_{57} \times L_8$ cross.

Scaling tests :

The scaling tests were measured by calculating χ^2 values, testing their goodness of fit basing on joint scaling tests. The χ^2 values in both the crosses $GE_1 \times GF_3$ and $R_{57} \times L_8$ were found to be significant at 1 % level for all the six characters studied, which indicates that the model is adequate and there is nothing beyond additive and dominance interactions (Table II).

Gene effects :

Table II gives the significance of the estimates of additive ($\hat{d}$) and dominance ($\hat{h}$) effects based on a 3-parameter model for various characters of two crosses, $GE_1 \times GF_3$ and $R_{57} \times L_8$.

Table I. Showing the mean values of various characters in six generations of two crosses in *A. mylitta* D.

Tableau I. Valeurs moyennes de divers caractères sur six générations chez deux croisements d'*A. mylitta *D.

Crosses	Generations						Heterosis (%)	
	P_1	P_2	F_1	F_2	BC_1	BC_2	Over mid parent	Over better parent
Croisements	*Générations*						*Hétérosis (%)*	
	P_1	*P_2*	*F_1*	*F_2*	*BC_1*	*BC_2*	*Sur parent moyen*	*Sur parent meilleur*
Fecundity / *Fécondité* :								
$GE_1 \times GF_3$	323.75	273.25	331.00	268.25	324.75	288.50	10.88	2.23
$R_{57} \times L_8$	314.00	284.75	257.75	314.00	268.00	274.00	13.90	17.91
Hatching (%) / *Eclosion (%)* :								
$GE_1 \times GF_3$	57.82	59.44	50.96	49.60	49.10	56.43	13.08	14.26
$R_{57} \times L_8$	63.12	79.84	74.01	66.11	46.80	66.96	3.53	7.30
Larval weight / *Poids larvaire* :								
$GE_1 \times GF_3$	36.58	36.62	37.27	35.90	35.34	35.52	1.83	1.77
$R_{57} \times L_8$	37.35	34.26	34.69	36.62	35.07	36.17	3.10	7.12
Cocoon weight / *Poids du cocon* :								
$GE_1 \times GF_3$	13.04	13.13	13.17	12.46	13.03	12.47	0.68	0.30
$R_{57} \times L_8$	13.23	11.87	12.78	13.04	12.52	12.31	1.83	3.40
Shell weight / *Poids de la coque* :								
$GE_1 \times GF_3$	1.94	1.83	1.94	1.88	1.94	1.93	3.19	0.00
$R_{57} \times L_8$	2.07	1.75	1.86	2.06	1.90	1.87	2.61	10.14
Silk ratio (%) / *Richesse soyeuse (%)* :								
$GE_1 \times GF_3$	14.87	13.93	14.73	15.08	14.88	15.47	2.29	0.94
$R_{57} \times L_8$	15.64	14.74	14.55	15.79	15.17	15.19	4.21	6.96

The estimates of $(\hat{d})$ and $(\hat{h})$ given in Table II show that $(\hat{d})$ was significant for all the six characters in $GE_1 \times GF_3$ cross while in cross $R_{57} \times L_8$ $(\hat{d})$ was found to be significant for only three characters, viz., fecundity, larval weight and silk ratio. The estimate of $(\hat{h})$ was also found to be significant for all the characters except cocoon weight in $GE_1 \times GF_3$ cross. On the contrary, the estimates of $(\hat{h})$ for $R_{57} \times L_8$ cross were found to be significant for all the characters except shell weight. The results reveal

that the dominance component ($\hat{h}$) was higher than that of the additive ($\hat{d}$) component for all the characters in both crosses.

Table II. Showing components of generation means for different characters in two crosses in *A. mylitta* D.

Tableau II. Composantes des moyennes des générations pour différents caractères chez deux croisements d'*A. mylitta *D.

Crosses	Components of generation means			
	$\hat{m}$	$\hat{d}$	$\hat{h}$	χ^2
Croisements	*Composantes des moyennes des générations*			
	$\hat{m}$	$\hat{d}$	$\hat{h}$	χ^2
Fecundity / *Fécondité* :				
$GE_1 \times GF_3$	195.00**	25.24**	307.00**	248.43**
$R_{57} \times L_8$	471.37**	14.63**	- 415.87**	905.32**
Hatching (%) / *Eclosion (%)* :				
$GE_1 \times GF_3$	108.43**	- 8.36**	-134.79**	10.33**
$R_{57} \times L_8$	45.97**	- 0.81	- 149.35**	160.57**
Larval weight / *Poids larvaire* :				
$GE_1 \times GF_3$	48.43**	1.90**	- 14.77**	25.23**
$R_{57} \times L_8$	45.59**	0.93**	- 16.03**	26.41**
Cocoon weight / *Poids du cocon* :				
$GE_1 \times GF_3$	33.42**	0.90**	- 7.07	23.06**
$R_{57} \times L_8$	35.43**	- 0.15	- 14.11**	26.35**
Shell weight / *Poids de la coque* :				
$GE_1 \times GF_3$	2.90**	0.22*	- 1.96*	7.77**
$R_{57} \times L_8$	1.91**	0.15	1.02	3.66**
Silk ratio (%) / *Richesse soyeuse (%)* :				
$GE_1 \times GF_3$	12.52**	0.39*	36.03**	36.20**
$R_{57} \times L_8$	16.11**	0.55**	3.51*	47.53**

Estimates of gene effects and χ^2 values for the test of adequacy of the additive dominance model.
Estimations des effets géniques et des valeurs de χ^2 pour le test d' adéquation du modèle de dominance additive.
* Significant at 5 % level / *Significatif au seuil de 5 %.*
** Significant at 1 % level / *Significatif au seuil de 1 %.*

The results obtained through 3-parameter model were further confirmed by a 6-parameter model (Table III). The characterwise analysis was as follows :

Fecundity :

All the five components of generation means, viz. $(\hat{d})$, $(\hat{h})$, $(\hat{i})$, $(\hat{j})$, $(\hat{l})$, were found to be significant. Out of all the three epistasis additive × additive $(\hat{i})$, additive × dominant $(\hat{j})$ and dominant × dominant $(\hat{l})$ interactions were found to be predominant. In both crosses, epistasis was found to be of duplicate type since $(\hat{h})$ and $(\hat{l})$ bore opposite signs.

Hatching percentage :

Like fecundity, all the five components of generation means were found to be significant, and dominant × dominant epistatic $(\hat{l})$ predominated over others. The type of epistasis was found to be of duplicate type.

Larval weight :

All the five components of generation means except $(\hat{d})$ were found to be significant and the $(\hat{i})$predominated over other gene interactions in $GE_1 \times GF_3$ cross. On the contrary, in $R_{57} \times L_8$ cross, except $(\hat{i})$ all the other components of generation means were significant and the $(\hat{l})$ was found to predominate over the other gene interactions. The epistasis is of duplicate type in both crosses.

Cocoon weight :

Only $(\hat{h})$ and $(\hat{i})$ were found to be significant and additive × additive $(\hat{i})$ interaction predominated over the other gene interactions in $GE_1 \times GF_3$ cross. In $R_{57} \times L_8$ cross, $(\hat{d})$, $(\hat{h})$ and $(\hat{i})$ were found to be significant, and dominant × dominant $(\hat{l})$ gene interaction was predominant. The epistasis was found to be of duplicate and complementary type in the first and second cross, respectively.

Shell weight :

$(\hat{h})$, $(\hat{d})$ and $(\hat{l})$ were found to be significant and $(\hat{l})$ was predominant over the other interactions in $GE_1 \times GF_3$ cross. On the contrary, the $(\hat{d})$ and $(\hat{h})$ components were found to be significant and $(\hat{i})$ predominated over the other gene interactions in $R_{57} \times L_8$. The epistasis was found to be of duplicate type in both crosses.

Silk ratio :

In both crosses, all the components of generation means, were found to be significant except $(\hat{j})$ and the $(\hat{l})$ predominated over the other gene interactions. The epistasis was of duplicate type in both crosses.

DISCUSSION

The genetical analysis of the two crosses showed that their parents were genetically diverse for all the six characters. The genetic architecture of the two crosses, however, differed from each other for all the six characters.

Mather and Jinks (1971) have already defined and discussed in detail the genetic parameters, $(\hat{d})$ and $(\hat{h})$ and their interactions, like $(\hat{i})$, $(\hat{j})$ and $(\hat{l})$. The majority of the interaction parameters, particularly $(\hat{i})$ and $(\hat{l})$ reinforce the effect of dominance in the complementary type of interaction while in the duplicate type of interaction they oppose the effect of dominance components. Jinks and Jones (1958) suggested that the heterosis may not be observed at all in crosses showing a duplicate type of interaction, whereas in the crosses involving the complementary type of interaction the heterosis is likely to be expressed with greater magnitude. Other types of interactions like dominance and recessive epistasis have been grouped under two types, already mentioned above, by imposing further limitations. The relative sign of additive $(\hat{d})$ and dominant $(\hat{h})$ gene effects and additive × additive $(\hat{i})$, additive × dominance $(\hat{j})$ and dominance × dominance $(\hat{l})$ gene interactions have been

found to be less important than the magnitude of these gene actions and their interactions under the present study.

Table III. Showing components of generation means for different characters in two crosses in *A. mylitta* D.

Tableau III. Composantes des moyennes des générations pour différents caractères chez deux croisements d'*A. mylitta *D.

Crosses	Components of generation means						Type of epistasis
	$\hat{m}$	$\hat{d}$	$\hat{h}$	$\hat{i}$	$\hat{j}$	$\hat{l}$	
Croisements	*Composantes des moyennes des générations*						*Type d'épistasie*
	$\hat{m}$	$\hat{d}$	$\hat{h}$	$\hat{i}$	$\hat{j}$	$\hat{l}$	
Fecundity / *Fécondité* :							
$GE_1 \times GF_3$	268.25**	36.25**	186.01**	153.50**	11.00**	- 783.01	D
$R_{57} \times L_8$	314.00**	16.00**	- 213.62**	- 172.00**	- 20.63**	202.25**	D
Hatching (%) / *Eclosion (%)* :							
$GE_1 \times GF_3$	66.11**	- 20.16**	- 34.40**	-36.93**	- 11.81**	100.39**	D
$R_{57} \times L_8$	49.60**	- 7.33**	4.99*	12.66*	- 6.32**	- 116.30**	D
Larval weight / *Poids larvaire* :							
$GE_1 \times GF_3$	42.44**	- 0.59	- 9.19**	- 7.94**	- 2.49**	5.58*	D
$R_{57} \times L_8$	40.75**	0.45*	- 3.33*	- 4.18	0.21*	12.70*	D
Cocoon weight / *Poids du cocon* :							
$GE_1 \times GF_3$	14.49**	0.34	- 2.67*	- 1.64*	- 0.72	0.70	D
$R_{57} \times L_8$	13.81**	1.01*	1.14*	1.38*	0.71	2.16	C
Shell weight / *Poids de la coque* :							
$GE_1 \times GF_3$	2.17**	0.09*	- 0.96*	- 0.86	- 0.13	1.00*	D
$R_{57} \times L_8$	1.89**	0.06*	0.55*	0.44	0.05	- 0.46	D
Silk ratio (%) / *Richesse soyeuse (%)* :							
$GE_1 \times GF_3$	16.83**	- 0.38*	- 0.64*	0.60*	0.93	- 4.15**	C
$R_{57} \times L_8$	12.21**	- 0.56*	17.24**	17.04**	- 1.10	- 18.79**	D

D : Duplicate / *Double.*
C : Complementary / *Complémentaire.*
* Significant at p = 0.05 / *Significatif pour p = 0,05.*
** Significant at p = 0.01 / *Significatif pour p = 0,01.*

The six-parameter model revealed the significance of additive ($\hat{d}$) and non-additive ($\hat{h}$) components for all the characters in both crosses except for larval and cocoon weights in $GE_1 \times GF_3$. The non-additive component ($\hat{h}$) was found to be larger than the additive ($\hat{d}$) component except for hatching percentage in $R_{57} \times L_8$. From amongst the interaction parameters, generally the three ($\hat{i}$), ($\hat{j}$) and ($\hat{l}$) components were found significant for fecundity, hatching percentage, larval weight and silk ratio in both the crosses. The ($\hat{j}$) was found to be insignificant for cocoon weight, shell weight and silk ratio in both crosses, while insignificant ($\hat{l}$) was noticed for cocoon weight only in both crosses.

Following the terminology of Jinks and Jones (1958), the duplicate type of epistasis has been found to be operating for all the characters in both crosses except for cocoon weight and silk ratio in $R_{57} \times L_8$ and $GE_1 \times GF_3$ crosses, respectively, because ($\hat{h}$) and ($\hat{l}$) had opposite signs. The heterosis, as expected, was not found to be significant for all the characters where a duplicate type of epistasis was in operation except for fecundity in $GE_1 \times GF_3$ cross where heterosis was found to be significant at 5 % level over mid parent since the value of ($\hat{h}$) was higher than those of ($\hat{d}$) and ($\hat{i}$). The heterosis was found to be non-significant for cocoon weight and silk ratio respectively in $R_{57} \times L_8$ and $GE_1 \times GF_3$ where a complementary type of epistasis was found because the value of ($\hat{h}$) was not sufficiently high to counterbalance the values of ($\hat{d}$) and ($\hat{i}$) (Gupta and Khanna, 1982).

The foregoing discussion clearly demonstrates that in spite of predominant dominant gene effects in the present study, all the three types of gene actions, i.e. additive, dominance, and epistasis, played a significant role in determining the shell weight and its component characters in both crosses necessitate the framing of a breeding methodology which would best utilise all these three types of gene effects. The most appropriate breeding strategy selection procedure for such instances is heterosis breeding or reciprocal recurrent selection.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the Director, Central Tasar Research and Training Institute (Ranchi, India), for providing necessary facilities.

REFERENCES

GUPTA K.K, KHANNA K.R. (1982) Gene action and heterosis for oil yield and component characters in sunflower. Indian J. Genet., 42, 265-271.

HAYMAN B.I. (1958) The separation of epistatic from additive and dominance variation in generation means. Heredity, 12, 370-390.

JINKS J.L., JONES, R.M. (1958) Estimation of components of heterosis. Genetics, 43, 223-234.

MATHER K., JINKS J.L. (1971) Biometrical Genetics, Chapman & Hall Ltd., London.

SINGH R.K., CHAUDHARY B.D. (1985) Biometrical methods in quantitative genetic analysis. Kalyani Publishers, New Delhi.

EVALUATION DES VALEURS MOYENNES DANS DIVERSES GENERATIONS : ETUDE SUR *ANTHERAEA MYLITTA* D.

A.A.. SIDDIQUI* , A.K. SENGUPTA, P.K. SRIVASTAV & A.K. GOEL

Central Tasar Research and Training Institute, Piska Nagri, Ranchi - 835 303, Inde.

*Cette étude a été entreprise afin d'obtenir des renseignements sur les effets des gènes gouvernant le poids de la coque et ses composants par analyse des moyennes de plusieurs générations chez deux croisements d'***Antheraea mylitta** *D., $GE_1 \times GF_3$ et $R_{57} \times L_8$. Le modèle à six paramètres révèle que les composants additifs ($\hat{d}$) et non additifs ($\hat{h}$) sont significatifs pour tous les caractères, à savoir : la fécondité, le pourcentage d'éclosion, le poids larvaire, le poids du cocon, le poids de la coque et la richesse soyeuse, chez les deux croisements. Le composant non additif est plus grand que le composant additif pour tous les caractères sauf pour le pourcentage d'éclosion chez le croisement $R_{57} \times L_8$. Parmi les différents paramètres d'interaction, les trois composants additif × additif ($\hat{i}$), additif × dominance ($\hat{j}$) et dominance × dominance ($\hat{l}$) sont généralement significatifs pour la fécondité, le pourcentage d'éclosion, le poids larvaire et la richesse soyeuse chez les deux croisements.*

L'épistasie de type double fonctionne pour tous les caractères étudiés chez les deux croisements, sauf pour le poids du cocon chez $R_{57} \times L_8$ et pour la richesse soyeuse chez $GE_1 \times GF_3$. Comme nous le pensions, l'hétérosis se révèle non significative pour tous les caractères présentant une épistasie de type double, sauf pour la fécondité chez le croisement $GE_1 \times GF_3$.

INTRODUCTION

L'amélioration du rendement est considérée comme l'un des principaux objectifs dans les programmes de sélections animale et végétale. L'absence de variétés améliorées d'*Antheraea mylitta* D. constitue cependant un obstacle majeur à une progression marquée de la production séricicole par unité de surface. Une telle augmentation de la production n'est possible que par l'acquisition de connaissances sur les actions des gènes au cours d'expériences de sélection permettant la mise au point d'un plan de sélection adapté pour exploiter les actions des gènes. Nous présentons, dans cet article, l'évaluation des moyennes de plusieurs générations de deux combinaisons de croisement afin d'élucider les actions des gènes impliqués et de mettre au point un plan de sélection.

MATERIELS ET METHODES

Les matériels expérimentaux (*A. mylitta* D.) sont composées de six populations : les parents (P_1, P_2), les croisements de retour (BC_1, BC_2) et les générations F_1 et F_2 des deux croisements $R_{57} \times L_8$ et $GE_1 \times GF_3$. L'expérience a été réalisée selon la méthode des blocs aléatoires avec quatre réplicats au cours de la récolte commerciale de 1987 à la ferme du Central Tasar Research and Training Institute de Piska Nagri (Ranchi, Inde). Les observations portant sur la fécondité, le pourcentage d'éclosion, le poids larvaire, le poids du cocon, le poids de la coque et la richesse soyeuse ont été relevées de manière aléatoire chez les parents P_1, P_2, F_1, F_2, BC_1 et BC_2.

*Adresse actuelle : Regional Muga Research Station, Boko - 781 123, Kamrup, Assam, Inde.

Les paramètres concernant l'effet dû aux actions actions des gènes additifs, dominants et épistatiques et les composants de l'hétérosis ont été évalués selon la méthode mise au point par Hayman (1958) et Jinks et Jones (1958).

L'hétérosis sur le meilleur parent et le parent moyen a été calculée d'après les équations suivantes :

$$\text{Sur parent moyen (MP)} = \frac{\overline{F_1} - \overline{MP}}{\overline{MP}} \times 100 \; ; \qquad \text{Sur meilleur parent (BP)} = \frac{\overline{F_1} - \overline{BP}}{\overline{BP}} \times 1000$$

où :
$\overline{F_1}$ = moyenne de la génération F_1,
$\overline{MP}$ = moyenne des deux valeurs parentales,
$\overline{BP}$ = moyenne de la valeur du meilleur parent.

Le χ^2 a été déterminé d'après l'équation de Singh et Chaudhary (1985) :

$$\chi^2 = (O - E) \times W$$

où :
O = fréquence observée,
E = fréquence attendue,
W = poids.

Les valeurs de l'additivité ($\hat{d}$) et de la dominance ($\hat{h}$) ont été testés d'après le χ^2 afin de vérifier la justesse de cette méthode.

RESULTATS

Moyennes des générations :

Les moyennes des parents et des générations ségrégantes des deux croisements pour six caractères sont présentées dans le tableau I. Les deux parents utilisés dans les deux croisements diffèrent pour les six caractères. Cependant, les différences entre les parents GE_1 et GF_3 sont moins marquées pour le pourcentage d'éclosion, le poids larvaire et le poids de la coque.

Les valeurs moyennes en F_1 pour la fécondité, le poids larvaire et le poids du cocon sont supérieures à celles obtenues pour le meilleur parent chez le croisement $GE_1 \times GF_3$, alors que les valeurs en F_2 pour la fécondité, le poids larvaire, le poids du cocon et le poids de la coque sont supérieures à celles du parent moyen chez le croisement $R_{57} \times L_8$. Les valeurs moyennes en BC_1 pour la fécondité et la richesse soyeuse sont supérieures à celles du meilleur parent chez le croisement $GE_1 \times GF_3$. Les valeurs moyennes en F_2 et en BC_2 pour le poids larvaire et celles de F_1 et F_2 pour le poids du cocon sont supérieures à celles du parent moyen chez le croisement $R_{57} \times L_8$. Les valeurs moyennes pour la richesse soyeuse en F_2, BC_1 et BC_2 sont supérieures à celles du parent moyen, alors que la valeur moyenne en F_1 pour ce même caractère est supérieure à celle du parent moyen chez le croisement $GE_1 \times GF_3$. La valeur moyenne en F_2 pour la richesse soyeuse est supérieure à celle du meilleur parent chez le croisement $R_{57} \times L_8$.

Tests de graduation :

Les tests de graduation ont été réalisés en calculant les valeurs χ^2 permettant de vérifier leur justesse sur la base de tests de graduation couplés. Les valeurs χ^2 chez les deux croisements $GE_1 \times GF_3$ et $R_{57} \times L_8$ sont significatives au seuil de 1 % pour les six caractères étudiés, ce qui indique que ce modèle est juste et qu'il n'y a rien au-delà des interactions additivité-dominance (Table II).

Effets des gènes :

Le tableau II donne la signification des estimations des effets d'additivité ($\hat{d}$) et de dominance ($\hat{h}$) sur la base d'un modèle à trois paramètres pour différents caractères chez les deux croisements $GE_1 \times GF_3$ et $R_{57} \times L_8$.

Les estimations de ($\hat{d}$) et ($\hat{h}$) données dans le tableau II montrent que ($\hat{d}$) est significatif pour les six caractères chez le croisement $GE_1 \times GF_3$ mais qu'il n'est significatif que pour trois caractères, la fécondité, le poids larvaire et la richesse soyeuse, chez le croisement $R_{57} \times L_8$. L'estimation de ($\hat{h}$) est également significative pour tous les caractères sauf le poids du cocon chez le croisement $GE_1 \times GF_3$. Par contre, les estimations de ($\hat{h}$) pour le croisement $R_{57} \times L_8$ sont significatives pour tous les caractères sauf le poids de la coque. Les résultats révèlent que le composant dominant ($\hat{h}$) est supérieur au composant additif ($\hat{d}$) pour tous les caractères chez les deux croisements.

Les résultats obtenus à l'aide du modèle à trois paramètres ont été confirmés d'après un modèle à six paramètre (Tableau III). Ils sont présentés ci-après en fonction des caractères.

Fécondité :

Les cinq composants des moyennes des générations, ($\hat{d}$), ($\hat{h}$), ($\hat{i}$), ($\hat{j}$), ($\hat{l}$), sont tous significatifs. Sur les trois épistasies, les interactions additif × additif ($\hat{i}$), additif × dominant ($\hat{j}$) et dominant × dominant ($\hat{l}$) sont prédominantes. Chez les deux croisements, l'épistasie est de type double puisque ($\hat{h}$) et ($\hat{l}$) sont de signes opposés.

Pourcentage d'éclosion :

Comme pour la fécondité, les cinq composants des moyennes des générations sont significatifs et l'interaction épistatique dominant × dominant ($\hat{l}$) est supérieure aux autres. Cette épistasie est de type double.

Poids larvaire :

Les cinq composants des moyennes des générations, sauf ($\hat{d}$), sont significatifs et ($\hat{i}$) prédomine chez $GE_1 \times GF_3$. Au contraire, les composants ($\hat{d}$) et ($\hat{h}$) sont significatifs et ($\hat{l}$) est supérieure aux autres interactions génétiques chez $R_{57} \times L_8$. L'épistasie est de type double chez les deux croisements.

Poids du cocon :

Seuls ($\hat{h}$) et ($\hat{i}$) sont significatifs et l'interaction additif × additif ($\hat{i}$) est supérieure aux autres interactions génétiques chez $GE_1 \times GF_3$. Chez $R_{57} \times L_8$, ($\hat{d}$), ($\hat{h}$) et ($\hat{i}$) sont significatifs et l'interaction génétique dominant × dominant ($\hat{l}$) prédomine. L'épistasie est double chez le premier croisement et de type complémentaire chez le deuxième croisement.

Poids de la coque :

($\hat{h}$), ($\hat{d}$) et ($\hat{l}$) sont significatifs et ($\hat{l}$) prédomine par rapport aux autres interactions chez $GE_1 \times GF_3$. Au contraire, les composants ($\hat{d}$) et ($\hat{h}$) sont significatifs et ($\hat{l}$) prédomine par rapport aux autres interactions génétiques chez $R_{57} \times L_8$. L'épistasie est de type double chez les deux croisements.

Richesse soyeuse :

Chez les deux croisements, tous les composants des moyennes des générations sont significatifs, sauf ($\hat{j}$), et ($\hat{l}$) prédomine par rapport aux autres interactions génétiques. L'épistasie est de type double chez les deux croisements.

DISCUSSION

L'analyse génétique des deux croisements montre que leurs parents sont génétiquement différents pour les six caractères. La structure génétique diffère entre les deux croisements pour les six caractères.

Mather et Jinks (1971) ont déjà défini et discuté en détail les paramètres génétiques $\hat{(d)}$ et $\hat{(h)}$ et leurs interactions $\hat{(i)}$, $\hat{(j)}$ et $\hat{(l)}$. La majorité des paramètres d'interaction, en particulier $\hat{(i)}$ et $\hat{(l)}$, accentue l'effet de dominance pour l'interaction de type complémentaire tandis que, pour l'interaction de type double, ces paramètres s'opposent à l'effet des composants de dominance. Jinks et Jones (1958) ont suggéré que l'hétérosis ne pouvait pas être observée chez les croisements présentant une interaction de type double mais qu'elle s'exprimait sur une plus grande amplitude chez les croisements impliquant une interaction de type complémentaire. D'autres types d'interaction, comme les épistasies dominante et récessive, ont été regroupés selon les deux catégories mentionnées ci-dessus en imposant des restrictions supplémentaires. Dans cette étude, le signe relatif des effets génétiques additif $\hat{(d)}$ et dominant $\hat{(h)}$ et les interactions génétiques additif × additif $\hat{(i)}$, additif × dominant $\hat{(j)}$ et dominant × dominant $\hat{(l)}$ sont moins importants que l'amplitude de ces actions génétiques et que leurs interactions.

Le modèle à six paramètres révèle que les composants additif $\hat{(d)}$ et non additif $\hat{(h)}$ sont significatifs pour tous les caractères chez les deux croisements, sauf pour le poids larvaire et le poids du cocon chez $GE_1 \times GF_3$. Le composant non additif $\hat{(h)}$ est plus grand que le composant additif $\hat{(d)}$ sauf pour le pourcentage d'éclosion chez $R_{57} \times L_8$. Pour ce qui concerne les paramètres d'interaction, les composants $\hat{(i)}$, $\hat{(j)}$ et $\hat{(l)}$ sont généralement significatifs pour la fécondité, le pourcentage d'éclosion, le poids larvaire et la richesse soyeuse chez les deux croisements. $\hat{(j)}$ est non significatif pour le poid du cocon, le poids de la coque et la richesse soyeuse chez les deux croisements et $\hat{(l)}$ est non significatif uniquement pour le poids du cocon chez les deux croisements.

D'après la terminologie de Jinks et Jones (1958), l'épistasie de type double fonctionne pour tous les caractères chez les deux croisements, sauf pour le poids du cocon chez $R_{57} \times L_8$ et pour la richesse soyeuse chez $GE_1 \times GF_3$, car $\hat{(h)}$ et $\hat{(l)}$ sont de signes opposés. Comme on le pensait, l'hétérosis n'est pas significative pour tous les caractères présentant une épistasie de type double, sauf pour la fécondité chez $GE_1 \times GF_3$ où l'hétérosis est sig.nificative au seuil de 5 % sur le parent moyen puisque la valeur de $\hat{(h)}$ est supérieure à celles de $\hat{(d)}$ et de $\hat{(i)}$. L'hétérosis est non significative pour le poids du cocon chez $R_{57} \times L_8$ et la richesse soyeuse chez $GE_1 \times GF_3$, qui présentent une épistasie de type complémentaire car la valeur de $\hat{(h)}$ n'est pas assez forte pour contrebalancer les valeurs de $\hat{(d)}$ et de $\hat{(i)}$ (Gupta et Khanna, 1982).

La discussion qui précède montre clairement que, malgré la prédominance des effets des gènes dominants démontrée dans cette étude, les trois types d'interactions génétiques, c'est-à-dire : additif, dominant et épistatique, jouent un rôle significatif dans la détermination du poids de la coque et des caractères de ses composants chez les deux croisements, ce qui nécessite l'élaboration d'une méthodologie de sélection optimisant l'utilisation des trois types d'effets génétiques. La procédure de sélection la plus adaptée à de tels cas est la sélection de l'hétérosis ou la sélection récurrente réciproque.

PLANT REGENERATION AND SEEDLESS FRUIT FORMATION IN NODAL EXPLANT CULTURES OF *MORUS ALBA* L. CV. S_1

A. ZAMAN*, R. ISLAM, M. HOSSAIN**, M.A. BARI* & O.I. JOARDER****

* Bangladesh Sericulture Research and Training Institute, Rajshahi, Bangladesh.

** Department of Botany, University of Rajshahi, Rajshahi - 6205, Bangladesh.

*Nodal explants of **Morus alba** L. cv. S_1 were cultured on MS medium and induced to form multiple shoots when supplemented with 1 mg/l BA or Kn. Rooting was induced on in vitro proliferated shoots by culturing in half strength MS medium supplemented with 0.5 mg/l IBA. The regenerants were successfully transferred to pots and later to the outdoor conditions. During proliferation of shoots the explant produced seedless fruits. Adenine sulphate showed beneficial effects on the formation of flowers. Higher concentration of sucrose inhibited flower formation. Frequency of flower formation could be increased upon substitution of the nitrates of MS medium with that of Blaydes medium.*

Keywords : Mulberry explant, multiple shoot proliferation, seedless fruit formation.

INTRODUCTION

The mulberry is a rapid growing woody plant of well-known economic importance in the silk industry. The plant is usually heterozygous due to its cross pollination habit (Das, 1983). *In vitro* culture of mulberry using various explants, e.g. shoot apices, nodal buds, leaf, cotyledon and hypocotyl, has given successful results to provide multiple shoots and afterwards plantlets as well (Oka and Ohyama, 1986, 1987 ; Kim *et al.*, 1985 ; Jain *et al.*, 1990 ; Hossain *et al.*, 1991). Some species of mulberry are grown for their edible fruits and useful timber (Patel *et al.*, 1983). Mulberry fruits are rich in vitamins A, B_1, B_2 and C (Kabir, 1989). Generally mulberry fruits are about 1-3 cm long with a sweet taste. In spite of rich nutritional value, these fruits are difficult to chew due to the presence of huge seeds. Delicious jelly is prepared from mulberry fruits but its preparation is interrupted due to the seeds within the fruit. The present work was intended to investigate on the induction of multiple shoots from nodal explants of mulberry and to experience on the formation of seedless fruits through parthenocarpic development.

MATERIALS AND METHODS

Developing juvenile twigs of winter sprouts were collected from a 10-year-old dioecious (female) tree of *Morus alba* L. cv. S_1. After trimming of the larger leaves, the materials were cut into pieces (2-3 cm) each containing a single node and were surface disinfected with $HgCl_2$ (0.1 % w/v) for 10 minutes, followed by 6-7 rinses in sterile distilled water.

The nodal explants were cultured singly in 25 × 150 mm tubes capped with cotton plugs each containing 15 ml of MS (Murashige and Skoog, 1962) medium. The explants with proliferating shoot masses were transferred to 250 ml flasks each containing 50 ml of medium to meet the increasing requirement of nutrient and space. The medium was supplemented with different combinations of

cytokinins : benzyladenine (BA), kinetin (Kn), and adenine sulphate (Ads) ; auxins : naphthaleneacetic acid (NAA), indoleacetic acid (IAA) and gibberellic acid (GA_3).

For adventitious rooting microcuttings of at least 3 cm long from *in vitro* grown shoots were transferred to half-strength (both major and minor salts) MS medium without any growth-regulator or with one of the treatments : 0.1, 0.5 or 1.0 mg/l indolebutyric acid (IBA) or NAA.

All media were gelled with 0.7 % Difco bacto-agar and supplemented with 30 g/l sucrose for shoot proliferation and 15 g/l sucrose for root induction. Media pH values were adjusted to 5.6 prior to autoclaving at 120 °C under 1.1 kg cm^2 pressure for 20 minutes. All cultures were maintained in a culture room at 26 ± 1 °C at a relative humidity of 55-60 % with a 16 h photoperiod at photon flux density of 50-60 μ $Em^{-2}s^{-1}$ from warm white fluorescent tubes.

There were 15 explants used per treatment for shoot and inflorescence proliferation and 10-15 explants per treatment for root formation. The data on percent explants showing shoot and inflorescence proliferation, number of shoots and number of inflorescence per explant were recorded after 10 weeks of culture initiation. The data on rooting behaviour (percentage of rooted shoots and number of roots per shoot) were scored after 6 weeks of culture in rooting media. All experiments were repeated twice.

RESULTS AND DISCUSSION

Shoot proliferation and plantlet regeneration :

Shoot proliferation from nodal explants started following 2-3 weeks of lag period. The percentage of surviving explants was 41-89 % depending upon the combination of growth hormones (Table I). Media containing cytokinin showed satisfactory results for shoot proliferation. Addition of auxin suppressed proliferation and growth of shoots. The number of shoots produced per explant varied greatly (1-9) among the cultures. Among the three cytokinins used BA alone produced a good number of shoots per explant and the superiority of BA over other cytokinins for multiple shoot proliferation in mulberry has also been reported (Oka and Ohyama, 1987 ; Hossain *et al.*, 1991, 1992 ; Ivanicka, 1987 ; Yadav *et al.*, 1990). But when BA and Kn added together in the medium (each 1.0 mg/l) maximum number of shoots (9.61) were proliferated probably because of synergistic activities of BA and Kn (Table I, Fig. 1).

From *in vitro* formed shoot clumps individual shoots were carefully excised and transferred to the rooting medium after trimming the basal leaves. In most cases root initiation started within 2 weeks of culture. The shoots which failed to produce roots in this period were unable to produce roots even after 5 weeks of culture. Although 29.6 % of the shoots rooted on hormone-free MS medium, the time taken for the appearance of roots exceeded 3 weeks and the roots produced were thin. However, no significant difference was observed in the number of roots per shoot between NAA-supplemented media and hormone-free media (Table II). The presence of IBA in the MS medium improved the rooting percentage, root quality and also the number of roots per shoot. The maximum frequency (88.2) of shoots produced roots and highest number (11.6) of roots were recorded in the medium containing 0.5 mg/l IBA. Increase or decrease in this concentration significantly reduced the frequency of rooting although variation between the number of roots between 0.1 mg/l IBA and 0.5 mg/l IBA was insignificant.

It has been observed that the plantlets obtained from IBA-supplemented media were healthier (after 6 weeks of culture) than those either from NAA-supplemented media or auxin-free media. The plantlets from IBA-supplemented media were, therefore, used for transfer to the soil in this experiment. The plantlets after thorough washing to remove any remains of medium were planted in small pots with 1:1 non-sterile garden soil and compost. In the first week of transfer, the potted plantlets were covered with glass beakers to maintain high humidity. Within 2-3 weeks, about 90 % of the potted plants began to form new leaves and resumed new growth. No variation was observed among the plantlets taken from three different concentrations of IBA with regard to establishment in the soil. The plantlets were subsequently transferred to larger pots and gradually acclimatized to outdoor conditions.

Table I. Morphogenetic response of nodal explants of *M. alba* cv S_1*.

Tableau I. Réponse morphogénétique des explants nodaux chez la variété S_1 de M. alba*.

Growth regulators (mg/l) *Régulateurs de croissance (mg/l)*	% of explants produced shoots *Pourcentage d'explants produisant les pousses*	Number of shoots per explant *Nombre de pousses par explant*	% of explants produced inflorescences *Pourcentage d'explants produisant des inflorescences*	Number of inflorescences per culture *Nombre d'inflorescences par culture*
BA 1.0	84.7	3.56	29.1	2.16
Kn 1.0	61.3	3.03	20.1	1.26
Ads 50	39.4	1.01	37.2	1.39
BA 1.0 + Kn 1.0	89.9	9.61	31.3	2.33
BA 1.0 + Ads 50	73.7	4.11	59.9	6.14
Kn 1.0 + Ads 50	57.9	2.07	51.3	5.03
BA 1.0 + GA_3 0.5	51.6	2.13	-	-
Kn 1.0 + GA_3 0.5	46.3	1.27	-	-
BA 1.0 + NAA 0.1	39.9	1.73	-	-
BA 1.0 + IAA 0.1	59.3	1.69	13.9	1.10
Kn 1.0 + NAA 0.1	37.1	1.03	-	-
Kn 1.0 + IAA 0.1	41.2	1.19	14.2	1.90
Ads 50 + NAA 0.1	31.1	1.01	-	-
Ads 50 + IAA 0.1	33.6	1.00	42.5	1.70
Ads 50 + GA_3 0.5	27.1	1.00	-	-

* Data recorded after 10 weeks of culture initiation (5 weeks of subculture).
* *Données relevées 10 semaines après la mise en culture (après 5 semaines de sous-culture).*

Fig. 1 : Multiple shoot proliferation in MS medium supplemented with BA and Kn in conjunction (each 1.0 mg/l), after 8 weeks of culture initiation.

Bar = 0.8 cm.

Fig. 1 : Prolifération multiple des pousses dans un milieu MS additionné d'une combinaison de BA et de Kn (1,0 mg/l chacun) 8 semaines après la mise en culture.

Echelle du trait = 0,8 cm.

Table II. Effects of auxins on rooting of mulberry microshoots *in vitro* after 6 weeks*.

Tableau II. Effets des auxines sur le racinement des micropousses de mûrier* in vitro *après 6 semaines*.

Auxin treatment *Traitement aux auxines*	Rooted shoots (%) *Pousses racinées (%)*	Mean number of roots per shoot *Nombre moyen de racines par pousse*
IBA 0.1	67.6^{b}	10.0^{a}
IBA 0.5	88.2^{a}	11.6^{a}
IBA 1.0	45.5^{d}	7.2^{b}
NAA 0.1	64.2^{b}	4.0^{c}
NAA 0.5	57.0^{bc}	5.2^{bc}
NAA 1.0	50.3^{cd}	5.0^{bc}
Without auxin *Sans auxines*	29.6^{e}	4.5^{bc}

* Mean sepration in columns by Duncan's Multiple Range Test, 1 % level.
* *Séparation moyenne en colonnes selon le test multidimensionnel de Duncan, seuil de 1 %.*

Inflorescence and fruit formation :

All the three cytokinins independently and in combinations with IAA produced inflorescence in the axils of the developing microshoots within 3-4 weeks of culture. The percentage of explant-produced inflorescences and the number of inflorescences per explant varied greatly. Formation of inflorescence on cultured explants by Ads alone was not satisfactory. However, when Ads and BA or Kn were added in combination, the percentage of explant produced inflorescences and number of inflorescences per explant increased considerably. The maximum response was observed when BA and Ads were combined together (Fig. 2). This indicates that the two cytokinins Ads and BA or Ads and Kn act synergistically as shown by BA and Kn in case of shoot proliferation. It is also evident from the results that there was a negative association between the number of inflorescences and number of shoots. The growth regulators GA_3 and NAA had no effect and consequently inhibited the proliferation of inflorescence. Narasimhulu and Reddy (1984) reported that IAA and NAA at low concentration in combination with cytokinins exerted a positive influence on flowering of groundnut but failed to induce flower buds in independent treatments. In the mulberry, even at lower concentration of NAA in conjunction with cytokinin failed to initiate inflorescence. Patel *et al.* (1983) observed male and female inflorescence in axillary bud cultures of mulberry on MS medium containing IBA and Kn (1 mg/l each).

The inflorescence developed into fruits within 3-4 weeks of initiation. Young fruits were green in colour and became dark violet when they were ripe. The size and weight of the ripen fruits were approximately double than those of field-grown mature plants from which explants were collected (Fig. 3). The weight of fruits obtained from *in vitro* grown cultures ranged from 1.5-2.0 g and each culture (a 250 ml conical flask) contained 5-6 ripen fruits.

The mineral formulation of the medium seems to play an important role in the expression of flower bud primordia. Upon substitution of the nitrates of the MS medium with that of Blaydes (1966) medium, the frequency of flower formation increased by 15 %. Similar results have been reported by Narasimhulu and Reddy (1984) in *Arachis hypogaea*.

Fig. 2 : Development of inflorescences in MS medium supplemented with BA 1.0 + Ads 50 mg/l, after 8 weeks of culture initiation.

Bar = 0.8 cm.

Fig. 2 : Développement des inflorescences dans un milieu MS additionné de BA 1,0 + Ads 50 mg/l 8 semaines après la mise en culture.

Echelle du trait = 0,8 cm.

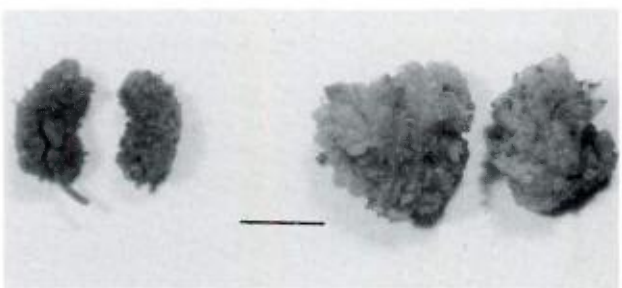

Fig. 3 : Right, *in vitro* derived mature fruits, collected after 12 weeks of culture initiation. Left, *ex vitro* derived mature fruits, collected after 8 weeks of flower initiation.

Bar = 0.7 cm.

Fig. 3 : A droite : fruits mûrs issus d'une culture* in vitro *et cueillis 12 semaines après la mise en culture. A gauche : fruits mûrs issus d'une culture* ex vitro *et cueillis 8 semaines après l'initiation de la fleur.

Echelle du trait = 0,7 cm.

The role of sucrose (3-10 %) on inflorescence induction was tested and it was observed that sucrose concentration exceeding 4 % did not result in flowering, possibly because of osmotic involvement. However, a high concentration of sucrose promoted *in vitro* flowering of *Cichorium* (Harada, 1966) and *Plumbago* (Nitsch and Nitsch, 1967). The initiation of flowering may be interpreted by the presence of flower bud initials in the region of the axils of the cultured nodal explants. The addition of cytokinins might have triggered the mechanism promoting the precocious

manifestation of their expression. The successful induction of *in vitro* flowering in the mulberry has an implication for possible improvement in the efficiency of this plant to form seedless fruits by hormonal manipulation.

CONCLUSION

From the foregoing results and discussion it can be concluded that mulberry explant through *in vitro* culture can readily be regenerated and induced to multiple shoot proliferation. Under *in vitro* culture, inflorescence proliferation from flower bud initials in the axils of the cultured nodal explants was also observed which could be accelerated by the proper combination of growth-regulators. The technique has an implication for possible improvement of mulberry to form seedless fruits particularly for the purpose of jam, jelly production.

REFERENCES

BLAYDES D.F. (1966) Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean tissue. Physiol. Plant., 19, 748-753.

DAS D.C. (1981) Mulberry taxonomy, cytogenetics and breeding. National Seminar on Silk Reseach and Development. March 10-13, Bangalore, India.

HARADA H. (1966) Effects of photoperiod on the formation of flower buds by flower stalk sections of *Cichorium intybus* in tissue culture. Bot. Mag., 79, 119-123.

HOSSAIN M., RAHMAN M., JOARDER O.I. (1990) *In vivo* propagation of mulberry from axillary bud culture. Rajshahi Univ. St. (B), 18, 73-81.

HOSSAIN M., RAHMAN M., ZAMAN A., JOARDER O.I. (1991) Effect of nature of explant and pH on *in vitro* propagation of some mulberry genotypes. Bull. Sericult. Res., 2, 13-22.

IVANICKA J. (1987) *In vitro* micropropagation of mulberry, *Morus nigra* L. Scientia Hortic., 32, 33-39.

JAIN A.K., DANDIN S.B., SENGUPTA K. (1990) *In vitro* propagation through axillary bud multiplication in different mulberry genotypes. Plant Cell Reports, 8, 737-740.

KABIR N.E. (1989) Azolla - A green manure for mulberry field. Indian Silk, 28(8), 33-35.

KIM H.R., PATEL K.R., THORPE T.A. (1985) Regeneration of mulberry plantlets through tissue culture. Bot. Gaz., 146, 335-340.

MURASHIGE T., SKOOG F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant., 15, 475-497.

NARASIMHULU S.B., REDDY G.M. (1984) *In vitro* flowering and pod formation from cotyledons of groundnut (*Arachis hypogaea*). Theor. Appl. Genet., 69, 87-91.

NITSCH C., NITSCH J.P. (1967) The induction of flowering *in vitro* in stegments of *Plumbago indica*. The production of reproductive buds. Planta., 72, 371-384.

OKA S., OHYAMA K. (1986) Mulberry (*Morus alba* L.). *In* Biotechnology in Agriculture and Forestry Y.P.S. Baja (ed.), Springer-Verlag, Berlin, vol. 1 Trees I, 384-392.

OHYAMA K., OKA S. (1987) Mulberry. *In* Cell and Tissue Culture in Forestry. Bonga J.N., Durjan D.J. (eds.), Martinus Nijhoff Publishers, The Netherlands, 272-284.

PAEL G.K., BAPAT V.A., RAO P.S. (1983) *In vitro* culture of organ explants of *Morus indica*: Plant regeneration and fruit formation in axillary bud culture. Z. Pflazenphysiol. 111, 465-468.

YADAV U., MADAN L., JAISWAL V.S. (1990) Micropropagation of *Morus nigra* from shoot tip and nodal explants of mature trees. Scientia Hort., 44, 16-67.

ZEEVART J.A.D. (1976) Physiology of flower formation. Ann. Rev. Plant Physiol., 27, 321-348.

REGENERATION DES PLANTS ET FORMATION DE FRUITS SANS GRAINES PAR CULTURE D'EXPLANTS NODAUX DE *MORUS ALBA* L., CULTIVAR S_1

A. ZAMAN*, R. ISLAM, M. HOSSAIN**, M.A. BARI* & O.I. JOARDER**

* Bangladesh Sericulture Research and Training Institute, Rajshahi, Bangladesh.

** Department of Botany, University of Rajshahi, Rajshahi - 6205, Bangladesh.

Des explants nodaux de ***Morus alba*** *L. cultivar S_1 ont été cultivé sur un milieu de Murashige and Skoog (MS) additionné de 1 mg/l benzyladine (BA) ou kinétine (Kn) afin d'induire la formation de pousses multiples. Le racinement a été induit sur des pousses multipliées par culture in vitro dans un milieu MS à 50 % additionné de 0,5 mg/l acide indol-butyrique (AIB). Les régénérats ont été transférés avec succès dans des pots puis dans la mûraie. Au cours de la multiplication des pousses, l'explant a produit des fruits sans graines. Le sulfate d'adénine a des effets positifs sur la formation des fleurs. Les concentrations élevées en saccharose inhibent la formation des fleurs. La fréquence de formation des fleurs peut être augmentée après substitution des nitrates du milieu MS par ceux du milieu de Blaydes.*

INTRODUCTION

Le mûrier est une plante ligneuse à croissance rapide dont l'importance sur le plan économique est bien connue dans l'industrie séricicole. Cette plante est généralement hétérozygote du fait de sa reproduction par pollinisation croisée (Das, 1983). La culture *in vitro* du mûrier à partir de divers explants, par exemple les sommets des pousses, les bourgeons nodaux, la feuille, le cotylédon et l'hypocotyle, a donné de très bons résultats et permis d'obtenir des pousses multiples donnant par la suite des plantules (Oka et Ohyama, 1986, 1987 ; Kim et coll., 1985 ; Jain et coll., 1990 ; Hossain et coll., 1991). Certaines espèces de mûriers sont cultivées pour leurs fruits comestibles et leur bois de coupe (Patel et coll., 1983). Les fruits de mûrier sont riches en vitamines A, B_1, B_2 et C (Kabir, 1989) ; ils mesurent en général de 1 à 3 cm de long et ont un goût sucré. Malgré la richesse de leur valeur nutritionelle, ces fruits sont difficiles à mâcher en raison de la présence de grosses graines. Une délicieuse gelée peut être préparée à partir de ces fruits mais sa préparation est difficile à cause des graines contenues dans le fruit. Cette étude vise à étudier l'induction de pousses multiples à partir d'explants nodaux de mûrier et d'expérimenter la formation de fruits sans graines par développement parthénocarpique.

MATERIELS ET METHODES

Les pousses juvéniles en développement issues des bourgeons d'hiver ont été prélevés sur un arbre dioïque (femelle) âgé de 10 ans de *Morus alba* L. cultivar S_1. Après l'élimination des grandes feuilles, les matériels ont été coupés en petits morceaux (2 à 3 cm) contenant chacun un seul noeud et ont été désinfectés en surface avec du $HgCl_2$ (0,1 % w/v) pendant 10 minutes puis rincés 6 à 7 fois dans de l'eau distillée.

Les explants nodaux ont été cultivés séparément dans des tubes de 25 × 150 mm contenant 15 ml du milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) et fermés par un tampon en coton. Les explants comportant

des masses de pousses en croissance ont été transférés dans des flacons de 250 ml contenant chacun 50 ml de milieu afin de répondre aux besoins croissants en éléments nutritifs et en espace. Le milieu a été additionné de différentes combinaisons de cytokinines : benzyladénine (BA), kinétine (Kn) et sulfate d'adénine (Ads) ; d'auxines : acide naphthalène-acétique (ANA), acide indol-acétique (AIA) et acide gibberellique (GA_3).

Pour le racinement adventif, des microboutures d'au moins 3 cm de long de pousses cultivées *in vitro* ont été transférées dans un milieu MS à 50 % (contenant des sels majeurs et mineurs) sans aucun régulateur de croissance ou avec l'un des traitements suivants : 0,1, 0,5 ou 1,0 mg/l d'acide indol-butyrique (AIB) ou d'ANA.

Tous les milieux ont été gélifiés avec du bacto-agar Difco à 0,7 % et additionnés de 30 g/l de saccharose pour la prolifération des pousses et 15 g/l de saccharose pour l'induction des racines. Les valeurs des pH des milieux ont été ajustées à 5,6 avant stérilisation à l'autoclave à 120 °C sous une pression de 1,1 kg/cm^2 pendant 20 minutes. Toutes les cultures ont été maintenues dans une pièce d'élevage à 26 ± 1 °C et entre 55 et 60 % d'humidité relative pour une photopériode de 16 h sous éclairage fluorescent d'une densité de flux à photons de 50 à 60 $\mu Em^{-2}S^{-1}$.

Le traitement pour la prolifération des pousses et des inflorescences comportait quinze explants et le traitement pour la formation des racines 10 à 15 explants. Les données concernant le pourcentage d'explants produisant des pousses et des inflorescences, le nombre de pousses et le nombre d'inflorescences par explant ont été enregistrées 10 semaines après la mise en culture. Les données concernant le racinement (pourcentage de pousses racinées et nombre de racines par pousse) ont été relevées 6 semaines après la mise en culture dans les milieux de racinement. Toutes les expériences ont été répétées deux fois.

RESULTATS ET DISCUSSION

Prolifération des pousses et régénération des plantules :

La prolifération des pousses à partir des explants nodaux commence après une période de latence de 2 à 3 semaines. Le pourcentage de survie des explants varie de 41 à 89 % suivant la combinaison des hormones de croissance (Tableau I). Les milieux contenant de la cytokinine donnent des résultats satisfaisants pour la prolifération des pousses. L'addition d'auxines entraîne l'arrêt de la prolifération et de la croissance des pousses. Le nombre de pousses produit par un explant varie fortement (de 1 à 9). Sur les trois cytokinines utilisées, seule la BA permet d'obtenir un nombre satisfaisant de pousses par explant ; la supériorité de la BA sur les autres cytokinines pour la multiplication des pousses chez le mûrier a déjà été observé (Oka et Ohyama, 1987 ; Hossain et coll., 1991, 1992 ; Ivanicka, 1987 ; Yadav et coll., 1990). Cependant, lorsque la BA et la Kn sont ajoutés ensemble au milieu (1,0 mg/l chacun), on obtient une prolifération d'un nombre maximum de pousses (9,61) probablement en raison des activités synergétiques de la BA et de la Kn (Tableau I, Fig. 1).

Les pousses individuelles ont été sectionnées avec précaution des cépées formées *in vitro* et transférées dans le milieu de racinement après l'élimination des feuilles basales. Dans la plupart des cas, l'initiation des racines commence dans les deux semaines qui suivent la mise en culture. Les pousses qui ne produisent pas de racines dans cet intervalle sont incapables de produire des racines même après 5 semaines de culture. Bien que 29,6 % des pousses aient pu raciner sur le milieu MS sans hormones, le délai nécessaire à l'apparition de racines dépasse 3 semaines et les racines produites sont ténues. Cependant, aucune différence significative entre les milieux additionnés de ANA et les milieux sans hormones n'a été observée pour le nombre de racines par pousse (Tableau II). La présence d'AIB dans le milieu MS améliore le pourcentage de racinement, la qualité des racines ainsi que le nombre de racines par pousse. La fréquence maximale (88,2) de racines produites par des pousses et le nombre maximal (11,6) de racines ont été enregistrés avec le milieu contenant 0,5 mg/l d'AIB. L'augmentation ou la diminution de cette concentration entraîne une diminution significative de la fréquence de racinement bien que la variation du nombre de racines entre 0,1 mg/l AIB et 0,5 mg/l AIB ne soit pas significative.

Les plantules obtenues avec les milieux additionnés d'AIB sont plus saines (après 6 semaines de culture) que celles obtenues soit avec les milieux additionnés de ANA, soit avec les milieux sans

auxines. Les plantules des milieux additionnés d'AIB ont donc été utilisées pour le transfert dans la terre. Après avoir été soigneusement lavées afin d'enlever tout reste de milieu, les plantules ont été plantées dans de petits pots contenant 1:1 de terre de jardin non stérile et du compost. Au cours de la première semaine de transfert, les plantules en pot ont été recouvertes avec des bechers pour maintenir une humidité élevée. Dans les 2 à 3 semaines, environ 90 % des plants en pot ont commencé à former de nouvelles feuilles et leur croissance a repris. Aucune variation n'a été observée entre les plantules issues des différentes concentrations d'AIB pour ce qui concerne l'établissement dans le sol. Les plantules ont ensuite été transférées dans des pots plus grands et progressivement acclimatés aux conditions extérieures.

Formation des inflorescences et des fruits :

Les trois cytokinines séparément et en combinaison avec l'AIA permettent d'obtenir une inflorescence dans les axiles des micropousses en développement dans les 3 à 4 semaines de culture. Le pourcentage d'inflorescences produites par les explants et le nombre d'inflorescence par explant varie fortement. La formation des inflorescences sur les explants cultivés avec de l'Ads seul n'est pas satisfaisant. Cependant, lorsque l'Ads et le BA ou la Kn sont mélangés, le pourcentage d'inflorescences produites par des explants et le nombre d'inflorescences par explant augmente considérablement. La réponse est maximale lorsque la BA et l'Ads sont combinés (Fig. 2), ceci indique que les deux cytokinines Ads et BA ou Ads et Kn agissent de façon synergétique comme le montre l'action de la BA et de la Kn pour la prolifération des pousses. Les résultats montrent également clairement qu'il y a une association négative entre le nombre d'inflorescences et le nombre de pousses. Les régulateurs de croissance GA_3 et ANA n'ont aucun effet et, en conséquence, inhibent la prolifération des inflorescences. Narasimhulu et Reddy (1984) ont observé que l'AIA et l'ANA en faible concentration combinés avec des cytokinines exerçaient une influence positive sur la floraison de l'arachide mais ne parvenaient pas à induire de bourgeons floraux lorqu'ils étaient utilisés en traitements séparés. Chez le mûrier, même une faible concentration d'ANA combiné avec de la cytokinine ne permet pas d'initier une inflorescence. Patel et coll. (1983) ont observé des inflorescences mâles et femelles des cultures de bourgeons axillaires de mûriers sur un milieu MS contenant de l'AIB et de la Kn (1 mg/l chacun).

L'inflorescence se transforme en fruit 3 à 4 semaines après l'initiation. Les jeunes fruits sont de couleur verte et deviennent violet foncé lorsqu'ils sont mûrs. La taille et le poids des fruits mûrs sont approximativement le double de ceux des plants matures cultivés en mûraie à partir desquels les explants ont été prélevés (Fig. C). Le poids des fruits obtenus sur des cultures *in vitro* varie de 1,5 à 2,0 g et chaque culture (flacon de 250 ml) contient 5 à 6 fruits mûrs.

La formule minérale du milieu semble jouer un rôle important dans l'expression des primordiums des bourgeons floraux. Après substitution des nitrates dans le milieu MS avec ceux du milieu de Blaydes (1966), la fréquence de formation des fleurs augmente de 15 %. Des résultats similaires ont été observés par Narasimhulu et Reddy (1984) chez *Arachis hypogaea*.

Le rôle du saccharose (3 à 10 %) dans l'induction des inflorescences a été étudié et on a observé que les concentrations en saccharose supérieures à 4 % n'entraînaient pas de floraison probablement en raison de complications osmotiques. Cependant, une concentration en saccharose élevée favorise la floraison *in vitro* de *Cichorium* (Harada, 1966) et de *Plumbago* (Nitsch et Nitsch, 1967). L'initiation de la floraison peut s'expliquer par la présence d'initiateurs de bourgeons floraux dans la région des axils des explants nodaux cultivés. Il se pourrait que l'addition de cytokinines enclenche le mécanisme favorisant la manifestation précoce de leur expression. L'induction réussie de la floraison *in vitro* chez le mûrier peut permettre d'améliorer la capacité de cette plante à former des fruits sans graines par manipulation hormonale.

CONCLUSION

Les résultats et la discussion présentés ci-dessus permettent de conclure que l'on peut facilement régénérer les explants de mûrier par culture *in vitro* et induire une multiplication des pousses. On a pu observer que, dans ces conditions *in vitro*, la prolifération des inflorescences à partir des initiateurs de bourgeons floraux dans les axils des explants nodaux cultivés peut être accélérée à l'aide d'une

combinaison adaptée de régulateurs de croissance. Cette technique pourrait permettre d'améliorer la capacité du mûrier à former des fruits sans graines particulièrement utiles dans la production de confiture et de gelée.

FLORAL BIOLOGICAL INVESTIGATIONS IN FOUR *TERMINALIA* SPECIES

P.K. SRIVASTAV, D.N. PRASAD & K.N. SINGH

Plant Breeding and Genetics, Central Tasar Research and Training Institute, Piska Nagri, Ranchi - 835 303, India.

Studies on the anthesis and floral biology of four species of ***Terminalia*** *revealed that they differed significantly from each other. The smallest buds and sepals were found in* ***T. chebula*** *and the biggest in* ***T. arjuna****. The highest number of flowers per inflorescence was observed in* ***T. tomentosa*** *and the lowest in* ***T. chebula****. The length of stamens, styles and fruits was highest in* ***T. arjuna*** *and lowest in* ***T. paniculata****. Floral biologically,* ***T. arjuna*** *is much closer to* ***T. tomentosa*** *than to* ***T. chebula****, while* ***T. paniculata*** *differed from all the three species. Such closeness might have resulted in production of natural hybrids between* ***T. arjuna*** *and* ***T. tomentosa*** *in the distant past. Anthesis, anther dehiscence and stigmatic receptivity have been found to be closely associated with temperature, relative humidity, cloudy weather and rain in all the four species of* ***Terminalia*** *under study.*

Keywords : *Terminalia*, floral biology, inflorescence, anthesis, anther dehiscence, stigmatic receptivity, pollination.

INTRODUCTION

Terminalia Linn. (Combretaceae) may rightly be called the backbone of tasar industry as most of the rearing of the tasar silkworm (*Antheraea mylitta* D.) has been undertaken on *T. arjuna* and *T. tomentosa*, the two primary, and *T. paniculata*, *T. chebula* and *T. belerica*, the three secondary food plants in India. The genus consists of tropical trees found widely distributed in Deccan, Bihar, West Bengal, Orissa, Madhya Pradesh, Maharashtra and the subhimalayan tracts of North Provinces, Ceylone, Burma, Nepal and Sikkim up to an altitude of 4000 ft.

The biology of *Terminalia* has not been studied in much detail so far. Therefore, the present studies were undertaken to collect detailed information on the floral biology of four species of the genus to fasten their genetic improvement programmes.

MATERIALS AND METHODS

The method consisted of selection of five branches each from two plants belonging to four species, viz., *T. arjuna*, *T. tomentosa*, *T. paniculata* and *T. chebula* at Piska Nagri Farm. Ten unsprouted healthy buds of each branch were selected for studies. The observations were recorded between 7.00 am to 4.00 pm. The average data presented in this communication were compiled from observations made during 1987 to 1990. The pollen viability percentage was determined by staining the pollen in acetocarmine. The anther dehiscence and stigmatic receptivity were ascertained by using a magnifying lens. Bursting of anther lobes and presence of exploded pollens on their surfaces indicated the beginning of dehiscence while the presence of a transluscent, sticky and shining substance on the pinhead stigma reflected the receptivity of the stigma.

RESULTS AND DISCUSSION

The comparative floral biological details in four species of *Terminalia* have been depicted in Table I. The flowers were dull yellow in *T. tomentosa* and creamy white in *T. arjuna*, *T. chebula* and *T. paniculata*. They become pink before shedding in *T. paniculata*. The flowers were hermaphrodite, actinomorphic, small, regular, incomplete, epigynous, cyclic and bracteolate. The sepals were semipersistent, gamosepalous, calyx tube villous or glabrescent and produced above the ovary with a companulate mouth, valvate arranged in one whorl only and the length and width of the sepals decreased with the increase in number. The corolla is absent in all the four species. The stamens were arranged in two whorls and the inner whorl consisted of either mono- or dithecous stamens while the outer whorl had only monothecous anthers mostly. The stamens were polyandrous and double to that of the number of sepals, dorsifixed, introse. The stamens of the inner whorl were placed opposite the sepals and those of the outer whorl alternated with them. They are episepalous with four pollen sacs in dithecous and two pollen sacs in monothecous anthers. The anthers open by a valve from top to bottom and nectaries are found at the base of the stamens. The gynoecium has been found to be unicarpellary, unilocular with normally one and rarely two or three anatropous pendulous ovules, style long, stigma terminal, simple ovary about 1.0 mm or less, inferior with a hairy or glabrescent epigynous disc and basal placentation.

The anthesis was studied in detail in *T. tomentosa* and it was observed that the blooming of flowers is associated with temperature, relative humidity, cloudy weather and rain. Cloudy weather and rain greatly influence the process of anthesis as they result in a sudden fall of temperature and rise in the relative humidity. Under such circumstances the extension of the filament of anthers and opening of flowers is very gradual and delayed. The outer whorl of monothecous anthers dehisces one day earlier than the inner whorl of dithecous anthers in *T. tomentosa* while in *T. arjuna* the outer whorl undergoes dehiscence one day earlier than the inner whorls. In *T. paniculata* the dehiscence occurs in both whorls of the stamens one day after their full erection. Interestingly, the full erection in the second whorl of stamens coincides with anther dehiscence in the first whorl while the second whorl of stamens undergoes dehiscence in the subsequent morning. The anthers are pink in this species but they gradually become brown when the dehiscence is completed. The dehiscence was found to be maximum in *T. tomentosa* between 12-14 hrs in June and 14-16 hrs in July due to dry hot and humid cold weathers, respectively. The effect of weather was noticed in *T. arjuna* also where dehiscence started at 12 am in one or two anthers only in the outer whorl due to cold humid weather on 3.6.89 while it started at 7.30 or 8.00 am on hot sunny days in the outer whorl and the dehiscence completed on the same day in the same anthers. The pinhead stigma exuded a transluscent sticky substance during receptivity. On cold humid days the stigmatic receptivity starts one hour after anther dehiscence begins and remains receptive for a period of 2 hrs. The same stigma again resumes receptivity during two subsequent days till it is not pollinated.

The number of wings in the fruits of *T. arjuna* and *T. tomentosa* has been found to correspond with the number of sepals in the flowers. The fruit is normally one-seeded in all the four species but occasionally 2 or 3 seeds may be found in *T. arjuna*, *T. belerica* and *T. tomentosa*. Normally, there are five coreacious wings in *T. arjuna* and *T. tomentosa* and three wings in *T. paniculata* fruits, while *T. chebula* fruits are without wings. The fruits are indehiscent, glabrous or hairy and obovoid to oblong in *T. arjuna* and *T. tomentosa*, spindle-shaped in *T. chebula* and flattened in *T. paniculata*. While *T. paniculata* fruits are pink, the fruits in the other three speices are brown or dark brown coloured. The wings in the fruits of *T. tomentosa* are broader (1.0-1.5 cm) and marked with horizontal lines/striations from the axis to the edges. The striations curve upwards and the wings are nearly 0.5 cm wide in the fruits of *T. arjuna*. Seeds are solitary, exalbuminous, cotyledons convolute, embedded inside the pericarp/mesocarp and cannot be separated from the fruits, hence, the entire dry fruit is termed as seed. The floral formula of the genus is therefore,

$$\oplus \text{ Hermaphrodite } \overline{K_5\ C_0\ A_{5+5}}\ \underline{G_{\bar{1}}}$$

where, K = calyx ; C = corolla ; A = androecium ; G = gynoecium.

Table I. Comparative floral biological details in four *Terminalia* species.

***Tableau I. Caractères biologiques comparés de la fleur chez quatre espèces de* Terminalia.**

Characters / *Caractères*	*T. arjuna* 1988-89	*T. tomentosa* 1987-88	*T. paniculata* 1989-90	*T. chebula* 1989-90
Infloresence / *Inflorescence*	PS	PS	PS	PS
Time taken in emergence of inflorescence (days) *Temps nécessaire à l'émergence de l'inflorescence (jours)*	4-8	4-9	4-10	5-10
Flowering period *Période de floraison*	May-June *Mai à juin*	June-July *Juin à juillet*	Sept.-Dec. *Sept. à déc.*	May-June *Mai à juin*
Anthesis period *Durée de l'anthèse*	7.30-10.30 am	8.00-11.00 am	8.00-11.00 am	7.30-10.30 am
Length of primary peduncle (cm) *Longueur du pédoncule primaire (cm)*	15.12	19.75	9.00	8.02
Length of secondary peduncles (cm) *Longueur des pédoncules secondaires (cm)*	8.12	10.56	6.20	5.46
No. of secondary peduncles *Nombre de pédoncules secondaires*	6.80	6.99	4.30	3.50
No. of tertiary peduncles *Nombre de pédoncules tertaires*	6.50	6.40	10.50	2.50
Length of each quarternary peduncle or spike (cm) *Longueur de chaque pédoncule ou épi (cm)*	5.36	5.85	1.96	2.80
No. of spikes/infloresence *Nombre d'épis par inflorescence*	12.15	13.32	21.35	10.11
No. of flowers/spike / *Nombre de fleurs par épi*	34.20	42.00	24.55	33.60
Length of buds / *Longueur des boutons* (mm)	2.50	2.62	1.80	1.20
Width of buds / *Largeur des boutons* (mm)	1.67	1.50	1.40	1.30
No. of sepals / *Nombre de sépales*	3-12 (5.04)	4-16 (4.96)	5.00	5.00
Length of sepals / *Longueur des sépales* (mm)	3.07	2.75	2.30	1.70
Width of sepals / *Largeur des sépales* (mm)	2.85	1.00	1.80	1.70
Pedicel (negligible) length (mm) *Longueur (négligeable) du pédicelle (mm)*	0.90	0.90	0.70	0.90
No. of stamens in flowers *Nombre d'étamines dans les fleurs*	6-24 (10.10)	8-20 (9.92)	10.00	10.00

Continued / *Suite page suivante*

Table I. (continued) / *Tableau I. (suite).*

Characters / *Caractères*	*T. arjuna* 1988-89	*T. tomentosa* 1987-88	*T. paniculata* 1989-90	*T. chebula* 1989-90
Length of stamens / *Longueur des étamines* (mm)	4.50	3.50	2.97	4.00
Length of style / *Longueur du style* (mm)	3.72	3.00	1.55	4.00
Pollen shape *Forme du pollen*	R 50 % H 50 %	R	R	R
Pollen diameter / *Diamètre du pollen* (μ)	54.00	72.00	82.00	75.00
Pollen viability / *Viabilité du pollen* (%)	90.00	87.00	77.00	78.00
Pollination mode / *Mode de pollination*	E	E	E	E
Dehiscence of anthers *Déhiscence des anthères*	8.00- 10.00 am	12.00- 2.00 pm	10.30 am- 1.30 pm	8.00- 10.00 am
Period for complete dehiscence of anthers (days) *Période nécessaire à la déhiscence totale des anthères (jours)*	1-3	2-4	2-4	1-3
Receptivity of stigma *Réceptivité du pistil*	8.30- 9.30 am	1.00- 2.00 pm	10.30- 12.00 am	8.30- 9.30 am
Period for attaining maturity of stigma (days) *Période nécessaire à la maturité du pistil (jours)*	2-3	2-3	2-4	2-4
Fruit	DS	DS	S	D
No. of wings in fruits *Nombre d'ailes chez les fruits*	3-12 (5.0)	4-10 (4.9)	3	Nil *Néant*
Length of fruits / *Longueur des fruits* (cm)	5.23	4.82	0.63	2.0
Fruiting period *Période de fructification*	April *Avril*	April *Avril*	March *Mars*	Oct.-Nov. *Oct.-nov.*

PS : Panicled spike / *Epi paniculé.*
R : Round / *Rond.*
H : Hexagonal / *Hexagonal.*
E : Entomophilous / *Entomophile.*
D : Drupaceous / *Drupacé.*
S : Samara / *Samare.*

It is obvious that the floral biology of the four species of *Terminalia* studied is significantly different barring very few characters like the type of inflorescence, time taken in emergence of inflorescence, number of sepals and stamens in flowers and wings in fruits, pollination mode, period for complete dehiscence of anthers and period for attaining the maturity of stigma where much fewer differences were discernible. *T. arjuna* and *T. chebula* resembled each other in flowering and anthesis periods, number of flowers per spike, anther dehiscence and stigmatic receptivity, whereas *T. arjuna* and *T. tomentosa* exhibited closeness in variation in aberrant number of sepals and stamens in flowers and wings in fruits, number of secondary, tertiary and quarternary branches or peduncles/spikes of

inflorescence, their length and number of buds per spike, size of buds and pedicels, pollen viability, type of the fruits and fruiting periods. *T. tomentosa* and *T. paniculata* have the same anthesis period while *T. paniculata* and *T. chebula* resembled in width of buds and sepals and pollen viability. The pollen diameter was found to be different in all the four species while the pollen shape was the same, i.e. round, except in *T. arjuna* where 50 % pollens were hexagonal. There was no similarity between floral biological characters of *T. tomentosa* and *T. chebula*. The size of buds and sepals was smallest in *T. chebula* and biggest in *T. arjuna*. The number of flowers per inflorescence was found to be highest in *T. tomentosa* (560) and lowest in *T. chebula* (340). The length of stamens, styles and fruits was highest in *T. arjuna* and lowest in *T. paniculata*.

It is clear from the foregoing discussions that floral biologically, *T. arjuna* is closer to *T. tomentosa* as well as *T. chebula* but *T. arjuna* and *T. tomentosa* are closer to each other than *T. arjuna* and *T. chebula* while *T. paniculata* seems to be floral biologically distant from all the three species. The above findings have significant relevance with reference to the context that phylogenetically *T. arjuna* and *T. tomentosa* have been reported to be closer (Hooker, 1878) and morphologically natural hybrids between both species have been reported to occur in the forests of Bihar and Orissa (Parker, 1925 ; Srivastav, 1986, 1991 ; Haines, 1961). This is further supported by the crossability studies carried out by one of the present authors (PKS) which reveal that *T. tomentosa* × *T. arjuna* cross is compatible though premature fall of the interspecific fruits occurs possibly due to embryonal incompatibility to the mother endosperm.

REFERENCES

HAINES H.H. (1961) The Botany of Bihar and Orissa. II. BSI, Calcutta.

HOOKER J.D. (1878) Flora of British India II (1973 Reprint). M/S Bishan Singh Mahendra Pal Singh, Dehradun.

PARKER R.N. (1925) A hybrid *Terminalia* (Arjuna + Asan) and general remarks on tree hybrid. Ind. For., 51(12), 599-603.

SRIVASTAV P.K. (1986) *Terminalia* and tasar culture : yesterday, today and tomorrow. Indian Silk, 25(6), 35-37.

SRIVASTAV P.K. (1991) *Terminalia : the wonder tree of India. Indian Silk, 29(10), 15-19.*

ETUDE DE LA BIOLOGIE FLORALE DE QUATRE ESPECES DE *TERMINALIA*

P.K. SRIVASTAV, D.N. PRASAD & K.N. SINGH

Plant Breeding and Genetics, Central Tasar Research and Training Institute, Piska Nagri, Ranchi - 835 303, Inde.

Une étude sur la biologie florale et l'anthèse de quatre espèces de ***Terminalia*** *a permis de mettre en évidence des différences significatives entre ces espèces.* ***T. chebula*** *présente les bourgeons et les sépales les plus petits et* ***T. arjuna*** *les plus gros. Le nombre de fleurs par inflorescence est maximal chez* ***T. tomentosa*** *et minimal chez* ***T. chibula****. La longueur des étamines, des styles et des fruits est maximale chez* ***T. arjuna*** *et minimale chez* ***T. tomentosa****. Du point de vue de la biologie florale,* ***T. arjuna*** *est beaucoup plus proche de* ***T. tomentosa*** *que de* ***T. chebula****, tandis que* ***T. paniculata*** *diffère totalement des trois autres espèces. Une telle proximité peut être due à la production d'hybrides naturels entre* ***T. arjuna*** *et* ***T. tomentosa*** *dans un passé éloigné. L'anthèse, la déhiscence des anthères et la réceptivité des stigmates sont étroitement liées à la température, l'humidité relative, la présence d'une couverture nuageuse et la pluie chez les quatre espèces de* ***Terminalia*** *étudiées.*

INTRODUCTION

Terminalia Linn. (Combretaceae) est considérée à juste titre comme la clé de voûte de l'industrie tasar car la plupart des élevages de vers à soie tasar (*Antheraea mylitta* D.) sont réalisés sur *T. arjuna* et *T. tomentosa*, les deux plantes nourricières primaires, et sur *T. paniculata*, *T. chebula* et *T. belerica*, les trois plantes nourricières secondaires. Ce genre est composé d'arbres tropicaux répartis dans le Deccan, le Bihar, le Bengale occidental, l'Orissa, le Madhya Pradesh, l'Andhra Pradesh, le Maharashtra et les pentes sub-himalayennes des provinces du nord, Ceylone, Burma, Népal et Sikkim jusqu'à une altitude de 1 200 mètres.

La biologie de *Terminalia* n'a pas encore été étudiée de manière approfondie. Cette étude a donc été entreprise afin de recueillir des informations détaillées sur la biologie florale de quatre espèces appartenant à ce genre afin d'optimiser les programmes d'amélioration génétique.

MATERIELS ET METHODES

La méthode a consisté à sélectionner cinq ramifications à partir de deux plants appartenant à quatre espèces, à savoir : *T. arjuna*, *T. tomentosa*, *T. paniculata* et *T. chebula*, à la ferme de Piska Nagri. Dix bourgeons sains non éclos ont été prélevés sur chacune des branches. Les observations ont été enregistrées entre 7h00 et 16h00. Les données moyennes présentées dans cet article ont été compilées à partir d'observations relevées de 1987 à 1990. Le pourcentage de viabilité du pollen a été déterminé par coloration au carmin acétique. La déhiscence des anthères et la réceptivité du pistil ont été étudiées à la loupe. L'éclatement des lobes des anthères et la présence de pollens explosés à leur surface marquent le début de la déhiscence, tandis que la présence d'une substance transparente, visqueuse et brillante sur les pistils longistyles marque la réceptivité du pistil.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les détails de la biologie florale comparative des quatre espèces de *Terminalia* sont présentés dans le tableau I. Les fleurs sont jaune pâle chez *T. tomentosa* et blanc crème chez *T. arjuna*, *T. chebula* et *T. paniculata*. Elles deviennent roses avant de tomber chez *T. paniculata*. Elles sont hermaphrodites, actinomorphique, petites, régulières, incomplètes, épigynes, cycliques et bractéolées. Les sépales sont semi-persistants, gamosépalaires, avec un calice tubulaire pileux ou glabre, et sont produits au-dessus de l'ovaire avec un orifice companulé, les valves diposées en une seule spirale et la longueur et la largeur des sépales diminuent à mesure que leur nombre augmente. Il n'y a pas de corolle chez les quatre espèces. Les étamines sont diposées en deux spirales, le verticille intérieur comprenant soit des étamines monothèques, soit des étamines dithèques, tandis que le verticille extérieur comprend principalement des anthères monothèques. Les étamines sont polyandres et deux fois plus nombreuses que les sépales, elles sont fixées sur la partie dorsale et introrses. Les étamines du verticille intérieur sont placées en face des sépales et celles du verticille extérieur sont placées en alternance avec ceux-ci. Elles sont épisépales et contiennent quatre sacs de pollen dans les anthères dithèques et deux sacs de pollen dans les anthères monothèques. Les anthères s'ouvrent de haut en bas et les nectaires sont situés à la base des étamines. Le gynécée est unicarpellaire, uniloculaire et contient normalement un ou, plus rarement, deux ou trois ovules pendulaires anatropes, un style long, un stigmate et un ovaire simple mesurant 1 mm ou moins, inférieur avec un disque épigyne pileux ou glabre et une placentation basale.

L'anthèse a été étudiée en détail chez *T. tomentosa* et il apparaît que la floraison est en relation avec la température, l'humidité relative, la présence d'une couverture nuageuse et la pluviosité. Les nuages et la pluie influencent fortement le processus de l'anthèse car ils entraînent une chute soudaine de la température et une augmentation de l'humidité relative. Dans ces conditions, l'allongement du filament des anthères et l'ouverture des fleurs sont très graduels et retardés. Le verticille extérieur des anthères monothèques s'ouvre un jour plus tôt que le verticille intérieur des anthères dithèques chez *T. tomentosa*, tandis que, chez *T. arjuna*, le verticille extérieur entre en déhiscence un jour plus tôt que les verticilles intérieurs. Chez *T. paniculata*, les deux verticilles des étamines entrent en déhiscence un jour après leur érection complète. Il est intéressant de noter que l'érection complète du deuxième verticille des étamines coïncide avec la déhiscence des anthères dans le premier verticille, tandis que le deuxième verticille des étamines subit la déhiscence le matin suivant. Les anthères sont roses chez cette espèce mais deviennent progressivement brunes lorsque la déhiscence est finie. La déhiscence est maximale chez *T. tomentosa* entre 12h00 et 14h00 en juin en raison du temps chaud et sec et entre 14h00 et 16h00 en juillet en raison du temps humide et froid. L'influence des conditions météorologiques a également été observée chez *T. arjuna*, chez qui la déhiscence a commencé à 12h00 pour une ou deux anthères seulement dans le verticille extérieur en raison du temps humide et froid le 3 juin 1989 tandis qu'elle commence entre 7h30 et 8h00 lorsque le temps est chaud et sec dans le verticielle extérieur et elle se termine le même jour dans les mêmes anthères. Le pistil longistyle exsude une substance transparente et visqueuse pendant la période de réceptivité. Lorsque le temps est froid et humide, la réceptivité du pistil commence une heure après le début de la déhiscence des anthères et continue pendant deux heures. Ce pistil recommence à être réceptif les deux jours suivants jusqu'à la fin de la pollinisation.

Le nombre d'ailes dans les fruits de *T. arjuna* et *T. tomentosa* correspond au nombre de sépales mais on peut occasionnellement trouver 2 ou 3 graines chez *T. arjuna*, *T. belerica* et *T. tomentosa*. Il y a normalement cinq ailes coriacées chez les fruits de *T. arjuna* et *T. tomentosa* et trois ailes chez les fruits de *T. paniculata*, tandis que les fruits de *T. chebula* n'ont pas d'ailes. Les fruits sont indéhiscents, glabres ou pileux et obovoïdes à oblongs chez *T. arjuna* et *T. tomentosa*, en forme de fuseau chez *T. chebula* et aplatis chez *T. paniculata*. Tandis que les fruits de *T. paniculata* sont roses, les fruits des trois autres espèces sont de couleur marron ou marron foncé. Les ailes des fruits de *T. tomentosa* sont plus larges (1,0 à 1,5 cm) et sont striées de lignes horizontales de l'axe aux extrémités. Les stries sont incurvées vers le haut et les ailes font presque 0,5 cm de large chez les fruits de *T. arjuna*. Les graines sont solitaires, exalbumineuses, à cotylédons convolutés, encastrées dans le péricarpe et/ou

le mésocarpe et ne peuvent pas être séparées des fruits ; c'est pourquoi le fruit tout entier est appelé "graine". La formule florale de ce genre est donc :

$$\oplus\ \overline{5S + 0P + (5+5)E} + 1C$$

S = sépale, P = pétale, E = étamine, C = carpelle.

Il est évident que la biologie florale diffère de manière significative entre les quatre espèces de *Terminalia* étudiées, à l'exception d'un très petit nombre de caractères comme le type d'inflorescence, le temps nécessaire à l'émergence de l'inflorescence, le nombre de sépales et d'étamines dans les fleurs et le nombre d'ailes dans les fruits, le mode de pollinisation, la période nécessaire à la déhiscence complète des anthères et la période de maturation du pistil, où les différences sont peu sensibles. *T. arjuna* et *T. chebula* présentent des similitudes pour ce qui concerne les périodes de fructification et d'anthèse, le nombre de fleurs par épi, la déhiscence des anthères et la réceptivité du pistil alors que *T. arjuna* et *T. tomentosa* sont proches pour ce qui concerne la variation du nombre de sépales et d'étamines dans les fleurs et dans les ailes des fruits, le nombre de ramifications secondaires, tertiaires et quaternaires ou des pédoncules et/ou épis d'inforescences, leur longueur et le nombre de bourgeons par épi, la taille des bourgeons et des pédicelles, la viabilité du pollen, le type de fruits et la période de fructification. *T. tomentosa* et *T. paniculata* ont la même période d'anthèse tandis que *T. paniculata* et *T. chebula* ont des largeurs de bourgeons et de sépales et une viabilité du pollen similaires. Le diamètre du pollen diffère entre les quatre espèces tandis que la forme du pollen est identique, c'est-à-dire ronde, sauf chez *T. arjuna* où 50 % des pollens sont hexagonaux. Il n'y a aucune ressemblance des caractères biologiques de la fleur entre *T. tomentosa* et *T. chebula*. La taille des bourgeons et des sépales est minimale chez *T.* chebula et maximale chez *T. arjuna*. Le nombre de fleurs par inflorescence est maximal chez *T. tomentosa* (560) et minimal chez *T. chebula* (340). La longueur des étamines, des styles et des fruits est maximale chez *T. arjuna* et minimale chez *T. paniculata*.

Les discussions qui précèdent montrent clairement que, sur le plan de la biologie florale, *T. arjuna* est plus proche de *T. tomentosa* et de *T. chebula* mais *T. arjuna* et *T. tomentosa* sont plus proches l'un de l'autre que *T. arjuna* et *T. chebula*, tandis que *T. paniculata* semble éloigné des trois autres espèces. Les résulats ci-dessus apportent de nouveaux éléments du point de vue phylogénétique car il a été observé que *T. arjuna* et *T. tomentosa* sont proches (Hooker, 1878) et que des hybrides naturels entre ces deux espèces ont été recensés dans les forêts du Bihar et de l'Orissa (Parker, 1925 ; Srivastav, 1986, 1991 ; Haines, 1961). Cette hypothèse est également soutenue par les études de capacité de croisement effectuées par l'un des auteurs (PKS) révélant que le croisement *T. tomentosa* × *T. arjuna* est possible bien que l'on observe une chute prématurées des fruits interspécifiques problablement due à une incompatibilité embryonnaire à l'endosperme de la mère.

FURTHER STUDIES ON THE OCCURRENCE OF ANOMALOUS SEEDLINGS IN *TERMINALIA* LINN.

P.K. SRIVASTAV, SHOVA BECK, MD. ISA & H.R. BANIA

Plant Breeding and Genetics, Central Tasar Research and Training Institute, Piska Nagri, Ranchi - 835 303, India.

The occurrence of tricotyledony, tetracotyledony, twins and trins/triplets was recorded in the mass nursery of ***Terminalia arjuna*** *and* ***Terminalia tomentosa*** *and pure nursery raised during the progeny testing of 22 plus trees of* ***T. arjuna*** *(hybrid nature). This is the first report regarding the occurrence of twins in* ***T. tomentosa*** *and trins/triplets in* ***T. arjuna****. In the light of the various types of anomalies observed in flowers, fruits and seedlings during the present investigations, the twins and trins/triplets seem to have arisen more due to false polyembryony than due to cleavage polyembryony and twins produced tetra- and tricotyledonous seedlings due to their fusion followed by abortion of an embryo and/or a cotyledon in nature. The occurrence of anomalies in seedlings of* ***Terminalia*** *seems to be genetic as the progenies of 8 plus trees exhibited no seedling anomalies.*

Keywords : Polyembryony, twins, trins/triplets, mono-, tri- and tetracotyledonous seedling.

INTRODUCTION

Various species of the genus *Terminalia* have been extensively utilized in pharmaceutical, timber, tannin, leather and tasar industries (Chopra *et al.*, 1974 ; Singh *et al.*, 1983). *T. arjuna* and *T. tomentosa* have been considered as the ideal tree species for breeding of *Antheraea mylitta* D., and their extensive plantations have been raised in the forests of Bihar, Madhya Pradesh, Orissa, West Bengal, Andhra Pradesh and Uttar Pradesh for tasar culture in India.

During raising of mass seedlings of *T. arjuna* from open-pollinated plants, some preliminary observations were made earlier by Tewari *et al.* (1985) on the occurrence of anomalous seedlings, viz., tricotyledonous, tetracotyledonous and polyembryonate twin seedlings. The present studies were carried out further with a view to ascertaining the precise occurrence of such anomalous seedlings in nature by screening mass half-sib progenies of *T. arjuna* and *T. tomentosa* and pure half-sib progenies of 22 plus trees of *T. arjuna* (hybrid nature) during 1986-87 to 1989-90. Besides, isolation of various cytomorphotypes, viz. haploids, triploids, tetraploids, etc., was also one of the objectives so that our Germplasm Bank is enriched for production of pure lines and/or high-yielding varieties in future.

MATERIALS AND METHODS

The seedlings were raised from the seeds collected from open-pollinated trees following the standard nursery technique (Tewari *et al.*, 1978). The anomalous seedlings in the mass nursery of *T. arjuna* and *T. tomentosa* were isolated at cotyledonary stage during 1987-88 to 1989-90 with a view to assessing the overall occurrence of anomalous seedlings in nature. Besides, the isolation was also carried out in pure half-sib progenies of 22 plus trees of *T. arjuna* during 1986-87 for estimating the frequency of anomalous seedlings per plant in nature. The mother trees were selected from different stands of Madhya Pradesh and Orissa States so as to ascertain the geographical as well as genetic effects on the occurrence of these anomalous seedlings. The mother trees, viz. B_1-B_6, S_1-S_3,

O_1-O_2, N_1-N_6, D and Ds_1-Ds_4 were designated either on the basis of natural stands or the scientists who identified them (Table II).

In order to correlate the anomaly of seedlings with anomaly of flowers/fruits, the screening of anomalous flowers was made and their subsequent development was also studied on *T. arjuna* trees. Besides, the LS of 500 fruits each, from two trees of *T. arjuna*, was cut to study the number of ovules in the fruits.

RESULTS

The frequency of anomalous seedlings observed in pure half-sib progenies of various plus (natural hybrid) trees of *T. arjuna* and mass nursery of *T. arjuna* and *T. tomentosa* has been depicted in Tables I and II, respectively.

The frequency of anomalous seedlings was studied in the individual progenies of 300 seeds each from various 22 plus trees of *T. arjuna* (Table I). No trins and monocots were produced in such cases and the overall occurrence of twins, tricots and tetracots was found to be 0.329, 0.49 and 0.07 per cent, respectively. The lowest percentage of twins (0.39) was recorded in N_6 plus tree while B_4 exhibited the highest occurrence (1.83 %) of twins. The lowest percentage of tricots (0.37) was found in Ds_4 as compared to the highest percentage of tricots (3.28) in O_1. Likewise, N_6 exhibited the lowest percentage of tetracots (0.39), while O_1 had the highest percentage of tetracots (3.28). Some of the plus trees (15), viz. B_1, B_3, B_5, O_1, S_1, S_2, S_3, N_2, N_3, N_4, N_5, Ds_1, Ds_2, Ds_3, Ds_4, had no twin/trin seedlings while twelve plus trees, viz. B_2, B_3, B_4, B_5, O_2, S_1, N_1, N_2, N_3, N_4, N_5, Ds_2, and twenty plus trees, viz. B_1, B_2, B_3, B_4, B_5, B_6, O_2, S_1, S_2, S_3, N_1, N_2, N_3, N_4, N_5, D, Ds_1, Ds_2, Ds_3, Ds_4, exhibited no tricot and tetracot seedlings, respectively. Interestingly, some plus trees (8), viz. B_3, B_5, S_1, N_2, N_3, N_4, N_5 and Ds_2, did not exhibit any type of anomalous seedlings in their half-sib progenies.

The frequency of anomalous seedlings in the mass nursery of *T. arjuna* was also carried out consistently for four years during 1986-87 to 1989-90 while in *T. tomentosa* it could be studied only during 1988-89 (Table II). A total of 110 255 seedlings of both species were raised, out of which 223 twins, 7 trins, 22 monocots, 528 tricots and 25 tetracots were isolated, their overall occurrence was found to be 0.202, 0.006, 0.0199, 0.478 and 0.022 per cent, respectively. While only twins were observed in *T. tomentosa*, their occurrence, being 0.16 per cent, in *T. arjuna* all types of anomalous seedlings, viz. twins, trins, monocots, tricots and tetracots were observed and their occurrence ranged from 0.136-0.329, 0.005-0.012, 0.006-0.068, 0.493-0.828 and 0.02-0.07 per cent respectively during all the four years (1986-87 to 1989-90).

Out of 114 510 seedlings observed so far, interestingly a rare tetracot seedling with two separate embryos but a fused root system was also isolated. The number of wings in the fruits of plus trees giving rise to twin seedlings was found to be 5, 7, 8, 10, 11 and 12.

Interestingly, only a single flower having 10 sepals and 2 carpels (bearing separate stigma, style and ovary) with a common vascular supply was noticed amongst the thousands of normal flowers which bore 5 sepals and 1 carpel only. This rare flower produced two joint fruits bearing a common vascular supply.

While only one set of 500 fruits from a tree exhibited only one ovule, the other set of 500 fruits from another tree of *T. arjuna* had one ovule in 499 fruits and two ovules in one fruit (0.2 %).

All the 8 twins of *T. tomentosa* died within one month after their transplantation separately but the twins/trins (215) of *T. arjuna* are still maintained except in a very few cases (12 %) where the weaker member died after their separation and subsequent transplantation. Further, with respect to morphological characters and growth parameters, only 11.62 per cent twin seedlings exhibited similarity with their counterparts.

DISCUSSION

The occurrence of tricotyledonous and tetracotyledonous seedlings in *T. arjuna* was reported to be 0.1594 and 0.0054 per cent in nature by Tewari *et al.* (1985) on the basis of one-year data as compared to 0.478 and 0.022 per cent respectively under the present investigations on the basis of four-year observations. The 0.0199 per cent occurrence of monocotyledonous seedlings in *T. arjuna*

screened out from natural populations may be considered as new records. The 0.206 per cent occurrence of twins as reported by the authors on the basis of four years' cumulative observations in *T. arjuna* also do not confirm the one year's 0.0002 % (Tewari *et al.*, 1985) occurrence of twins in nature in this taxa. The 0.16 per cent occurrence of twins in *T. tomentosa* as estimated during 1988-89 may also be considered as the new record. The overall occurrence of twins in the genus *Terminalia* seems to be 0.202 per cent.

Table I. Frequency of anomalous seedlings in progenies of various plus mother (natural hybrid) trees of *Terminalia arjuna* in 1986-87.

Tableau I. Fréquence de plantules anormales chez les descendants de différents arbres supérieurs mères (hybrides naturels) de* Terminalia arjuna *en 1986-87.

Natural hybrid mother trees* / *Arbres mères hybrides naturels**	No. of seedlings raised from 300 seeds / *Nombre de plantules obtenus pour 300 graines*	No. of wings in fruits producing twins / *Nombre d'ailes dans les fruits donnant des jumeaux*	Occurrence of twins (%) / *Présence de jumeaux (%)*	Tricotyledonate seedlings (%) / *Plantules tricotylédonées (%)*	Tetracotyledonate seedlings (%) / *Plantules tétracotylédonées (%)*
B_1	134	-	-	0.75	-
B_2	263	10, 11, 12	1.14	-	-
B_3	154	-	-	-	-
B_4	109	5	1.83	-	-
B_5	214	-	-	-	-
B_6	204	5	0.49	0.49	-
O_1	63	-	-	3.28	3.28
O_2	171	5	1.16	-	-
S_1	177	-	-	-	-
S_2	224	-	-	0.45	-
S_3	166	-	-	0.60	-
N_1	190	5	1.58	-	-
N_2	167	-	-	-	-
N_3	188	-	-	-	-
N_4	121	-	-	-	-
N_5	186	-	-	-	-
N_6	257	8	0.39	0.78	0.39
D	258	7, 8	0.77	1.55	-
Ds_1	240	-	-	2.50	-
Ds_2	253	-	-	-	-
Ds_3	246	-	-	0.81	-
Ds_4	270	-	-	0.37	-
	4255	5, 7, 8, 10, 11, 12	0.329	0.49	0.07

* B_1-B_6, S_1-S_3 and O_1-O_2 located at Bijilkhaman, Samradihi and opposite BSM & TC Office in Sundergarh (Orissa). N_1-N_6 identified by the Senior Research Officer of Nowrangpur (Orissa). D located at Dhamtari. Ds_1-Ds_4 located at Dhamtari Sorgaon (MP) / *B_1-B_6, S_1-S_3 et O_1-O_2 situés Bijilkhaman, Samradihi et en face de BSM & TC Office à Sundergarh (Orissa). N_1-N_6 identifié par le Directeur de Recherches Nowrangpur (Orissa). D situé at Dhamtari. Ds_1-Ds_4 situés à Dhamtari Sorgaon (MP).*

Table II. Frequency of anomalous seedlings in the mass nursery of *Terminalia* spp.

Tableau II. Fréquence de plantules anormales dans la pépinière de masse de* Terminalia *spp.

Sl no. / *N° de série*	Years / *Années*	Taxa / *Taxons*	Total seedlings / *Total de plantules*	Number of seedlings originating from a fruit / *Nombre de plantules issues d'un fruit*	Occurrence of twins (%) / *Présence de jumeaux (%)*	Monocotyledonate seedlings (%) / *Plantules monocotylédonées (%)*	Tricotyledonate seedlings (%) / *Plantules tricotylédonées (%)*	Tetracotyledonate seedlings (%) / *Plantules tétracotylédonées (%)*
1	1986-87	*T. arjuna**	4 255	2	0.329	-	0.493	0.070
2	1987-88	*T. arjuna*	60 000	2	0.208	0.006	0.500	0.02
				3	0.005	-	-	-
3	1988-89	*T. arjuna*	16 000	2	0.262	0.006	-	-
				3	0.012	-	-	-
		T. tomentosa	5 000	2	0.16	-	-	-
4	1989-90	*T. arjuna*	25 000	2	0.136	0.068	0.828	0.04
				3	0.008	-	-	-
		Total	110 255	2	0.202	0.0199	0.478	0.022
				3	0.006			
		T. arjuna	105 255	2	0.206			
				3	0.006			

* 22 plus trees (pure nursery) / *22 arbres supérieurs (cultures individuelles en pépinière).*

The progenies of 22 plus trees of *T. arjuna* (hybrid nature) were also screened for seedling abnormalities which revealed that fifteen, twelve and twenty plus trees did not exhibit any twin/trins, tricots and tetracotyledonous seedlings, respectively. Further, out of 22 plus trees, the progenies of eight plus trees had no seedling abnormalities at all, which reveals that such abnormalities may be genetically controlled. Attempts were made to study the interrelationships between the number of wings in the fruits and number of seedlings originating from them which revealed that the twins were produced by the fruits bearing 5, 7, 8, 10, 11 and 12 wings, implying thereby no correlation between the number of wings in fruits and the occurrence of twin/trin seedlings.

Tewari *et al.* (1985) are of the opinion that the polyembryonate twin seedling of *T. arjuna* may be due to cleavage polyembryony and the disparity in growth of twin seedlings may be attributed to the cotyledonary leaf area and characters observed which showed direct relationships. Contrary to this, the authors have not only observed a flower with 10 sepals and 2 carpels but also 2 fused fruits with a common vascular supply which resulted from the former flower. Further, a normal fruit bearing five wings also exhibited two ovules in longitudinal section, which points out that the twin/trin seedlings may be attributed more to false polyembryony than to cleavage polyembryony as frequently observed in the case of cultivated cotton, *Gossypium spp.*, (Weber, 1940) and *Bombax ceiba* (Venkatesh and Emmanuel, 1978). This is also supported by the fact that only 11.62 per cent twins exhibited similarity in the morphological and growth characters with their counterparts under the present investigations.

The authors are also of the opinion that two or three ovules in a fruit may give rise to twins and triplets/trins respectively and the monocots may develop due to fusion of two cotyledons of the same embryo. Further, the two ovules may fuse during embryogeny to give rise to a tetracot seedling with two separate embryos and a common root which may further produce a tetracot with a single embryo due to complete fusion and abortion of an embryo. The tetracot seedlings may subsequently give rise to a tricot seedling due to abortion of a cotyledon.

Further studies on these anomalous seedlings, their karyomorphology and induction of chromosome variations through polyploid breeding are continued to exploit the phenomenon.

REFERENCES

CHOPRA R.N., CHOPRA I.C., VERMA B.S. (1974) Supplement to glossary of Indian medicinal plants. Pub. and Inform. Direct., CSIR, New Delhi.

SINGH U., WADHWANI A.M., JORHI B.M. (1983) Dictionary of economic plants in India. ICAR, New Delhi.

TEWARI S.K., SHERGILL M.S., SASTRY C.R., NARASIMHANNA M.N. (1978) Nursery technique for *Terminalia arjuna* Bedd. plantation. Proc. 2nd For. Conf., FRI and C., Dehradun.

TEWARI S.K., SASTRY C.R., NARASIMHANNA M.N., SHERGILL M.S. (1985) Some preliminary observations on occurrence of anomalous seedlings in *T. arjuna* Bedd. Indian J. Seric., 24(1), 22-24.

VENKATESH C.S., EMMANUEL C.J.S.K. (1978) Twin seedlings in *Bombax ceiba* L. Indian For., 104(6), 411-413.

WARDLAW C.W. (1955) Embryogenesis in plants. John Wiley and Sons, New York, pp. 381.

WEBBER J.M. (1940) Polyembryony. Bot. Rev., 6, 575-598.

NOUVELLES ETUDES SUR LA PRESENCE DE PLANTULES ANORMALES CHEZ *TERMINALIA* LINN.

P.K. SRIVASTAV, SHOVA BECK, MD. ISA & H.R. BANIA

Plant Breeding and Genetics, Central Tasar Research and Training Institute, Piska Nagri, Ranchi - 835 303, Inde.

La présence de tricotylédons, de tétracotylédons, de jumeaux et de triplés a été observée dans une pépinière de ***Terminalia arjuna*** *et de* ***Terminalia tomentosa*** *et sur des cultures individuelles en pépinière au cours d'un test sur la progéniture de 22 arbres supérieurs de* ***T. arjuna*** *(hybride naturel). La présence de jumeaux chez* ***T. tomentosa*** *et de triplés chez* ***T. arjuna*** *est décrite pour la première fois. Au vu des différents types d'anomalies observées chez les fleurs, les fruits et les plantules étudiés dans ces expériences, il semble que la présence de jumeaux et de triplés soit due à une fausse polyembryonie plutôt qu'à une polyambryonie de scission et que les jumeaux aient produit des plantules tricotylédonées et trétracotylédonées par une fusion suivie de l'avortement d'un embryon et/ou d'un cotylédon de façon naturelle. La présence d'anomalies dans les plantules de* ***Terminalia*** *semble être d'origine génétique car la descendance de 8 arbres supérieurs ne présente aucune anomalie.*

INTRODUCTION

Différentes espèces du genre *Terminalia* sont utilisées de manière extensive dans l'industrie pharmaceutique, l'industrie du bois, du tannage, du cuir et l'industrie tasar (Chopra et coll., 1974 ; Singh et coll., 1983). *T. arjuna* et *T. tomentosa* sont considérées comme les espèces les mieux adaptées à l'élevage d'*Antheraea mylitta* D. et elles ont été plantées de manière extensive dans les forêts du Bihar, du Madhya Pradesh, de l'Orissa, du Bengale occidental, de l'Andhra Pradesh et de l'Uttar Pradesh afin d'être utilisées pour l'élevage tasar en Inde.

Au cours d'une culture de masse de plantules de *T. arjuna* à partir de plantes à pollinisation ouverte, des observations préliminaires avaient été faites par Tewari et coll. (1985) sur la présence de plantules anormales, à savoir : des plantules jumelles tricotylédonées, tétracotylédonées et polyembryonnaires. Cette étude a été réalisée ensuite afin de déterminer précisément la présence de ces types d'anomalies dans la nature en sélectionnant des descendants semi-consanguins de masse de *T. arjuna* et *T. tomentosa* et des descendants semi-consanguins purs de 22 arbres supérieurs de *T. arjuna* (hybride naturel) de 1986-87 à 1989-90. En outre, divers cyto-morphotypes, à savoir : des haploïdes, des triploïdes, des tétraploïdes, etc., ont également été isolés afin d'enrichir notre banque génétique et de permettre la production future de lignées pures et/ou de variétés performantes.

MATERIELS ET METHODES

Les plantules ont été obtenues à partir de graines prélevées sur des arbres à pollinisation ouverte, suivant la technique standard (Tewari et coll., 1978). Les plantules anormales présentes dans la pépinière de masse de *T. arjuna* et *T. tomentosa* ont été isolées au stade cotylédon de 1987-88 à 1989-90 afin d'évaluer la présence globale de plantules anormales dans la nature. Par ailleurs, des descendants semi-consanguins purs de 22 arbres supérieurs de *T. arjuna* ont également été isolés de 1986 à 1987 afin de déterminer la fréquence de plantules anormales par plant dans la nature. Les arbres

mères ont été sélectionnés dans différentes parcelles des Etats du Madhya Pradesh et de l'Orissa afin d'observer les effets tant géographiques que génétiques sur la présence de ces plantules anormales. Les arbres mères, à savoir : B_1 à B_6, S_1 à S_6, O_1 à O_2, N_1 à N_6, D et Ds_1 à Ds_4, ont été sélectionnés en fonction de leur emplacement naturel ou des chercheurs qui les ont identifiés (Tableau II).

Afin de déterminer la corrélation entre l'anormalité des plantules et l'anormalité des fleurs et/ou des fruits, on a effectué un tri des fleurs anormales et étudié leur développement en fruits chez les arbres de *T. arjuna*. En outre, le LS de 500 fruits provenant de deux arbres de *T. arjuna* a été sectionné afin de déterminer le nombre d'ovules dans les fruits.

RESULTATS

La fréquence de plantules anormales observée chez les descendants semi-consanguins purs de divers arbres supérieurs (hybrides naturels) de *T. arjuna* et dans la pépinière de masse de *T. arjuna* et de *T. tomentosa* est présentée dans les tableaux I et II.

La fréquence de plantules anormales a été étudiée individuellement chez les descendants de 300 graines de 22 arbres supérieurs de *T. arjuna* (Tableau I). Ces graines n'ont donné ni triplé ni monocotylédon et la présence totale de jumeaux, de tricotylédons et de tétracotylédons s'élève respectivement à 0,329 %, 0,49 % et 0,07 %. Le pourcentage minimal de jumeaux (0,39) a été enregistré chez l'arbre supérieur N_6 et le pourcentage maximal (1,83 %) chez B_4. Le pourcentage minimal de tricotylédons (0,37 %) a été observé chez Ds_4 et le pourcentage maximal (3,28) chez O_1. Le pourcentage minimal (0,39 %) de tétracotylédons a également été enregistré chez N_6, tandis que le pourcentage maximal (3,28) a été enregistré chez O_1. Certains des arbres supérieurs (15), B_1, B_3, B_5, O_1, S_1, S_2, S_3, N_2, N_3, N_4, Ds_1, Ds_2, Ds_3 et Ds_4, n'ont donné aucune plantule jumelle ou triplée tandis que 12 arbres supérieurs, B_2, B_3, B_4, B_5, O_2, S_1, N_1, N_2, N_3, N_4, N_5 et Ds_2, et vingt arbres supérieurs, B_1, B_2, B_3, B_4, B_5, B_6, O_2, S_1, S_2, S_3, N_1, N_2, N_3, N_4, N_5, D, Ds_1, Ds_2, Ds_3 et Ds_4, n'ont donné respectivement aucune plantule tricotylédonée ni tétracotylédonée. Il est intéressant de noter que certains (8) arbres supérieurs, B_3, B_5, S_1, N_2, N_3, N_4, N_5 et Ds_2, n'ont produit aucune plantule anormale chez leurs descendants semi-consanguins.

La fréquence de plantules anormales dans la pépinière de masse de *T. arjuna* a également été étudiée sur quatre années consécutives de 1986-87 à 1989-90 mais elle n'a pu être étudiée que de 1988 à 1989 chez *T. tomentosa* (Tableau II). Au total, 110 225 plantules des deux espèces ont été obtenues, sur lesquelles 223 jumeaux, 7 triplés, 22 monocotylédons, 528 tricotylédons et 25 tétracotylédons ont été isolés, leur présence totale est respectivement de 0,202 %, 0,006 %, 0,0199 %, 0,478 % et 0,022 %. Alors que seuls des jumeaux ont été observés chez *T. tomentosa* pour une présence de 0,16 %, tous les types de plantules anormales ont été relevés chez *T. arjuna*, c'est-à-dire des jumeaux (de 0,136 à 0,329 %), des triplés (de 0,005 à 0,012 %), des monocotylédons (0,006 et 0,068 %), des tricotylédons (de 0,493 à 0,828 %) et des tétracotylédons (de 0,02 à 0,07 %) au cours des quatre années (1986-87 à 1989-90).

Sur les 114 510 plantules observées jusqu'à présent, il est à noter qu'une plantule tétracotylédonée rare contenant deux embryons séparés mais un système radiculaire fusionné a également été isolée. Les nombres d'ailes sur les fruits des arbres supérieurs produisant des plantules jumelles sont de 5, 7, 8, 10, 11 et 12.

Par ailleurs, une seule fleur comprenant 10 sépales et deux carpelles (portant un stigmate, un style et un ovaire séparés) avec un canal vasculaire commun a été observée parmi les milliers de fleurs normales comprenant 5 sépales et un seul carpelle. Cette fleur rare a produit deux fruits fusionnés portant un canal vasculaire commun.

Tandis que 500 fruits de l'un des lots de d'un même arbre possédaient chacun un seul ovule ; sur les 500 fruits de l'autre lot prélevés sur un arbre *T. arjuna*, 499 avaient un seul ovule et un fruit avait deux ovules (0,2 %).

Les 8 jumeaux de *T. tomentosa* sont morts un mois après leur transplantation séparément mais les jumeaux/triplés (215) de *T. arjuna* sont toujours exploités à l'exception de quelques cas (12 %) chez lesquels le membre le plus faible est mort après la séparation et la transplantation. En outre, pour ce qui concerne les caractères morphologiques et les paramètres de croissance, seulement 11,62 % des plantules jumelles présentent des similitudes avec leurs contreparties.

DISCUSSION

La présence naturelle de plantules tricotylédonées et tétracotylédonées chez *T. arjuna* a été estimée à 0,1594 % et 0,0054 % (Tewari et coll., 1985) après un an d'étude contre 0,478 % et 0,022 % après quatre ans d'observation dans la présente étude. Le chiffre de 0,0199 % de plantules monocotylédonées présentes chez *T. arjuna* après sélection de populations naturelles peut être considéré comme un record. Le chiffre de 0,206 % de jumeaux observés par les auteurs ne confirme pas non plus celui de 0,002 % (Tewari et coll., 1985) pour un an d'observation de présence naturelle de jumeaux chez ce taxon. Le chiffre de 0,16 % de jumeaux chez *T. tomentosa* obtenu en 1988-89 peut également être considéré comme un record. Le pourcentage de présence de jumeaux chez le genre *Terminalia* semble être de 0,202 %.

Le tri des descendants de ces 22 arbres supérieurs de *T. arjuna* (hybride naturel), effectué afin de sélectionner les anomalies chez les plantules, révèle que quinze arbres supérieurs ne donnent aucun jumeau ou triplé, douze arbres ne donnent aucun tricotylédon et vingt arbres ne donnent aucun tétracotylédon. De plus, sur les 22 arbres supérieurs, les descendants de 8 arbres supérieurs ne présentent aucune anomalie chez les plantules, ce qui révèle que de telles anomalies peuvent être régulées génétiquement. L'étude des interactions entre le nombre d'ailes chez les fruits et le nombre de plantules dérivées de ces fruits a révélé que les jumeaux sont produits par les fruits contenant 5, 7, 8, 10, 11 et 12 ailes, ce qui implique qu'il n'y a aucune corrélation entre le nombre d'ailes dans le fruit et la présence de plantules jumelles et/ou triplées.

Tewari et coll. (1985) estiment que la polyembryonie jumelle chez la plantule de *T. arjuna* peut être due à une polyembryonie de scission et que la disparité de la croissance chez les plantules jumelles peut être attribuée à la surface foliaire cotylédonaire et aux caractères observés qui présentent des relations directes. Néanmoins, les auteurs de cet article ont non seulement observé une fleur avec 10 sépales et deux carpelles mais également deux fruits fusionnés avec un canal vasculaire commun issus de cette fleur. De plus, un fruit normal contenant cinq ailes a également produit deux ovules dans la partie longitudinale, ce qui tend à prouver que la présence de plantules jumelles et/ou triplées est due à une fausse polyembryonie plutôt qu'à une polyembryonie de scission, comme on l'a fréquemment observé chez le coton cultivé *Gossypium* spp. (Webber, 1940) et chez *Bombax ceiba* (Venkatesh et Emmanuel, 1978). Le fait que 11,62 % des jumeaux présentent une similitude des caractères morphologiques et des paramètres de croissance avec leurs contreparties appuie également cette hypothèse.

Les auteurs pensent que la présence de deux ou trois ovules par fruit peut donner naissance respectivement à des jumeaux et des triplés et que les monocotylédons peuvent se développer en raison de la fusion de deux cotylédons d'un même embryon. De plus, ces deux ovules peuvent fusionner au cours de l'embryogenèse et donner naissance à une plantule tétracotylédonée contenant deux embryons séparés et une racine commune qui pourrait ensuite produire un tétracotylédon avec un seul embryon en raison de la fusion totale et de l'avortement d'un embryon. Les plantules tétracotylédonées pourraient ensuite donner naissance à une plantule tricotylédonée après avortement d'un cotylédon.

D'autres études sur ces plantules anormales, leur caryomorphologie et l'induction de variations chromosiques par sélection polyploïdique sont en cours afin d'exploiter ce phénomène.

Brief note

EFFECT OF TEMPERATURE AND HUMIDITY ON HATCHING OF EGGS OF THE MUGA SILKWORM, *ANTHERAEA ASSAMA* WW., DURING INCUBATION

A. BARAH, A.K. SENGUPTA & M.V. SAMSON

Regional Muga Research Station Central Silk Board, Boko,781 123 India

An incubation schedule has been worked out for successful hatching of eggs of the muga silkworm, ***Antheraea assama*** *Westwood (Lepidoptera : Saturniidae). It consists of maintenance of 26 ± 1 °C temperature with 85 ±5 % relative humidity. Under this condition, hatchability above 85.0. % is assured. There was no variation in the period of incubation or eclosion over control.*

Keywords : *Antheraea assama* Ww., incubation, humidity, hatching, heat unit, embryonic development.

INTRODUCTION

As all the insects are esothermous in habit, environmental factors, particularly the abiotic factors i.e. temperature, humidity, light, rainfall, food etc., play a commanding role in the growth and development of every insect.The effect of temperature and humidity in various silkworms has been studied by many workers, special mention of which can be made of Kobari *et al.* (1929), Doke (1939) and Yokoyama and Takashima (1952) in *Bombyx mori* L., Hodai (1949) in *Philosamia ricini* B. and Kurusawa *et al.* (1937) and Yamazaki (1939) in *Antheraea pernyi* D., while no information in *Antheraea assama* Ww. is available except the work of Choudhury (1982). Hence, the present study was undertaken to find out the appropriate temperature and humidity requirement for incubation of muga silkworm eggs.

MATERIAL AND METHODS

The present study on incubation of muga silkworm eggs was carried out during the adverse summer season (August-September 1988). For the incubation of eggs17 ± 1 °C, 20 ± 1 °C, 23 ± 1 °C, 26 ± 1 °C, 29 ± 1 °C, 32 ± 1 °C and 35 ± 1 °C temperature ranges were chosen and under each temperature, four humidity regimes, viz., 65 ± 5 %, 75 ± 5 %, 85 ± 5 %, and above 90 % were considered. In each condition, three replications of 500 muga silkworm eggs were incubated and data on embryonic period, duration of hatching and rate of hatching were recorded separately. The incubation was carried out in BOD incubators and humidity cabinets. The required temperatures were maintained with the help of a thermostatic device whereas the required humidity regimes were maintained with different salt solutions (Hodgam, 1948) in B.O.D. incubators and with a humidistatic device in humidity cabinets.

RESULTS

Table I reveals that incubation period and hatching duration are inversely proportional to the rise of temperature. It was observed that there was steady and significant increase in the hatching

percentage along with the rise in temperature from 17 °C to 26 °C, but a declining trend on hatchability was observed from 29 °C to 35 °C. The hatching percentage was significantly impaired at 35 °C.

When different humidity regimes under individual temperature treatment were compared, it was discernible that humidity regimes of 65 %, 75 % and 85 % had relatively much less effect on the incubation period and hatching duration, but showed a significant improvement on hatchability in between the treatments. But in all the temperatures, the humidity above 90 % showed a relatively impaired hatching, which was significantly inferior to the other humidity regimes. However, 26 °C temperature with 85 % relative humidity proved to be the best temperature and humidity regime for incubation of muga silkworm eggs. Because, under this situation, with a minimum incubation period and hatching duration, maximum hatching percentage (85.37 %) could be obtained.

The rate of embryonic development and its relation to different incubation temperatures are depicted in Fig. 1. It is revealed from the figure that incubation of eggs at lower temperature below room / environmental temperature retarded the rate of embryonic development resulting in prolonged incubation period. With the fall of temperature, the development rate gradually decreased from 14.28 % of control (room temperature) to 4.65 % at 17 °C and reversely, the incubation period increased gradually from 7 to 21.5 days. Incubation of eggs at higher temperature above room / environmental temperature though accelerated the rate of embryonic development and thereby shortened the period of incubation, but adversely affected the hatchability of eggs.

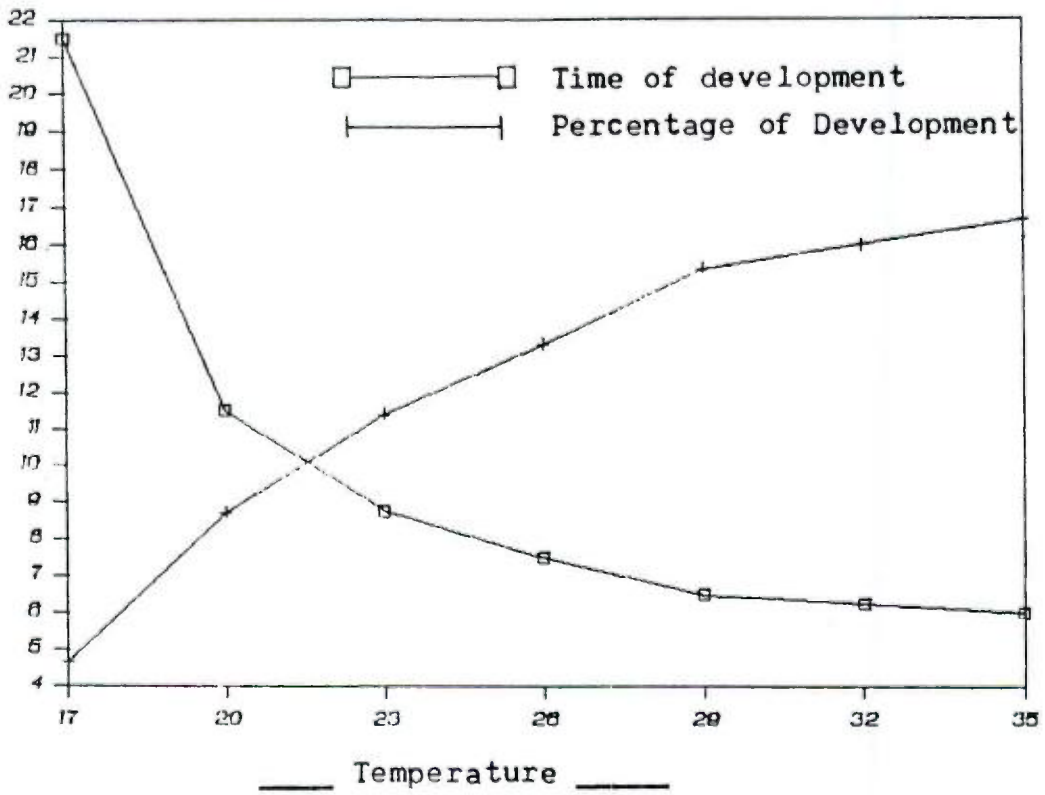

Fig. 1 : Rate of embryonic development of muga silworms under different temperature regimes.

Fig. 1 : Taux du développement embryonnaire du ver à soie muga à différentes températures.

Table I. Effect of temperature and humidity on hatching during incubation of muga silkworm eggs.

Tableau I. Effet de la température et de l'humidité sur l'éclosion des oeufs de vers à soie muga pendant leur incubation.

Incubation temperature (± 1 °C) *Température d'incubation (± 1 °C)*	Relative humidity (± 5 %) *Humidité relative (± 5 %)*	Incubation period (days) *Période d'incubation (jours)*	Hatching duration (days) *Durée d'éclosion (jours)*	Average percentage of hatching *Pourcentage moyen d'éclosion*
17	65	22	7	74.50 ± 0.37
	75	22	7	73.13 ± 0.82
	85	21	7	70.13 ± 1.27
	> 90	21	7	66.47 ± 0.50
20	65	12	7	72.87 ± 0.81
	75	12	7	75.13 ± 1.16
	85	11	7	79.20 ± 0.65
	> 90	11	7	69.30 ± 1.24
23	65	9	6	73.37 ± 0.82
	75	9	6	76.83 ± 0.88
	85	9	6	79.73 ± 1.11
	> 90	8	6	77.20 ± 0.51
26	65	8	4	79.07 ± 0.82
	75	8	4	81.23 ± 0.92
	85	7	4	85.37 ± 0.60
	> 90	7	4	76.40 ± 0.91
29	65	7	4	73.33 ± 0.50
	75	6	4	73.70 ± 0.50
	85	6	4	70.20 ± 0.51
	> 90	6	3	64.47 ± 0.52
32	65	7	4	58.63 ± 1.19
	75	6	4	57.40 ± 1.15
	85	6	4	53.53 ± 0.50
	> 90	6	4	43.07 ± 0.69
35	65	6	4	38.27 ± 0.57
	75	6	4	34.53 ± 1.09
	85	6	3	29.30 ± 0.57
	> 90	6	3	18.07 ± 1.55
Control in room condition *Témoin en milieu ambiant* (29.8 ± 1.4° C)	86.8 ± 3.5	7	4	60.97 ± 2.26
CD at 5 %				1.87
CD at 1 %				2.49

DISCUSSION

In the present study, it has been observed that muga silkworm eggs took various lengths of time to complete the embryonic development at different temperatures. Within the limits, the relationship followed almost a hyperbola (Fig. 1). The lower the incubation temperature, the higher was the time taken to complete the embryonic development. The situation was such because the embryos took longer time (21-22 days) to get the required dd / 50 at lower temperature to complete the development. While the required heat units could be obtained by the embryos in shorter duration in higher temperature treatments. Therefore, the rate of development is the reciprocal to the development time.

The development curve shows three significant features here, 1) the middle section of the curve falling between 20 °C to 29 °C is approximately a straight line, indicating that the rate of development is directly proportional to temperature, which is supported by hatching percentage are in all the humidity regimes except 90 % RH, that seems to be partially detrimental. Similar results have been reported by Hand (1983) in *Sitobion avenae*, an aphid species, and Ali (1929) in *Patanga succincta* L., 2) the curve in front (at 32 °C and 35 °C) suggests that development is slowing down with further increase in temperature and also indicates the possibility of being sub-lethal temperature, since the eclosion from the eggs got reduced drastically both from thermal treatments, ranging from 17 °C to 29°C, as well as room temperature.

The tolerance of an organism is affected not only by the intensity of the factor but also by its duration. The fact that mortality follows normally a sigmoid curve showing tolerance gradient which is a genetic factor (Chiang, 1985 and Delrio *et al.*, 1986).

The gradiation of embryonic thermo-tolerance in *A. assama* at higher temperatures like 32 °C and 35 °C can be attributed to the genetic heterogeneity of the egg mass. Since the experiment has been carried out with the general population, it is likely that different genotypes were involved in the experiment. More precisely, it is just possible that multiple forms of an enzyme (allelic form) in the population, each with a different thermal optimum might have broaden the thermo-tolerance range. Therefore, an attempt should be made to identify the detailed mechanism by which the macromolecules affect fitness of the embryos under different regimes and to use the knowledge in breeding plan by identifying and isolating the thermo-tolerant populations to overcome the difficulties of hatching during extreme summer and 3) at the base, at 17 °C, the curve did not intersect the abscissa but was not just above it. So this particular temperature was not the threshold temperature but was part of environmental temperature above threshold point, which can promote development.

In the present study, we observed less intense effect of humidity. Because 65 %, 75 % and 85 % RH produced an almost similar effect while 90 % showed an adverse effect on hatching. Such a result is possible when some hygroscopic substance in the egg chorion is affected (Wigglesworth, 1972).

In conclusion, it can be suggested that out of the various temperature and humidity regimes tried, 26 ± 1 °C temperature in conjunction with 85 ± 5 % relative humidity is ideally suited to get 85.0 % hatching of muga silkworm eggs in any season.

REFERENCES

ALI S. (1982) Effect of temperature on the hatching of eggs of Bombay locust, *Patanga succincta* L. (Orthoptera : Acrididae). Comp. Physiol. Ecol., 7 (2), 78-80.

CHOUDHURI S.N. (1982) Muga Silk Industry. Directorate of Sericulture and Weaving, Assam.

CHIANG H.C. (1985) Insects and their environment. Fundamental of Applied Entomology. Macmillan Publishing Company, New-York, 128-161.

DELRIO G., CONTI B, CROVETTI A. (1986) Effect of abiotic factors on *Ceratitis capitata* (Diptera : Tephritidae). I. Egg development under constant temperatures. Fruit flies of economic importance 84 A A Balkema, Rotterdam, 133-139.

HODGMAN C.D. (1948) Chemical producing relative humidities. Handbook of Chemistry and Physics Chemical Rubber Publication Co., Cleveland, Ohio.

HODAI T. (1949) Effects of environmental humidity on embryonic development and hatching in the eri silkworm with considerations on the mecanism. J. Sericult. Sci. Japan, 18, 171-180.

KOBARI K. , MUROGA H., MASUYAMA T. (1929) Studies on the incubation of the silkworm egg. I. Sangyo Shimpo., 37, 591-598.
KURASAWA Y. , KANAZAWA I., IKEUCHI S. (1937) Experimental studies on the influence of temperature and humidity upon the development of eggs of *Antheraea pernyi Guer. Bull. Sericult. Silk Indust., 10, 95-114.*
WIGGLESWORTH V.B. (1972) The principals of Insects Physiology. VII edition, Chapman and Hall, London.
YAMAZAKI T. (1939) Effects of temperature and humidity on the hatching of the Chinese tussah silkworm. Japan J. Applied Zool., 11, 167-176.
YOKOYAMA T., TAKASHIMA M. (1952) On silkworm incubated under slightly lower than usual atmospheric pressure. Acta Sericologica, 2, 159-164.

Note brève

EFFET DE LA TEMPERATURE ET DE L'HUMIDITE AU COURS DE L'INCUBATION SUR L'ECLOSION DES OEUFS DU VER A SOIE MUGA *ANTHERAEA ASSAMA* WW.

A. BARAH, A.K. SENGUPTA & M.V. SAMSON

Regional Muga Research Station, Central Silk Board, Boko - 781 123, Inde.

Un plan d'incubation a été mis au point afin de permettre une bonne éclosion des oeufs du ver à soie muga ***Antheraea assama*** *Westwood (Lepidoptera : Saturniidae). Il consiste à maintenir une température de 26 ± 1 °C avec une humidité relative de 85 ± 5 %. Dans de telles conditions, un taux d'éclosion dépassant 85,0 % est assuré. Il n'y a aucune variation de la période d'incubation ou du taux d'émergence par rapport au témoin.*

INTRODUCTION

Comme tous les insectes sont de nature ectothermique, les facteurs écologiques, en particulier les facteurs abiotiques comme la température, l'humidité, la luminosité, la pluviosité, la nourriture, etc., jouent un rôle primordial dans leur croissance et leur développement. L'effet de la température et de l'humidité sur diverses espèces de vers à soie a été étudié par de nombreux chercheurs, dont Kobari et coll. (1929), Doke (1935) et Yokoyama et Takashima (1952) chez *Bombyx mori* L., Hodai (1949) chez *Philosamia ricini* B. et Kurusawa et coll. (1937) et Yamazaki (1939) chez *Antheraea pernyi* D., mais il n'existe aucune documentation sur *Antheraea assama* Ww., à l'exception des travaux de Choudhury (1982). Une étude a donc été réalisée afin de déterminer la température et l'humidité appropriées à l'incubation des oeufs de vers à soie muga.

MATERIELS ET METHODES

La présente étude sur l'incubation des oeufs de vers à soie muga a été réalisée en été (août-septembre 1988), saison défavorable pour l'élevage muga. Pour l'incubation des oeufs, des plages de température de 17 ± 1 °C, 20 ± 1 °C, 23 ± 1 °C, 26 ± 1 °C, 29 ± 1 °C, 32 ± 1 °C et 35 ± 1 °C ont été choisies et chaque température a été combinée avec quatre régimes d'humidité, soit 65 ± 5 %, 75 ± 5 %, 85 ± 5 et au-delà de 90 %. Pour chaque combinaison, trois réplicats de 500 oeufs de vers à soie muga ont été incubés et les données sur la durée de la période embryonnaire, la durée et le taux d'éclosion ont enregistrées séparément. L'incubation a été réalisée dans des incubateurs BOD et des chambres humides. Les températures requises ont été maintenues à l'aide d'un appareil thermostatique et les régimes d'humidité requise ont été maintenus avec différentes solutions salines (Hodgman, 1948) dans les incubateurs BOD et un humidificateur dans les chambres humides.

RESULTATS

Le tableau I montre que les durées d'incubation et d'éclosion sont inversement proportionnelles à la température. On observe une augmentation régulière et significative du pourcentage d'éclosion lorsque la température se situe entre 17° C et 26 °C et une tendance à la diminution du taux d'éclosion

lorsque la température passe de 29 °C à 35 °C. Le pourcentage d'éclosion diminue significativement à 35 °C.

La comparaison des différents régimes d'humidité en fonction des températures prises isolément montre que les régimes d'humidité de 65 %, 75 % et 85 % ont relativement moins d'effet sur la période d'incubation et la durée d'éclosion mais entraînent une amélioration significative de l'éclosion. Cependant, à toutes les températures, une humidité supérieure à 90 % affecte relativement le taux d'éclosion et donne des résultats significativement inférieurs à ceux obtenus avec les autres régimes d'humidité. Le régime de température de 26 °C pour une humidité relative de 85 % apparaît optimal pour l'incubation des oeufs de vers à soie muga, ces conditions permettant d'obtenir une période d'incubation et une durée d'éclosion minimales ainsi qu'un pourcentage d'éclosion maximal (85,37 %).

Le taux du développement embryonnaire et sa relation avec les différentes températures d'incubation sont présentés dans la figure 1. Celle-ci révèle que l'incubation des oeufs à une température inférieure à la température ambiante/du milieu entraîne un ralentissement du taux de développement embryonnaire qui se traduit par une prolongation de la période d'incubation. A mesure que la température diminue, le taux de développement décroît et passe de 14,28 % chez le témoin (température ambiante) à 4,65 % à 17 °C tandis que la période d'incubation augmente graduellement et passe de 7 à 21,5 jours. L'incubation des oeufs à une température supérieure à la température ambiante/du milieu accélère la vitesse du développement embryonnaire et diminue ainsi la période d'incubation mais a un effet négatif sur le taux d'éclosion des oeufs.

DISCUSSION

Dans cette étude, le temps nécessaire au développement embryonnaire des vers à soie muga varie en fonction des différentes températures. Dans les limites de la figure, la courbe de la relation dessine pratiquement une hyperbole (Fig. 1). Plus la température d'incubation est faible, plus le temps nécessaire au développement embryonnaire est long. Ceci est dû au fait que les embryons mettent plus de temps à atteindre le dd/50 nécessaire pour achever leur développement à faible température, tandis qu'ils peuvent obtenir les quantités de chaleur appropriées en moins de temps lorsqu'ils sont soumis à des températures supérieures. Le taux de développement est donc inverse à la durée de développement.

La courbe de développement révèle trois caractéristiques significatives. 1) La section médiane de la courbe située entre 20 °C et 29 °C forme approximativement une ligne droite, ce qui indique que le taux de développement est directement proportionnel à la température, comme le montre le pourcentage d'éclosion obtenu pour tous les régimes d'humidité sauf pour l'humidité à 90 % pour laquelle le taux d'éclosion semble être partiellement déprimé. Des résultats similaires ont été observés par Hand (1983) chez *Sitobion avenae*, une espèce d'aphidé, et par Ali (1982) chez *Patanga succincta* L. 2) L'extrémité antérieure de la courbe obtenue (32 °C à 35 °C) suggère que le développement ralentit lorsque la température augmente et indique également la possibilité que cette fourchette de température soit sub-létale car l'éclosion des oeufs diminue de manière prononcée par rapport aux traitements de 17 °C à 29 °C et au traitement à température ambiante.

La tolérance d'un organisme tient non seulement à l'intensité d'un facteur donné mais aussi à sa durée. Le fait que la mortalité suit normalement une courbe sigmoïde montre la présence d'un gradient de tolérance lié à un facteur génétique (Chiang, 1985 ; Delrio *et al.*, 1986).

La gradation de la thermo-tolérance chez *A. assama* à des températures supérieures comme 32 °C et 35 °C peut être attribuée à l'hétérogénéité génétique de la masse des oeufs. L'expérience ayant été réalisée sur l'ensemble de la population, il est possible que différents génotypes aient été impliqués. En d'autres termes, il est probable que des formes multiples d'une enzyme (formes alléliques) dans la population ayant chacune un optimum thermique différent aient entraîné un élargissement du spectre de la thermo-tolérance. Il serait donc nécessaire d'identifier le mécanisme détaillé par lequel les macromolécules affectent la santé des embryons soumis à différents régimes thermiques et d'utiliser cette connaissance dans un programme de sélection en identifiant et en isolant les populations thermo-tolérantes, ce qui permettrait de surmonter les difficultés d'éclosion rencontrées au cours des étés extrêmement chauds. 3) A 17 °C, la courbe ne croise pas l'abscisse mais est située

juste au-dessus. Cette température ne constitue donc pas une température seuil mais fait partie des températures du milieu supérieures au seuil, ce qui peut favoriser le développement.

Dans cette étude, l'effet de l'humidité est moins intense car les humidités relatives de 65 %, 75 % et 85 % produisent un effet presque identique tandis que le régime de 90 % a un effet négatif sur l'éclosion. Un tel résultat peut être attribué à l'affectation d'une substance hygroscopique dans le chorion de l'oeuf (Wigglesworth, 1972).

En conclusion, on peut suggérer que sur les divers régimes de température et d'humidité testés, le régime de température de 26 ± 1 °C pour une humidité relative de 85 ± 5 % constitue la combinaison optimale et permet d'obtenir un taux d'éclosion des oeufs de vers à soie muga de 85,0 % quelle que soit la saison.

Brief note

PHYTOALEXINS AND THEIR ROLE IN DISEASE CONTROL WITH SPECIAL REFERENCE TO MULBERRY

SUBRATA BISWAS & K. SENGUPTA*

Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, 742 101, West Bengal, India.

Keywords : Phytoalexins, mulberry, disease control.

Phytoalexins are antimicrobial compounds of low molecular weight and their defence mechanism parallels the mechanism of defence through the production of antibodies in animal systems. The compounds (phytoalexins) are formed in living cells of hypersensitive host in response to parasitic attack (Muller, 1961 ; Cruickshank, 1963). Considerable evidence supports that hypersensitive resistance response is the most important defence mechanism in plants, in which one or a few cells of the plant die when the plant is exposed to either a non-pathogen or a race or strain of one of its pathogens to which it is resistant (incompatible). Somehow the hypersensitive response leads to resistance response in which the dying or self-sacrifice of plant cells participates in or activates the plant's defence. Accumulation of phytoalexins is one defence response that is likely to be activated by the hypersensitive response, and this activation is likely to result from the release of the endogenous elicitor by enzymes of the hypersensitive cells (Darvill and Albersheim, 1984). It has been widely observed that phytoalexins are fungistatic and bacteriostatic compounds, active at very low concentrations and do not exist in healthy cells or present only in extremely minute quantities (Whitney, 1976). Furthermore, non-pathogens are more sensitive to them than pathogens because of the ability of the later to degrade phytoalexins better than the non-pathogens (Wheeler, 1975). There is also much evidence that phytoalexins accumulate in larger quantities in response to weak pathogens and non-pathogens than to virulent pathogens. However, the high accumulation of the compounds in response to weak pathogens and non-pathogens is not only because of their greater synthesis but also there is suppression of biodegradation of the synthesised compounds (Yoshikawa and Masago, 1982). Resistant plants accumulate them more rapidly than susceptible plants and the compounds are host-specific rather than pathogen-specific ; the basic response to their formation is more related to the host than to the pathogen (Whitney, 1976). Evidentially, it has been established that several chemical, physical and biotic agents which induce resistance to disease also stimulate the synthesis of phytoalexins. Thus, phytoalexins are generally defined as antibiotics produced in plant-pathogen interactions or as a response to injury or other physiological stimuli (Kuc, 1972).

Biosynthesis of phytoalexins has been studied most extensively in leguminosae. The phytoalexins found in this family indicate that formonetin is the isoflavone precursor of the phytoalexins vesitol, sativan, and medicarpin and daidzein is the precursor for phytoalexins glyceollin and phaseollin. The probable biosynthetic pathways have been determined for maackiain in clover (Dewick and Ward, 1978) ; vesitol, sativan and medicarpin in alfaalfa (Dewick and Martin, 1979) ; pisatin in pea (VanEtten and Pueppke, 1976) ; vignafuran in cowpea (Martin and Dewick, 1979) ; glyceollin in soybean (Yoshikawa *et al.*, 1979) and phaseollin in bean (Woodward, 1980). All these phytoalexins are derived from condensation of a cinnamyl-COA and three acetyl-COA units. The immediate products of acetate and cinnamate condensation are chalcones which first isomerize to flavones and eventually give rise to isoflavones such as daidzien and formonetin. Examples of

*Present address : "Tulip", B-9/27, Kalyani 741 235, West Bengal, India.

phytoalexins from other plant families are orchinol from orchids (Fisch *et al.*, 1973) and viniferin from grapes (Pryce and Langcake, 1977) are apparently derived from stilbenes such as resveratrol, which is also a phytoalexin in peanut (Harbone and Ingham, 1978). The stilbenes are derived from cinnamate and acetate. Momilactones from rice (Cartwright *et al.*, 1977), casbene from castor bean (Sitton and West, 1975), rhisitin and hydroxylubimin from potato (Sato *et al.*, 1978), capsidiol from pepper (Stoessl *et al.*, 1972), deoxyhemigossypol, hemigossypol and gossypol from cotton (Bell and Stipanovic, 1978) and ipomeamarone from sweet potato (Kato *et al.*, 1973) are terpenoids derived from movalonic acid.

In mulberry, phytoalexins are formed within 12 hours of infection and their formation takes place for about 4 days (Shirata and Takahashi, 1982). The chemical nature of mulberry phytoalexins indicates a considerable range of benzofuran and stilbenes. The benzofuran compounds such as Moracin-A-H, Moracin-M, Chalcomoracin and Dimoracin and stilbene compounds, namely, oxyresveratrol and 4-prenyloxyresveratrol-are all formed in different organs of diseased mulberry and considered as phytoalexins (Takasugi *et al.*, 1980 , 1982, Shirata *et al.*, 1982 ; Burke and Stevenson, 1985 ; Bose, 1989). Most of the phytoalexins inhibit many species of fungi and bacteria. The antifungal activity of Moracin-A (MA) is very strong, while that of Moracin-B (MB) is inferior. Moreover, the effect of MB decreases in high concentration because of facile crystalization and the crystal of MB does not inhibit germination of conidia and growth of germtubes. The mulberry pathogens are more tolerant to MA and MB than non-pathogens. However, some relationship is observed between pathogencity of *Fusarium solani* f sp. *mori*, *F. lateritium* f sp. *mori*, *F. roseum* (pathogens of mulberry twig blight) and their tolerance to MA and MB (Shirata *et al.*, 1978). Moracin-C and Moracin-D inhibit completely fungal growth of *Rosellinia necatrix* (pathogen of mulberry white root rot) and *Sclerotium triforiorum* but not *Pyrenophora graminea*. Many species of *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterium* and *Streptomyces* are sensitive to most of the phytoalexins. Among them, Moracin-M is a relatively strong antibiotic in nature and oxyresveratrol does not show antimicrobial activity (Shirata *et al.*, 1982).

A large body of evidence supports the theory of a disease-resistance function of phytoalexins. The ability of higher plants to accumulate phytoalexins is widespread, being present in monocots as well as dicots. The existence of this ability throughout the plant kingdom supports a defence function for these compounds with their well-known antibiotic properties. The fact that phytoalexins are absent in healthy plants and are accumulated in the site of microbial infection also indicates a defence function of phytoalexins. Evidence has been provided in a number of studies that phytoalexins not only accumulate at the site of infection but do so, following penetration by the microbe, quickly enough and in sufficiently high concentration to inhibit the growth of both fungi (Sato, *et al.*, 1971 ; Baily, 1974 ; Rosall *et al.*, 1980) and bacteria (Lyon and Wood, 1975). Additional evidence that phytoalexins are important in defence against pathogens has been provided by the demonstration that inhibition of phenylalanine ammonia-lyase in soybeans by L-2-amino-3-phenyl propionic acid leads to loss of resistance to *Phytophtora megasperma* f sp. *glycynea* the fungal pathogen that causes root and stem rot in its plant host, soybean. Phenylalanine ammonia-lyase is the first enzyme in the biosynthetic pathway of the pterocarpan phytoalexins of soybeans. Inhibition of the enzyme leads to a decrease in phytoalexin content as well as to the loss of resistance to pathogens (Moesta and Griseback, 1982). The most impressive evidence that phytoalexins can determine whether a plant is susceptible or resistant to infection comes from the correlation studies between the virulence in peas and tolerance to the phytoalexin pisatin by *Nectria haematococca*, the fungal root and stem-rot pathogen of peas (Van Etten, *et al.*, 1980 ; Tegtmeier and Van Etten, 1982). There, it was found that isolates of *N. heamatococca* that were highly tolerant to pisatin and able to demethylate pisatin, yet were unable to cause significant disease in peas. This is evidence that the ability to tolerate phytoalexins is not sufficient to render a microbe pathogenic. The evidence also provides strong support for the hypothesis that phytoalexin accumulation can be an effective mechanism of disease resistance in plants.

Increased accumulation of phytoalexins in plant tissue with the help of elicitors is a new approach in plant disease control. The term 'elicitor' is used to refer to molecules that induce plants to synthesize phytoalexins. This term refers to both biotic elicitors - for example, complex carbohydrates from fungal and plant cell walls, and microbial enzymes - and abiotic elicitors - for example, heavy metals and UV light. The elicitors control the metabolism of receptive plant cells. Shortly after exposure to

elicitors, plant cells stop growing, stop taking up nutrients and commence synthesizing the mRNAs and enzymes required for the synthesis of phytoalexins (Ebel *et al.*, 1976 ; Ragg *et al.*, 1981). It has been determined that elicitors can cause, within 30 minutes, receptive cells to synthesize the mRNAs encoding the phytoalexin-synthesis enzymes (Hahlbrock *et al.*, 1981 ; Ragg *et al.*, 1981). Indeed, within the time period, the mRNAs for these enzymes can accumulate in relatively high copy numbers. Advantages of elicitors over the traditional plant protection chemicals lie in the fact that they act *in vivo*, after absorption into the host tissue, to create there against a possible attack from the pathogen a static defence initially and also a dynamic defence potential which will continue to operate for some time. The essence of this approach lies in artificially bringing into operation as well as keeping in readiness in anticipation of a possible attack some of the normal sequences of responses that characterize the normal defence of the host plant. It may actually mean an activation, under the influence of the elicitor, of the natural dynamic defence potential that somehow remains suppressed in the case of a compatible host-pathogen interaction. This will therefore, be nearer to and more in tune with the plant's own system of defence than any other form of chemical defence so far practiced. In the context of such advantages and hazardous consequences of the continued and excessive use of fungicide type toxic compounds, the possibility of mulberry disease control by the use of phytoalexin elicitors merits intensive exploration.

REFERENCES

BAILY J.A. (1974) The relationship between symptom expression and phytoalexin concentration in hypocotyls of *Phaseolus* vulgaris infected with *Coletotrichum lindemuthianum*. Physiol. Plant Pathol. 4, 477-488.

BELL A.A., STIPANOVIC R.D. (1978) Biochemistry of disease and pest resistance in cotton. Mycopathologia, 65, 91-106.

BOSE P.C. (1989) Natural resistance of mulberry plants to diseases - role of phytoalexins. Workshop on Host Plant Breeding and Genetics 28th to 30th June, 1989, CSR & TI, Berhampore, West Bengal Annexure, 1, 8.

BURKE J.M., STEVENSON R. (1985) Natural benzofuran synthesis of Moracin A and B. J. Chem. Res. Synop., 2, 34.

CARTWRIGHT D., LANGCAKE P., PRYCE R.J., LEWORTHY D.P., RIDE J.P. (1977) Chemical activation of host defence mechanisms as a basis for crop protection. Nature, 267, 511-513.

CRUICKSHANK I.A.M. (1963) Phytoalexins. Ann. Rev. Phytopathol., 1, 351-374.

DARVILL A.G., ALBERSHEIM P. (1984) Phytoalexins and their elicitors - A defence against microbial infection in plants. Ann. Rev. Plant Physiol., 35, 243-275.

DEWICK P.M., MARTIN M. (1979) Biosynthesis of pterocarpan and isoflavon phytoalexins in *Medicago sativa* : the biochemical interconversion of pterocarpans and 2'-hydroxyisoflavans. Phytochemistry, 18, 591-596.

DEWICK P.M., WARD D. (1978) Isoflavone precursors of the pterocarpan phytoalexin maackiain in *Trifolium pratense*. Phytochemistry, 17, 1751-1754.

EBEL J., AYERS A.R., ALBERSHEIM P. (1976) Host-pathogen interactions XII. Response of suspension-cultured soybean cells to the elicitor isolated from *Phytophtora megasperma* var. *sojae*, a fungal pathogen of soybeans. Plant Physiol., 57, 775-779.

FISH M.H., FLICK B.H., ARDITTI J. (1973) Structure and antifungal activity of hircinol, loroglossol and orchinol. Phytochemistry, 12, 437-441.

HALBROCK K., LAMB C.J., PURWIN C., EBEL J.,FAUTZ E., SCHAFER E. (1981) Rapid response of suspension-cultured parsley cells to the elicitors from *Phyotptera megasperma* var. *sojae*. Plant Physiol., 67, 768-773.

HARBONE J.B., INGHAM J.L. (1978) Biochemical aspects of the coevolution of higher plants with their fungal parasites. Biochemical Aspects of Plant and Animal Coevolution, ed. J.B. Harbone, London, Academic, 345-405.

KATO N., IMASEKI H., NAKASHIMA N., AKAZAWA T., URITANI I. (1973) Isolation of a new phytoalexin-like compound, ipomearonol, from black-rot fungus infected sweet potato root tissue, and its structural elucidation. Plant Cell Physiol., 14, 597-606.

KUC J. (1972) Phytoalexins. Ann. Rev. Phytopathol., 10, 207-232.
LYON F.M., WOOD R.K.S. (1975) Production of phaseollin, coumestrol and related compounds in bean leaves inoculated with *Pseudomonas* spp. Physiol. Plant Pathol., 6, 117-124.
DEWICK P.M., MARTIN M. (1979) Biosynthesis of 2'aribensofuran phytoalexin vignafuran in *Vigna unguiculata*. Phytochemistry, 18, 1309-1317.
MOESTA P., GRISEBACH H. (1982) L-2-Aminoxy-3-phenylpropionic acid inhibits phytoalexin accumulation in soybean with concomintant loss of resistance against *Phytophtora megasperma* f. *sp. glycinea*. Physiol. Plant Pathol., 21, 65-70.
MULLER K.O. (1961) The phytoalexin concept and its methodological significance. Recent Advn. Bot., 1, 396-400.
PRYCE R.J., LANGCAKE P. (1977) Viniferin, an antifungal resveratrol trimer from grapevines. Phytochemistry, 16,1452-1454.
RAGG H., KUHN D.N., HAHLBROCK K. (1981) Coordinated regulation of 4-coumarate : CoA ligase and phenylalanine ammonia-lyase mRNAs in cultured plant cells. J. Biol. Chem., 256, 10061-10065.
ROSSALL S., MANSFIELD J.W., HUTSON R.A. (1980) Death of *Botrytis cinerea* and *B. fabae* following exposure to wyerone derivatives *in vitro* and during infection development in broad bean leaves. Physiol. Plant Pathol., 16, 135-146.
SATO K., ISHIGURI Y., DOKE N., TOMIYAMA K., YAGIHASHI F., MURAI A., KATSUI N., MASAMUNE T. (1971) Biosynthesis of the sesquiterpenoid phytoalexin reshitin from acetate via oxylubimin in potato. Phytochemistry, 17, 1901-1902.
SATO K., KITAZAWA K., TOMIYAMA K. (1971) The role of rishitin in localizing the invading hyphae of *Phytophtora infestant* in infection sites at the cut surfaces of potato tubers. Physiol. Plant Pathol., 1, 289-295.
SHIRATA A., TAKAHASHI K. (1982) Detection and production of antimicrobial substances in leaves of mulberry and other Moraceae tree plant. Bull Sericult. Exp. Stn., 28, 707-718.
SHIRATA A., TAKAHASHI K., TAKASUGI M., NAGAO S., MASAMUNE T. (1978) Antifungal and antibacterial activities of Phytoalexins Moracin A and B isolated from mulberry. Bull. Sericult. Exp. Stn., 27, 647-659.
SHIRATA A., TAKAHASHI K., TAKASUGI M., NAGAO S., ICHIKAWA S.I., UENO S., MUNOZ L., MASAMUNE T. (1982) Antimicrobial spectra of the compounds from mulberry (*Morus alba*). Bull Sericult. Exp. Stn., 28, 793-806.
SITTON D., WEST C.A. (1975) Casbene : an antifungal diterpene produced in cell-free extracts of *Ricinus communis* seedlings. Phytochemistry, 14, 1921-1925.
STOESSL A., UNWIN C.H., WARD E.W.B. (1972) Post infectional inhibitors from plants, 1. Capsidiol, an antifungal compound from *Capsicum frutescens*. Phytopathol. Z., 74, 141-152.
TAKASUGI L., NAGAO S., MASAMUNE T. (1982) Studies on phytoalexins of the Moraceae, 10. Structures of Dimoracin, a new natural Diels-Adler adduct from diseased mulberry. Chemistry letters, 8, 1217-1220.
TAKASUGI L., NAGAO S., MASAMUNE T., SHIRATA A., TAKAHASHI K. (1980) Studies on phytoalexins of the Moraceae VII Chalcomoracin, a natural Diels-Adler adduct from diseased mulberry.Chemistry letters, 12, 1573-1576.
TEGTMEIER K.J., VAN ETTEN H.D. (1982) The role of pisatin tolerance and degradation in the virulence of *Nectria haematococca* on peas ; a genetic analysis. Phytopathol., 72, 608-612.
VAN ETTEN H.D., MATTEWS P.S., TEGTMEIER K.J., DIETERT M.F., STEIN J.I. (1980) The association of pisatin tolerance and demethylation with virulence on pea in *Nectria haematococca*. Physiol. Plant Pathol., 16, 257-268.
VAN ETTEN H.D., PUEPPKE S.G. (1976) Isoflavonoid phytoalexins. *In* Biochemical Aspects of Plant-parasite Relationships, London, New York, San Fransisco : Academic Press 354 pp., 239-289.
WHEELER H. (1975) Plant Pathogenesis. Springer-Verlag, Berlin.
WHITNEY P.J. (1976) Microbial Plant Pathology. Hutchinson, London.
WOODWARD M.D. (1980) Phaseollin formation and metabolism in *Phaseolus vulgaris*. Phytochemistry, 19, 921-927.

YOSHIKAWA M., MASAGO H. (1982) Biochemical mechanism of glyceollin accumulation in soybean PP. 265-279 *In* Physiological and Biochemical basis Asada, Y, W.R. Bushnell, S. Ouchi and C.P. Vance (ed.) 1982. The plant infection. Springer-Verlag, Berlin.
YOSHIKAWA M., YAMAUCHI K., MASAGO H. (1979) Biosynthesis and biodegradation of glyceollin by soybean hypocotyls infected with *Phytospora megasperma* var. *sojae*. Physiol. Plant Pathol., 14, 157-169.

Note brève

LES PHYTOALEXINES ET LEUR ROLE DANS LA LUTTE CONTRE LA MALADIE, EN PARTICULIER CHEZ LE MURIER

SUBRATA BISWAS & K. SENGUPTA*

Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, 742 101, West Bengal, Inde.

Les phytoalexines sont des composés antimicrobiens d'un poids moléculaire faible dont l'action de défense est comparable à celle des animaux qui passe par la production d'anticorps. Les composés (phytoalexines) sont formés dans les cellules vivantes d'un hôte hypersensible en réponse à une infestation par un parasite (Muller, 1991 ; Cruickshank, 1963). De nombreuses études ont démontré que la réaction de résistance hypersensible est le mécanisme de défense le plus important chez les végétaux, chez lesquels une ou plusieurs cellules meurent lorsque la plante est exposée, soit à des agents non pathogènes, soit à une race ou à une souche d'un de ces agents non pathogènes à laquelle elle est résistante (incompatibilité). D'une manière ou d'une autre, la réaction d'hypersensibilité conduit à une réaction de résistance dans laquelle la mort des cellules participe à la défense de la plante ou active cette dernière. L'accumulation de phytoalexines est une réaction défensive, susceptible d'être générée par une réaction d'hypersensibilité, cette activation étant due à la libération de l'éliciteur endogène par les enzymes des cellules hypersensibles (Darwill et Albersheim, 1984). On a observé, d'après des études approfondies, que les phytoalexines sont des composés fongistatiques et bactériostatiques actifs même en faibles concentrations, et qu'elles sont absentes des cellules saines ou présentes en quantités infimes (Whitney, 1976). De plus, les agents non pathogènes y sont plus sensibles que les pathogènes, car la capacité de ces derniers à détruire les phytoalexines est plus efficace que celle des non pathogènes (Wheeler, 1975). Il est aussi prouvé que les phytoalexines se concentrent en plus grandes quantités lorsqu'elles réagissent à des pathogènes faibles, ou à des non pathogènes, que lorsqu'il s'agit de pathogènes virulents. Cependant, l'accumulation élevée de composés en réponse aux pathogènes faibles et aux non pathogènes n'est pas seulement causée par une synthèse plus importante, mais également par une suppression de la biodégradation des composés synthétisés (Yoshikawa et Masago, 1982). Les plantes résistantes les accumulent plus rapidement que les plantes sensibles et ces composés sont plus spécifiques de l'hôte que de l'agent pathogène ; la réaction de base de leur formation est liée davantage à l'hôte qu'à l'agent pathogène (Whitney, 1976). Des études ont permis d'établir que des agents chimiques, physiques et biotiques qui induisent la résistance à la maladie stimulent également la synthèse des phytoalexines. Par conséquent, les phytoalexines sont généralement définies comme des antibiotiques produits dans des interactions plantes-agents pathogènes ou comme une réponse à une attaque ou à d'autres stimulants physiologiques (Kuc, 1972).

La biosynthèse des phytoalexines a été étudiée de manière plus large chez les légumineuses. Les phytoalexines trouvées dans cette famille indiquent que la formonétine est le précurseur isoflavone des phytoalexines vésitol, sativan, et que la médicarpine et la daidzéine sont respectivement les précurseurs de la glycéolline et de la phaséolline. Les voies de biosynthèse ont été déterminées pour la maackiaine chez le trèfle (Dewick et Ward, 1978) ; la vésitole, lesativan, et la médicarpine chez la luzerne (Dewick et Martin, 1979) ; la pisatine chez le petit pois (Van Etten et Puepke, 1976) ; le vignafurane chez *Vigna sinensis* (Martin et Dewick, 1979) ; la glycéolline chez le soja (Yoshikawa et coll., 1979) et la phaséolline chez le haricot (Woodward, 1980). L'ensemble de ces phytoalexines

*Adresse actuelle : "Tulip", B-9/27, Kalyani 741 235, West Bengal, Inde.

dérive de la condensation d'une unité de cinnamyl CoA et de trois unités d'acétyl-CoA. Les produits immédiats de la condensation de l'acétate et du cinnamate sont les chalcones qui s'isomérisent d'abord en flavones puis donnent naissance aux isoflavones comme la daidzéine et la formonétine. L'orchinol des orchidés (Fisch et coll., 1973) et la viniférine du raisin (Pryce et Langcake, 1977), phytoalexines issues d'autres familles végétales, sont apparemment dérivées de stilbènes comme le resvératol qui est également une phytoalexine de l'arachide (Harborne et Ingham, 1978). Les stilbènes sont dérivés du cinnamate et de l'acétate. Les momilactones du riz (Cartwright et coll., 1977), le casbène de la graine de ricin (Sitton et West, 1975), le capsidiol du poivre (Steossl et coll., 1972), le désoxyhémigossypol, l'hémigossypol et le gossypol du coton (Bell et Stipanovic, 1978) et l'ipoméamarone de la patate douce (Kato et coll., 1973) sont des terpénoïdes dérivés de l'acide mévalonique.

Chez le mûrier, les phytoalexines se forment dans les 12 heures après l'infestation et leur formation dure environ 4 jours (Shirata et Takahashi, 1982). La nature chimique des phytoalexines du mûrier présente un éventail large de benzofuranes et de stilbènes. Les composés à base de benzofurane, comme la moracine AH, la moracine M, la chalcomoracine et la dimoracine, et les composés à base de stilbènes, à savoir : l'oxyresvératrol et le 4-prényloxyresvératrol, sont tous présents dans les différents organes du mûrier malade et sont considérés comme des phytoalexines (Takasugi et coll., 1980, 1982 ; Shirata et coll., 1982 ; Burke et Stevenson, 1985 ; Bose, 1989). La plupart des phytoalexines inhibent un grand nombre d'espèces fongiques et bactériennes. L'activité antifongique de la moracine A (MA) est très forte, tandis que celle de la moracine B (MB) est plus faible. De plus, l'effet de la MB diminue à forte concentration en raison de la propension à cristalliser, le cristal de la MB n'inhibant pas la germination des conidies et la croissance des tubes germinaux. Les agents pathogènes du mûrier sont plus tolérants à la MA et à la MB que les agents non-pathogènes. Cependant, on a observé un relation entre la pathogénicité de *Fusarium solani* f. sp. *mori*, de *F. lateritium* f. sp. *mori*, de *F. roseum* (agents pathogènes de la flétrissure du mûrier) et leur tolérance à la MA et à la MB (Shirata et coll., 1978). La moracine C et la moracine B inhibent complètement la croissance fongique de *Rosellinia necatrix* (agent pathogène de la rouille blanche de la racine) et celle de *Sclerotium triforiorum* mais pas celle de *Pyrenophora graminea*. De nombreuses espèces d'*Agrobacterium*, de *Bacillus*, de *Corynebacterium* et de *Streptomyces* sont sensibles à la plupart des phytoalexines. Parmi ces dernières, la moracine M est un antibiotique relativement fort et l'oxyresvératrol ne présente aucune activité antimicrobienne (Shirata et coll., 1982).

Un grand nombre d'études viennent appuyer la théorie de la fonction de résistance à la maladie des phytoalexines. La capacité à accumuler les phytoalexines est largement répandue chez les plantes supérieures, aussi bien chez les monocotylédones que chez les dicotylédones. L'existence de cette capacité dans l'ensemble du règne végétal contribue à l'hypothèse de la fonction de défense de ses composés et de leurs propriétés antibiotiques bien connues. Le fait que les phytoalexines soient absentes des plantes saines et s'accumulent dans le site d'infestation microbienne supporte également l'idée de la fonction de défense des phytoalexines. De nombreuses études ont démontré que les phytoalexines non seulement s'accumulent au site d'infestation mais que leur activation suit la pénétration par le microbe de manière suffisamment rapide et en concentration suffisamment élevée pour inhiber aussi bien la croissance des champignons (Sato et coll., 1971 ; Baily, 1974 ; Rossall et coll., 1980) que celle des bactéries (Lyon et Wood, 1975).

On a également prouvé que les phytoalexines jouent un rôle important dans la défense contre les agents pathogènes en démontrant que l'inhibition de la phénylalanine ammonialyase chez le soja par l'acide L-2-amino-3-phényl-propionique entraînait une perte de résistance à *Phytophthora megasperma* f sp. *glycinea*, le champignon pathogène responsable de la rouille de la racine et de la tige chez son hôte, le soja. La phénylalanine ammonialyase est la première enzyme de la voie biosynthétique des phytoalexines ptérocarpanes du soja. L'inhibition de cette enzyme entraîne une diminution de la teneur en phytoalexine ainsi qu'une perte de résistance à l'agent pathogène (Moesta et Grisebach, 1982). La preuve la plus indiscutable que les phytoalexines permettent de déterminer si une plante est sensible ou résistante à l'infestation a été obtenue par des études de corrélation entre la virulence de l'infestation chez le petit pois et la tolérance à la phytoalexine pisatine par *Nectria haematococca*, le champignon pathogène responsable de la rouille de la racine et de la tige chez cette plante (Van Etten et coll., 1980 ; Tegtmeier et Van Etten, 1982). Dans ces études, il a été observé que

les isolats de *N. haematoeocca,* qui sont hautement tolérants à la pisatine et sont capables de la déméthyler, se sont cependant révélés incapables de provoquer une infestation significative chez les petits pois. On a démontré que la capacité à tolérer les phytoalexines ne suffit pas à rendre un microbe pathogène. Les données obtenues appuient également l'hypothèse que l'accumulation de phytoalexines peut constituer un mécanisme efficace de résistance aux maladies chez les végétaux.

L'augmentation de l'accumulation des phytoalexines dans le tissu végétal à l'aide d'éliciteurs constitue une méthode récente d'approche dans la lutte contre les maladies des végétaux. Le terme "éliciteur" fait référence aux molécules qui induisent les végétaux à synthétiser des phytoalexines. Ce terme s'applique aussi bien aux éliciteurs biotiques, par exemple les hydrates de carbone complexes issus des parois cellulaires des végétaux et des champignons, qu'aux éliciteurs abiotiques, par exemple : les métaux lourds et les rayons UV. Les éliciteurs gouvernent le métabolisme des cellules réceptives des végétaux. Peu après exposition aux éliciteurs, on observe un arrêt de la croissance et de l'alimentation des cellules végétales et une synthèse d'ARNm et d'enzymes nécessaires à la synthèse des phytoalexines (Ebel et coll., 1976 ; Ragg et coll., 1981). On a déterminé que les éliciteurs peuvent induire, dans les 30 minutes, les cellules réceptives à synthétiser les ARNm codant pour les enzymes de synthèse des phytoalexines (Hahlbrock et coll., 1981 ; Ragg et coll., 1981). Au cours de cette période, les ARNm codant pour ces enzymes peuvent se recopier en nombre relativement important. Les avantages des éliciteurs par rapport aux substances de protection des végétaux traditionnelles résident dans le fait qu'ils agissent *in vivo* après absorption dans le tissu de l'hôte et peuvent y initier une défense statique contre une attaque éventuelle de l'agent pathogène ainsi qu'un potentiel de défence dynamique qui continuera à fonctionner pendant un certain temps. L'intérêt de cette approche tient principalement au fait qu'il devient possible d'activer de manière artificielle certaines des séries normales de réactions qui caractérisent la plante hôte tout en les maintenant prêtes dans l'attente d'une infestation éventuelle. Ceci impliquerait une activation, sous l'influence de l'éliciteur, du potentiel de défense dynamique naturel qui reste, d'une certaine manière, inactif lorsqu'il y a compatibilité de l'interaction hôte-pathogène. Cette méthode est donc plus proche et plus appropriée au système de défense des végétaux qu'aucune des autres formes de défense chimiques utilisées jusqu'à présent. Au vu de ces avantages et des conséquences aléatoires de l'utilisation continue et excessive des composés toxiques de type fongicide, la possibilité de réguler les maladies du mûrier par l'utilisation des éliciteurs à base de phytoalexines mérite d'être étudiée de manière approfondie.

BIBLIOGRAPHIE - BIBLIOGRAPHY

Sériciculture générale 365
General sericulture

Mûrier 369
Mulberry

***B. mori* : élevage, nutrition, pathologie** 377
B. mori : rearing, feeding, pathology

Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie 385
Non-mulberry silkworms : rearing, feeding, pathology

Vers à soie : génétique 389
Silkworms : genetics

Vers à soie : physiologie, biochimie 393
Silkworms : physiology, biochemistry

Vers à soie : oeufs, embryologie 401
Silkworms : eggs, embryology

Vers à soie : glandes séricigènes 405
Silkworms : silkglands

Soie 407
Silk

INDICATIFS DES LANGUES UTILISEES - LANGUAGE SYMBOLS USED

(Bg) Bulgare / *Bulgarian.*
(D) Allemand / *German.*
(F) Français / *French.*
(I) Italien / *Italian*
(K) Coréen / *Korean.*
(Pt) Portuguais / *Portuguese.*
(Ro) Roumain / *Rumanian.*
(C) Chinois / *Chinese.*
(E) Anglais / *English.*
(J) Japonais / *Japanese.*
(Pl) Polonais / *Polish.*
(R) Russe / *Russian*
(S) Espagnol / *Spanish.*

Les lettres minuscules correspondantes sont utilisées pour indiquer la langue du résumé.
The corresponding small letters indicate the language of the summary.

Sériciculture générale

General sericulture

Discussion on the production situation of sericulture and our countermeasure.
Discussion sur la situation de la production séricicole et nos contre-mesures.
CHEN Q.
1993 Bulletin of Sericulture, Vol. 24(1), 1-4. (C)

Bivoltine silkworm rearing in the plains of West Bengal.
Elevage de vers à soie bivoltins dans les plaines du Bengale occidental.
DAS S.K., SINHA S.S., SEN S.K.
Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore 742 101, West Bengal, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(1), 44-46. (E)

Scope of high bush mulberry plantation in Bihar plateau.
Les plantations de mûriers à hautes tiges sur le plateau du Bihar.
GANGWAR S.K., SINHA P.S., SINGH B.D.
Regional Sericultural Research Station, Hehal, Ranchi 834 005, Bihar, India.
1993 Indian Silk, Vol. 31(12), 27-30. (E)

Socio-economic study of tasar culture.
Etude économique et sociale de l'élevage du tasar.
GOEL A.K., BRAHMACHARI B.N., THANDAPANI M., THANGAVELU K.
Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi 834 005, Bihar, India.
1993 Indian Silk, Vol. 31(12), 38-42. (E)

Indexing and review of ancient sericultural books in China.
Indexation et résumé de livres anciens sur la sériciculture en Chine.
HUA D.
Sericultural Research Institute, Shandong Province, Yantai 264002, China.
1992 Canye Kexue, Vol. 18(3), 184-194. (C,e)

An overview of the sericultural science facing the 21st century.
Panorama de la science séricicole à l'approche du XXIe siècle.
LÜ H.
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China.
1992 Canye Kexue, Vol. 18(3), 137-145. (C,e)

Sericulture in Murshidabad district - Past and present.
Passé et présent de la sériciculture dans le district de Murshidabad.
MANDAL S.K., SEN S.K.
Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore 742 101, West Bengal, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(1), 27-30. (E)

Varanasi silk industry - A survey.
L'industrie de la soie à Varanasi.
PATHAK S., DAS S., SHAMBHULIGAPPA, NAGABHUSHANAIAH Y.V., NADIGER G.S.
Central Sericultural Research and Training Institute, Madivala, Bangalore, India.
1993 Indian Silk, Vol. 31(12), 6-10. (E)

Prospects of sericulture in Tripura.
Perspectives de la sériciculture dans le Tripura.
PRASAD D.N., KUMAR R., CHOUDHURY M.
R.E.C., Central Silk Board, Agartala, Tripura, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(2), 12-14. (E)

Intensifying field-oriented research. Extension and training : must to promote bivoltine sericulture.
Intensification de la recherche sur le terrain. Vulgarisation et formation : passage obligé pour la promotion de la sériciculture bivoltine.
SHARMA V.P.
Regional Sericultural Research Station, Majra, Dehradun, Uttar Pradesh, India.
1993 Indian Silk, Vol. 31(12), 35-37 and 42. (E)

Uzi fly and its population trend in south eastern plateau.
La population de la mouche Uzi s'étend sur le plateau du sud-est.
SINGH I., KANT K., THANGAVELU K.
N.S.S.P., Bangalore, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(2), 15-18. (E)

An appropriate extension strategy to boost sericulture.
Une stratégie d'extension appropriée pour promouvoir la sériciculture.
SINGHVI N.R., CHIKKANNA, SEN A.K., SINHA A.K., IYENGAR M.N.S., DATTA R.K.
Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(1), 21-23. (E)

Mulberry sericulture industry in south Chotanagpur.
Industrie séricicole du mûrier dans le sud du Chotanagpur.
SINHA P.S., SINGH B.D., SINHA S.S.
Regional Sericultural Research Station, Ranchi, Bihar, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(2), 51-55. (E)

To establish the sericultural base presenting good quality, large yield and high efficiency according to the socialist market economic.
Etablir une base séricicole donnant une bonne qualité, un rendement important et une haute efficacité en accord avec l'économie du marché socialiste.
TANG X. *et al.*
1993 Bulletin of Sericulture, Vol. 24(1), 5-6. (C)

A comment on the egg production quality in Zhejiang Province.
Commentaire sur la qualité de la production d'oeufs dans la province de Zhejiang.
TAO T.
1993 Bulletin of Sericulture, Vol. 24(1), 7-9. (C)

Tasar silk industry in Uttar Pradesh.
Industrie de la soie du tasar dans l'Uttar Pradesh.
TRIPATHI A.
Regional Development Office, Central Silk Board, Lucknow, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(1), 24-26. (E)

Studies on the synthetic techniques to improve the quality and quantity of silkworm cocoons.
Etudes de techniques synthétiques pour l'amélioration de la quantité et de la qualité des cocons de vers à soie.
YANG D.Z., JIANG S.R., AO Y.Y., LI H.K., ZHENG M.E.
Sericultural Research Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China.
1993 Canye Kexue, Vol. 19(2), 80-83. (C,e)

A preliminary examination on characters of Botswana cocoons.
Examen préliminaire des caractères des cocons du Botswana.
ZHANG S., FENG L., LI L.
1992 Canye Kexue, Vol. 18(1), 56-57. (C)

Mûrier

Mulberry

Role of nitrogen in mulberry cultivation.
Rôle de l'azote dans la culture du mûrier.
BONGALE U.D.
Karnataka State Sericulture Development Institute, Talaghattapura, Bangalore 560 062, India.
1993 Indian Silk, Vol. 31(12), 14-16. (E)

Nitrogen fixing bacterial biofertilizer.
Biofertilisant bactérien fixant l'azote.
BONGALE U.D., DANDIN S.B.
Karnataka State Sericulture Development Institue, Thalagattapura, Bangalore 560 062, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(2), 28-33. (E)

Integrated nutrient management for sustainable mulberry production.
Gestion intégrée des substances nutritives pour une production de mûriers valable.
BOSE P.C., MUKHERJEE P.
Central Tasar Research and Training Institute, 29-B/B, Gandhinagar Extension-II, Jammu 180 004, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(2), 342. (E)

Mealy bug infestation in mulberry.
Infestation du mûrier par la cochenille.
CHATTERJEE K.K., SARKAR A.
Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(1), 19-20. (E)

Discussion on the fertilizing techniques of high-yield mulberry field.
Discussion sur les techniques de fertilisation des champs de mûriers à haut rendement.
CHEN P. *et al.*
1993 Bulletin of Sericulture, Vol. 24(1), 34-36. (C)

Preliminary reports on the investigation results of mulberry disease and pest in Zhejiang Province.
Rapports préliminaires sur les résultats de l'étude sur les maladies du mûrier et les nuisibles dans la province de Zhejiang.
CHOA J. *et al.*
1993 Bulletin of Sericulture, Vol. 24(1), 42-44. (C)

Influenta unor factori asupra compozitiei chimice a frunzei de dud. / The influence of a factor upon the chemical composition of mulberry leaves.
L'influence d'un facteur sur la composition chimique des feuilles de mûriers.
COTEANU O., RUSU V.
Central Sericultural Research Station, N° 69, Bucuresti-Ploiesti street, Bucharest, Sector 1, Romania.
1992 Medicina Veterinara si Cresterea Animalelor, Vol. XLII(11-12), 27-28. (Ro)

Soil testing kit : an easy tool for rapid soil analysis.
Kit pour tester le sol : un outil simple pour une analyse rapide du sol.
DUTTA R.N., MAJUMDER S.K., KAR R.
Central Tasar Research and Training Institute, Berhampore 742 101, West Bengal, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(2), 46-47. (E)

Constituents of Morus alba leaves.
Les composants des feuilles de Morus alba.
EL-KHRISY E.A.M., NASSAR M.I., ABU-MUSTAFA E.A.
1992 Fitoterapia, Vol. 63(1), 276-280. (E)

A novel way of determining the structure of artonin I, an optically active Diels-Alder type adduct, with the aid of an enzyme system of Morus alba cell cultures.
Une nouvelle méthode pour déterminer la structure de l'artonine I, un adduit de type Diels-Alder optiquement actif, avec l'aide d'un système enzymatique provenant de cultures de cellules de Morus alba.
HANO Y., AIDA M., NOMURA T., UEDA S.
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toho University, Funabashi, Chiba, Japan.
1992 J. Chem. Soc., Chem. Commun., Vol. 17, 1177-1178. (E)

Dynamic participation of primary metabolites in the biosynthesis of chalcomoracin and beta-sitosterol in Morus alba cell cultures.
Participation dynamique des métabolites primaires dans la biosynthèse de chalcomoracine et de beta-sitostérol dans des cultures de cellules de Morus alba.
HANO Y., AYUKAWA A., NOMURA T., UEDA S.
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toho University, Funabashi, Chiba, Japan.
1992 Naturwissenschaften, Vol. 79(4), 180-182. (E)

Agarose-gel electrophoresis of proteins in the mulberry leaves.
Electrophorèse en gel d'agarose des protéines des feuilles de mûriers.
ISHIZAKA T., OSHIGANE K.
1993 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 62(1), 75-77. (J)

Shoot organogenesis and plant regeneration in mulberry, Morus bombycis Koidz. : factors influencing morphogenetic potential in callus cultures.
Organogénèse des pousses et régénération végétale chez le mûrier Morus bombycis Koidz. : facteurs influençant le potentiel morphogénétique dans les cultures de cals.
JAIN A.K., DATTA R.K.
Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1992 Plant Cell Tgissue Organ Culture, Vol. 29(1), 43-50. (E)

Relationship between the amount and its ratio of N.P.K. fertilizer and the mulberry leaf yield. N.P.K. contents in mulberry leaves.
Relation entre la quantité et la proportion de N.P.K. d'un engrais et le rendement en feuilles des mûriers. Contenus en N.P.K. dans les feuilles de mûrier.
JIANG S. *et al.*
1993 Bulletin of Sericulture, Vol. 24(1), 10-13. (C)

Induction of calli and organ-like structures in isolated pollen culture of mulberry, Morus australis Poiret.
Induction de cals et de structures ressemblant à des organes dans une culture de pollen de mûrier Morus australis Poiret.
KATAGIRI K., MODALA V.
National Institute of Sericultural and Entomological Science, Ohwashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1993 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 62(1), 1-6. (E)

Factors affecting proliferation of shoot in mulberry axillary bud culture.
Facteurs affectant la prolifération des pousses dans la culture des bourgeons axillaires du mûrier.
KATASE M.
Chiba Sericulture Center, Togane, Chiba 283, Japan.
1993 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 62(2), 152-161. (J,e)

Detection of mycoplasmic organisms in the phloem sap collected from mulberry trees with dwarf disease.
Mise en évidence d'organismes micoplasmiques dans la sève du phloème provenant de mûriers atteints de nanisme.
KAWAKITA H., KATSUHARA M.
National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1993 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 62(2), 125-131. (J,e)

The cultivating technique of yielding 3000 kilograms of mulberry leaves per mu in Luxi Plain.
Technique de culture permettant un rendement de 3000 kilogrammes de feuilles de mûrier par "mu" dans la plaine de Luxi.
LI M. *et al.*
1993 Bulletin of Sericulture, Vol. 24(1), 20-22. (C)

Isolation of total RNA and mRNA from mulberry leaves.
Extraction d'ARN total et d'ARNm des feuilles de mûriers.
MACHII H.
National Institute of Agrobiological Resources, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1993 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 62(1), 78-80. (E)

Varietal differences in nutritive values of mulberry leaves for rearing silkworms.
Différences variétales dans les valeurs nutritives des feuilles de mûrier pour l'élevage des vers à soie.
MACHII H., KATAGIRI K.
National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1991 J.A.R.Q., Vol. 25(3), 202-208. (E)

In vitro growth of encapsulated adventitious buds in mulberry, Morus alba L.
Croissance in vitro de bourgeons adventifs encapsulés chez le mûrier Morus alba L.
MACHII H.
National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1992 Ikushugaku Zasshi, Vol. 42(3), 553-559. (E)

Cultivation technology for chawki mulberry garden.
Technologie de culture des mûraies utilisées pour l'élevage des jeunes vers à soie.
MISHRA R.K., CHOUDHURY P.C., SINGH G.B., DATTA R.K.
Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1993 Indian Silk, Vol. 31(12), 11-13. (E)

Effect of mercuric chloride on the pigment content of a mulberry plant.
Effet du chlorure de mercure sur le taux pigmentaire d'un plant de mûrier.
MOHAPATRA A., PANIGRAHI A.K.
1990 Pollut. Res., Vol. 10(3), 123-133. (E)

Cryopreservation of alginate-coated in vitro grown shoot tips of apple, pear and mulberry.
Cryoconservation des extrémités des pousses de pommier, de poirier et de mûrier, cultivées in vitro et recouvertes d'alginate.
NIINO T., SAKAI A.
Dept of Agrobiology, Faculty of Agriculture, University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.
1992 Plant Science, Vol. 87, 199. (E)

Studies on sex pheromone of mulberry clearwing moth.
Etudes sur la phéromone sexuelle de la sésie du mûrier.
PU G., DU H., MAO J., TAN Z., LIN G., LIU H.
Suzhou Sericulture College, 215151, China.
1992 Canye Kexue, Vol. 18(3), 159-163. (C,e)

Polyploidy and mulberry improvement.
Polyploïdie et amélioration du mûrier.
RAGHUNATH M.K., VIJAYAN K., CHAKRABORTY S.P., NARAYAN P., ROY B.N. *et al.*
Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore 742 101, West Bengal, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(2), 43-44. (E)

Vegetative propagation of mulberry, Morus alba Linn.
Propagation végétative du mûrier Morus alba Linn.
SARMA P.C., BORUAH P., BORDOLOI D.N.
Regional Research Laboratory, Jorhat 785 006, Assam, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(1), 37-39. (E)

Studies on wood cutting of mulberry 'Husang' in the warm bed with heating wire.
Etudes de boutures du mûrier "Husang" disposées sur un lit chauffé par une résistance.
SHEN Z., HU Z., WANG C., YANG H., MA Y.
Suzhou Sericultural College, Suzhou 215151, China.
1992 Canye Kexue, Vol. 18(4), 220-226. (C,e)

Selection of the natural bud-mutation mulberry variety-Fengweiyabian.
Sélection de la variété de mûriers à bourgeons mutants spontanés Fengweiyabian.
SHI B., XIA M., WU Z., WANG D.
Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China.
1992 Canye Kexue, Vol. 18(3), 146-149. (C,e)

Role of biotechnology in muga food plants improvement.
Rôle de la biotechnologie dans l'amélioration des plantes nourricières du muga.
SIDDIQUI A.A., RAJARAM, BASUMATARY B.K., SENGUPTA A.K.
Regional Muga Research Station, Boko, Kamrup, Assam 781 123, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(1), 33-36. (E)

Mulberry breeding with special reference to mutation and ploidy breeding.
Sélection de mûriers en fonction de leurs mutations et de leur ploïdie.
SIKDAR A.K.
Regional Sericultural Research Station, Allikuttai Post, Gandhinagar, Salem 636 003, India.
1993 Indian Silk, Vol. 31(12), 43-45. (E)

Galls on primary muga food plants and their control.
Les galles des plantes nourricières primaires du muga et leur contrôle.
SINGH P.K.
Regional Muga Research Station, Boko, Kamrup, Assam 781 123, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(1), 16-18. (E)

Effect of drought on the permeability of plasma membrane and proline accumulation of mulberry tree.
Effet de la sècheresse sur la perméabilité de la membrane plasmatique et l'accumulation de la proline chez le mûrier.
SONG H., XU J., ZHAO Z.
Department of Sericulture, Anhui Agriculture College, Hefei 230061, China.
1992 Canye Kexue, Vol. 18(2), 65-70. (C,e)

Triazole induced stomatal closure and reduced transpiration in Morus multicaulis Perr.
Le triazol induit la fermeture stomatique et réduit la transpiration chez le mûrier Morus multicaulis Perr.
SREEDHAR V.M., SHREE M.P.
1992 Goebios, Vol. 19(1), 6-9. (E)

Retardation of senescence by triazoles in excised mulberry leaf discs.
Retardement de la sénescence sur des disques de feuilles de mûriers excisés grâce aux triazoles.
SREEDHAR V.M., SHREE M.P., BORAIAH G.
1992 Comp. Physiol. Ecol., Vol. 17(1), 21-27. (E)

Integrated nutrient supply system for mulberry.
Un système intégré pour l'approvisionnement en substances nutritives des mûriers.
SURYANARAYANA N.
Regional Sericultural Research Station, Anantpur, Andhra Pradesh, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(2), 5-8. (E)

Quantitative analysis of chlorophylls in six mulberry varieties without maceration.
Analyse quantitative des chlorophylles de six variétés de mûriers sans macération.
SURYANARAYANA N., MURTHY T.C.S.
Central Tasar Research and Training Institute, Central Silk Board, Post Hehal, Ranchi 834 005, Bihar, India.
1990 Bio. Mem., Vol. 16(1-2), 37-41. (E)

Mulberry leaf yield forecast by using accumulative temperature during April and May.
Prévisions de rendement d'une mûraie grâce à l'accumulation de température en avril et mai.
TANG X.
1993 Canye Kexue, Vol. 19(1), 58-60. (C)

Essential nutrients of mulberry and their importance.
Substances nutritives essentielles du mûrier et leur importance.
THIAGARAJAN V., NAGARAJ B., RAMESH BABU M., BHARGAVA S.K.
Regional Sericultural Research Station, P.B. N 21, Coonoor 634 101, Nilgiris district, Tamil Nadu, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(2), 35-37. (E)

Galls on primary muga food plants and their control.
Les galles des plantes nourricières primaires du muga et leur contrôle.
SINGH P.K.
Regional Muga Research Station, Boko, Kamrup, Assam 781 123, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(1), 16-18. (E)

Effect of drought on the permeability of plasma membrane and proline accumulation of mulberry tree.
Effet de la sècheresse sur la perméabilité de la membrane plasmatique et l'accumulation de la proline chez le mûrier.
SONG H., XU J., ZHAO Z.
Department of Sericulture, Anhui Agriculture College, Hefei 230061, China.
1992 Canye Kexue, Vol. 18(2), 65-70. (C,e)

Triazole induced stomatal closure and reduced transpiration in Morus multicaulis Perr.
Le triazol induit la fermeture stomatique et réduit la transpiration chez le mûrier Morus multicaulis Perr.
SREEDHAR V.M., SHREE M.P.
1992 Goebios, Vol. 19(1), 6-9. (E)

Retardation of senescence by triazoles in excised mulberry leaf discs.
Retardement de la sénescence sur des disques de feuilles de mûriers excisés grâce aux triazoles.
SREEDHAR V.M., SHREE M.P., BORAIAH G.
1992 Comp. Physiol. Ecol., Vol. 17(1), 21-27. (E)

Integrated nutrient supply system for mulberry.
Un système intégré pour l'approvisionnement en substances nutritives des mûriers.
SURYANARAYANA N.
Regional Sericultural Research Station, Anantpur, Andhra Pradesh, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(2), 5-8. (E)

Quantitative analysis of chlorophylls in six mulberry varieties without maceration.
Analyse quantitative des chlorophylles de six variétés de mûriers sans macération.
SURYANARAYANA N., MURTHY T.C.S.
Central Tasar Research and Training Institute, Central Silk Board, Post Hehal, Ranchi 834 005, Bihar, India.
1990 Bio. Mem., Vol. 16(1-2), 37-41. (E)

Mulberry leaf yield forecast by using accumulative temperature during April and May.
Prévisions de rendement d'une mûraie grâce à l'accumulation de température en avril et mai.
TANG X.
1993 Canye Kexue, Vol. 19(1), 58-60. (C)

Essential nutrients of mulberry and their importance.
Substances nutritives essentielles du mûrier et leur importance.
THIAGARAJAN V., NAGARAJ B., RAMESH BABU M., BHARGAVA S.K.
Regional Sericultural Research Station, P.B. N 21, Coonoor 634 101, Nilgiris district, Tamil Nadu, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(2), 35-37. (E)

Mulberry for environmental food security.
Le mûrier comme sécurité alimentaire de l'environnement.
VENKATEAH M., CHINNASWAMY K.P., RAJU M., DEVALAH M.C.
Department of Sericulture, University of Agricultural Sciences, G.K.V.K. Campus, Bangalore 560 065, India.
1993 Indian Silk, Vol. 31(12), 34. (E)

Breeding of cold-resistant mulberry variety 'Longsang 1'.
Sélection de la variété de mûriers résistants au froid "Longsang 1".
WANG J., YANG D., YANG Y.
Heilongjiang Sericultural Research Institute, Haerbin 150086, China.
1993 Canye Kexue, Vol. 19(1), 1-5. (C,e)

Primary studies on the technique of establishing the mulberry field directly after planting of grafted saplings.
Etudes préliminaires sur la technique d'installation d'un champ de mûriers immédiatement après la plantation des plants greffés.
WANG M.
1993 Bulletin of Sericulture, Vol. 24(1), 16-19. (C)

Studies on controlling mulberry red spider-mite (Tetranychus cinnabarinus Boisduval) by spraying amitraz.
Lutte contre le trétranyque du mûrier (Tretranychus cinnabarinus Boisduval) par pulvérisation d'amitraz.
WU F.A., TIAN L.D.
Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China.
1993 Canye Kexue, Vol. 19(2), 70-74. (C,e)

Identification of mulberry germplasm's resistance to mulberry yellow dwarf disease.
Détermination de la résistance d'une collection de mûriers au nanisme jaune.
WU Z., CHEN P., XIA M., SHI B.
Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China.
1992 Canye Kexue, Vol. 18(1), 6-11. (C,e)

Preparation of monoclonal antibody of mycoplasma-like organism from mulberry yellow dwarf disease.
Préparation d'anticorps monoclonaux contre un organisme analogue au mycoplasme isolé de mûriers atteints de nanisme jaune.
XIA Z.
Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China.
1993 Canye Kexue, Vol. 19(1), 6-8. (C,e)

A low cost home propagator for sericigenous plants.
Un germoir à bas prix pour les plantes séricigènes.
YADAV G.S., GOSWAMI B.C.
National Sericulture Project, Jagdalpur 494 001, Madhya Pradesh, India.
1993 Indian Silk, Vol. 31(12), 47-51. (E)

Effect of inorganic nitrogen sources on adventitious bud formation from leaf cultures in mulberry.
Effect des sources d'azote inorganique sur la formation des bourgeons adventifs dans les cultures de feuilles de mûriers.
YAMANOUCHI H., MACHII H., KATAGIRI K.
National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1993 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 62(2), 145-151. (J,e)

To raise the survival rate of transplanting through stoutening the green wood cutting seeding.
Augmenter le taux de survie en rendant plus résistantes les boutures de bois vert.
YAN K.
1993 Bulletin of Sericulture, Vol. 24(1), 38-39. (C)

The changes of the cytokinin contents in stored mulberry leaves.
Variations des taux de cytoquinines dans les feuilles de mûriers stockées.
YANAGISAWA Y., SHIOIRI H., IKEURA T., KIKUCHI H., NAIITO M., PING L.X.
1993 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 62(2), 168-170. (J)

Progress in polyploidy study and polyploid breeding of mulberry.
Progrès dans l'étude de la polyploïdie et la sélection de mûriers polyploïdes.
YANG J., YANG X., LUO C.
Sericultural Research Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China.
1992 Canye Kexue, Vol. 18(3), 195-201. (C,e)

Studies on the effect of pretreatment of inverse planting of Hu mulberry cuttings to root promotion.
Etudes de l'effet du prétraitement de plantation inverse de boutures de mûriers Hu pour la stimulation du racinement.
YE W., YE C., XU Y. *et al.*
1992 Canye Kexue, Vol. 18(1), 58. (C)

Development of high efficient scale-killer and experiment in controlling white scales of mulberry.
Développement d'un pesticide très efficace contre les cochenilles utilisé sur les cochenilles blanches du mûrier.
YE Z.Y., LIN J.X., CHEN X.K., ZHOU W.C.
Department of Sericulture, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029, Shina.
1993 Canye Kexue, Vol. 19(2), 75-80. (C,e)

A test on the proper ratio of N.P.K. in the germination hastening fertilizer.
Test sur le taux approprié de N.P.K. dans l'engrais accélérateur de germination.
ZHANG A.
1993 Bulletin of Sericulture, Vol. 24(1), 27-28. (C)

B. mori : élevage, nutrition, pathologie

B; mori : rearing, feeding, pathology

Analysis of the mechanism of nonsusceptibility to the densonucleosis virus (densovirus) type-2 in the silkworm, *Bombyx mori*, using a genetic mosaic.
Analyse du mécanisme de l'insensibilité au virus de la densonucléose (densovirus) de type 2 chez le ver à soie *Bombyx mori*, par utilisation d'une mosaïque génétique.
ABE H., YOKOHAMA T., OSHIKI T., KOBAYASHI M.
Faculty of Agriculture, Tokyo University and Technology, Fuchu, Tokyo 113, Japan.
1993 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 62(1), 38-44. (J,e)

Suppression of protein structure destabilizing mutations in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins by second site mutations.
Suppression de mutations déstabilisant les structures protéiques des endotoxines delta par mutations du second site chez *Bacillus thuringiensis*.
ALMOND B.D., DEAN D.H.
1993 Biochemistry, Vol. 32, 1040-1046. (E)

Has *Exorista sorbillans* (Wiedemann) become host specific to *Bombyx mori* L. ?
Exorista sorbillans (Wiedemann) devient-elle spécifique de *Bombyx mori* L. ?
BANNERJEE K.
Regional Sericultural Research Station, Mothabari, Malda 732 207, West Bengal, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(2), 19-20. (E)

MIS (management information system) takes its toll on Uzi fly.
Le système d'information de gestion repousse la mouche Uzi.
BHATTACHARYA S.S., CHAKRABORTY N.
Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore 742 101, West Bengal, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(2), 48-50. (E)

Noi hibrizi de viermi de matase destinati cresterilor de primavara. / New silkworm hybrids destinated to spring breeding.
Nouveaux hybrides de vers à soie destinés à l'élevage de printemps.
BRASLA A., MATEI A.
Central Sericulutral Research Station, N° 69, Bucuresti-Ploiesti street, Bucharest, Sector 1, Romania.
1992 Medicina Veterinara si Cresterea Animalelor, Vol. XLII(11-12), 12-14. (Ro)

Silkworm seed cocoon crop management.
Gestion de la récolte des cocons de vers à soie pour le grainage.
CHINNASWAMY K.P., VISVESWARA GOWDA B.L., DEVAIAH M.C.
Department of Sericulture, University of Agricultural Sciences, GKVK, Bangalore 560 065, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(1), 40-43. (E)

Cercetari privind evolutia ponderala si continutul in apa a gogosilor de matase crude (specia *Bombyx mori* L.). / Research on the ponderal evolution and the water contents of raw cocoons (species *Bombyx mori* L.).
Recherche sur l'évolution pondérale et le contenu en eau des cocons frais chez *Bombyx mori* L.
COTEANU O., POPESCU M.
Central Sericultural Research Station, N° 69, Bucuresti-Ploiesti street, Bucharest, Sector 1, Romania.
1992 Medicina Veterinara si Cresterea Animalelor, Vol. XLII(11-12), 25-26. (Ro)

Disinfectant effect and mechanism of sodium dichloroisocyanurate on *Bacillus thuringiensis*.
Effect désinfectant et mécanisme d'action du dichloroisocyanurate de sodium sur *Bacillus thuringiensis*.
CUI Y., SHAO Z., MU Z.
Shandong Agricultural University, Taian 271018, China.
1993 Canye Kexue, Vol. 19(1), 19-24. (C,e)

Characterization of Nistari breed - Its past and present trend.
Caractéristiques de la race Nistari - Ses tendances passées et actuelles.
DAS S.K., SEN S.K., CHATTOPADHYAY S., NAIR B.P., SINHA S.S.
Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore 742 101, West Bengal, India.
1993 Indian Silk, Vol. 31(12), 31-33. (E)

Effect of certain pharmaceutical vital compounds on the productivity of mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombicidae).
Effet de certains composés pharmaceutiques vitaux sur la productivité du ver à soie du mûrier *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombicidae).
EL-SAYED N., MESBAH H.A.A.
1992 Alexandria Sci. Exch., Vol. 13(2), 229-244. (E)

Studies on *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus with tetragonal polyhedron.
Etudes du virus de la polyèdrose nucléaire à polyèdres tétragonaux chez *Bombyx mori*.
GONG C., LU K.
Suzhou Sericultural College, Suzhou 215151, China and South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China.
1993 Canye Kexue, Vol. 19(1), 25-31. (C,e)

Effects of disinfectant 'Quanshawei' on the silkworm pathogens.
Effets du désinfectant "Quanshawei" sur les pathogènes du ver à soie.
HAUNG K., LU Y., QIN G., SHEN Z.
Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China.
1992 Canye Kexue, Vol. 18(4), 232-236. (C,e)

Infection and proliferation of microsporidians pathogenic to the silkworm, *Bombyx mori* L. and Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi* in Lepidopteran cell lines.
Infestation et prolifération de microsporidies pathogènes pour le ver à soie *Bombyx mori* L. et le ver à soie du chêne japonais *Antheraea pernyi* dans des lignées de cellules de Lépidoptères.
HAYASAKA S., SATO T., INOUE H.
National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1993 Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci., No. 7, 47-63. (J,e)

Know more about formaldehyde.
En savoir plus sur la formaldéhyde.
HIMANTHARAJ M.T., RAJAN R.K., SHIVAKUMAR G.R., DATTA R.K.
Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(1), 31-32. (E)

In vitro multiplication of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus.
Multiplication in vitro du virus de la polyédrose nucléaire chez *Bombyx mori*.
IMANISHI S., INOUE H., KOBAYASHI J., OKUDA-KADONO K., KAWAMOTO H. *et al.*
National Institute of Seric. and Entomol. Sci., Dept of Insect Genetics and Breeding, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1993 Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci., No. 7, 9-29. (J,e)

Nutritive effects of asparagine and glutamine on the silkworm, *Bombyx mori*.
Effets nutritifs de l'asparagine et de la glutamine sur le ver à soie *Bombyx mori*.
ITO T., INOKUCHI T.
Sericultural Experiment Station, Yatabe, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1992 Appl. Entomol. Zool., Vol. 27, 575-586. (E)

Isolation and purification of beta-carotene from silkworm feces.
Isolement et purification du beta-carotène des matières fécales du ver à soie.
JI P., HUANG Z.
South China Agricultural University, Guangzhou, China.
1991 Canye Kexue, Vol. 17(3), 169-172.

Identification and characterization of the p35-gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus that prevents virus induced apoptosis.
Identification et caractérisation du gène p35 du virus de la polyèdrose nucléaire empêchant l'apoptosis induite par le virus chez *Bombyx mori*.
KAMITA S.G., MAJIMA K., MADEA S.
Faculty of Agriculture, Tottori University, Tottori 680, Japan.
1993 J. Virol., Vol. 67, 455. (E)

Insect growth regulating activity of 1,5-disubstituted imidazoles against *Bombyx mori* and *Oncopeltus fasciatus*.
Activité de régulateurs de croissance d'insectes des imidazoles disubstitués en 1,5 contre *Bombyx mori* et *Oncopeltus fasciatus*.
KUWANO E., HISANO T., ETO M., SUZUKI K., UNNITHAN G.C., BOWERS W.C.
Laboratory of Applied Entomology, Faculty of Iwate University, Morioka 020, Japan.
1992 Pestic. Sci., Vol. 34(3), 263-268. (E)

Breeding of silkworm variety for sex differentiation by using cocoon fluorescences.
Sélection de variétés de vers à soie pour le sexage grâce à la fluorescence des cocons.
LIU J. *et al.*
1992 Canye Kexue, Vol. 18(4), 258-259. (C)

A technique model of cultivating and rearing suitable for the flood bed mulberry field to produce 100, 200 kilograms of cocoons per mu.
Modèle de technique de culture et d'élevage pour un champ de mûriers situé dans un lit d'inondation pour produire 100, 150, 200 kilogrammes de cocons par "mu".
LOU Y.
1993 Bulletin of Sericulture, Vol. 24(1), 23-26. (C)

Study on Canzuojing, a new compound disinfectant for silkworm body and rearing bed.
Etude sur le Canzuojing, un nouveau désinfectant pour le ver à soie et les claies.
LU K.M., XU X.Y., LIAO F.P., SU F., LIU J.P., ZHONG G.H., HUANG X.G.
South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China.
1993 Canye Kexue, Vol. 19(2), 91-99. (C,e)

Relation between mulberry feeding amount and cocoon weight, cocoon yield and filament quality on trimolting cocoon production.
Relation entre la quantité de feuilles de mûrier et le poids des cocons, le rendement en cocons et la qualité du filament dans la production de vers à soie trimuants.
LU X.
1992 Canye Kexue, Vol. 18(1), 49-52. (C)

Growth of mulberry synthetic seeds on vermiculite, sand and soil media.
Croissance des graines de mûrier sur vermiculite, sable et terreau.
MACHII H., YAMANOUCHI H.
National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1993 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 62(1), 85-87. (E)

Determinarea numarului optim de serii de cresfere a viermilor de matase din specia *Bombyx mori*, in diferite zone ale tarii. / Determination of the optimum number of series in silkworm breeding species, *Bombyx mori* in various zones of the country.
Détermination du nombre optimum de séries d'élevage de vers à soie *Bombyx mori* dans différentes régions du pays.
MATEI A., COTEANU O.
Central Seriucltural Research Station, N° 69, Bucuresti-Ploiesti street, Bucharest, Sector 1, Romania.
1992 Medicina Veterinara si Cresterea Animalelor, Vol. XLII(11-12), 18-21. (Ro)

Protein synthesis in pupae of the silkworm *Bombyx mori* after infection with nuclear polyhedrosis virus. Resistance to viral infection acquired during pupal period.
Synthèse des protéines chez la chrysalide du ver à soie *Bombyx mori* après infestation par le virus de la polyédrose nucléaire. Résistance à l'infestation virale acquise pendant le stade pupal.
MIKHAILOV V.S., ZEMSKOV E.A., ABRAMOVA E.B.
N.K. Zoltzov Institute of Development Biology, Academy of Sciences, Vavilov st. 26, Moscow 117808, Russia.
1992 J. General Virology, Vol. 73, 3195-3203. (E)

Expression of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus polyhedrin in insect cells by using a baculovirus expression vector, and its assembly into polyhedra.
Expression de la polyédrine de la polyédrose cytoplasmique de *Bombyx mori* dans des cellules d'insectes par l'utilisation d'un vecteur d'expression baculovirus et son assemblage dans le polyèdre.
MORI H., ITO R., NAKAZAWA H., SUMIDA M., MATSUBARA F., MINOBE Y.
Department of Applied Biology, Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Kyoto 606, Japan.
1993 J. Gen. Virol., Vol. 74, 99. (E)

Bacterial peptidoglycan as elicitor of antibacterial protein synthesis in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*.
Le peptidoglycane bactérien est un déclencheur de la synthèse de la protéine antibactérienne chez la larve de *Bombyx mori*.
MORISHIMA I., YAMADA K., UENO T.
Department of Agricultural Chemistry, Tottori University, Tottori 680, Japan.
1992 Insect Biochem. and Mol. Biol., Vol. 22, 363. (E)

Sorting cocoons by color sensor.
Triage des cocons avec un détecteur de couleur.
OHURA M., NISHIDE T.
1993 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 62(2), 171-174. (J)

Metode de prevenire si combatere a bolilor micotice la viermii de matase. / Methods of prevention and control of mycotic diseases in silkworms.
Méthodes de prévention et de lutte contre les mycoses des vers à soie.
PAU E.
Central Sericultural Research Station, N° 69, Bucuresti-Ploiesti street, Bucharest, Sector 1, Romania.
1992 Midecina Veterinara si Cresterea Animalelor, Vol. XLII(11-12), 3-7. (Ro)

Flora microbiana prezenta pe frunza de dud si patogenitatea fata de viermii de matase. / The microbian flora available on the mulberry leaves and its pathogene influence on the silkworms.
La flore microbienne présente sur les feuilles du mûrier et sa pathogènicité envers les vers à soie.
PAU E., COTEANU O.
Central Sericultural Research Station, N° 69, Bucuresti-Ploiesti street, Bucharest, Sector 1, Romania.
1992 Medicina Veterinara si Cresterea Animalelor, Vol. XLII(11-12), 10-11. (Ro)

Propagation of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus in continous cell line.
Propagation du virus de la polyédrose nucléaire dans une lignée de cellules continue.
PENG J.
1992 Canye Kexue, Vol. 18(4), 259-261. (C)

Evaluation of air-pump and heat-supply of cocoon dryer.
Evaluation de la pompe à air et du chauffage d'un séchoir à cocons.
PENG S.
1993 Canye Kexue, Vol. 19(1), 57-58. (C)

Stabilirea pierderilor de larve, pe virste larvare, in cresterile industriale de viermi de matase. / Establishing the lost of larvae, by larvae age, in industrial silkworm breeding.
Etablissement des pertes de vers à soie, par âge larvaire, dans des conditions d'élevage industriel.
POPESCU M.
Central Sericultural Research Station, N) 69, Bucuresti-Ploiesti street, Bucharest, Sector 1, Romania.
1992 Medicina Veterinara si Cresterea Animalelor, Vol. XLII(11-12), 22-24. (Ro)

Changes in the titer of bombyxin-immunoreactive material in hemolymph during the postembryonic development of the silkmoth, *Bombyx mori*.
Changement du titre des produits immunoréactifs vis à vis de la bombyxine dans l'hémolymphe de *Bombyx mori* au cours du développement post-embryonnaire.
SAEGUSA H., MIZOGUCHI A., KITAHORA H., NAGASAWA H., SUZUKI A., *et al.*
Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Tokyo 113, Japan.
1992 Dev. Growth Differ., Vol. 34, 595-605. (E)

Bazele genetice ale rezistentei viermilor de matase la boli si factori nefavorabili de mediu. / Genetic bases of resistance to diseases and unfavourable environment on the silkworms.
Bases génétiques de la résistance des vers à soie aux maladies et aux facteurs défavorables du milieu.
SAHBAZOV V.G., GOLOVKO V.A.
Institute of Sericulture, Merefa, Kharkov Region, 312060 Ukraine.
1992 Medicina Veterinara si Cresterea Animalelor, Vol. XLII(11-12), 8-9. (Ro)

Comparison of *Fusarium lateritium* and *F. roseum* 'Graminearum' growth rate due to different carbon sources.
Comparaison des taux de croissance de *Fusarium lateritium* et de *F. roseum* "Graminearum" en fonction de différentes sources de carbone.
SAITO H., YANAGISAWA K., CHINO S.
Tokushima Sericultural Experiment Station Experiment, Kamojima-Machi, Tokushima 776, Japan.
1993 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 62(1), 81-84. (J)

A design for auto controlled incubation chamber.
Plan d'une chambre d'incubation auto-contrôlée.
SEN A.K., SINGHVI N.R., SWAMY B.N.S., DATTA R.K.
Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(1), 50-51. (E)

The pathogenicity of large *Nosema* spores isolated from *Phyllobrotica armata* Baly to silkworm, *Bombyx mori*.
La pathogénicité vis à vis du ver à soie *Bombyx mori* des grandes spores de *Nosema* spores isolées sur *Phyllobrotica armata* Baly.
SHEN Z.H. *et al.*
1993 Canye Kexue, Vol. 19(2), 115-116. (C)

Safety tests for the use of an entomogenous fungus *Beauveria brongniartii*.
Tests de sécurité avant l'utilisation du champignon entomogène *Beauveria brongniartii*.
SHIMANE T., KAWAKAMI K.
National Institute of Sericultural Science, Tsukkuba, Ibaraki 305, Japan.
1993 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 62(1), 30-37. (J,e)

Chromosome length polymorphisms in *Beauveria bassiana*.
Polymorphismes de la longueur des chromosomes chez *Beauveria bassiana*.
SHIMIZU S., HIGASHIYAMA R., MATSUMOTO T.
Dept of Applied Biology, Fac. of Textile Sci., Institute of Technology, Mastugasaki, Kyoto 606, Japan.
1993 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 62(1), 45-49. (E)

Tips for rearing in rainy days.
Procédés d'élevage pendant les jours pluvieux.
SUBRAMANIAN R.K., GOPINATHAN O.K., KALAPPA H.K., PARAMESHWARA C.*et al.*
N.S.P., P2 Basic Seed Farm, Dharmapuri, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(2), 24-25. (E)

Induction of 3-molt silkworm by using of SD-III and its effect on silk quality.
Induction de trimuants chez le ver à soie par utilisation de SD-III et ses effets sur la qualité de la soie.
TAN S., KONG L., FAN H., GONG X., HAN Y., YAN R.
Sericultural Research Institute of Shandong, Yantai 264002, China.
1992 Canye Kexue, Vol. 18(4), 237-242. (C,e)

Production and characterization of monoclonal antibodies against occluded virions of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus.
Production et caractérisation des anti-corps monoclonaux contre des virions occlus du virus de la polyédrose nucléaire chez *Bombyx mori*.
TANIAI K., NISHIMORI K., MIYAMOTO K., YAMAKAWA M.
National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1993 Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci., No. 7, 31-46. (J,e)

A economic and effective heating device for rearing houses.
Equipement pour un chauffage économique et efficace des magnaneries.
THIAGARAJAN V., SREEKUMAR S., VIJAYARAGHAVAN K., *et al.*
Regional Sericultural Research Station, C.S.B., P.B. N 21, Coonoor 643 101, Nilgiris district, Tamil Nadu, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(2), 21-23. (E)

Fluorometric assay of potential change of *Bombyx mori* midgut brush border membrane induced by delta-endotoxine from *Bacillus thuringiensis*.
Dosage fluorométrique de la modification de la membrane pileuse de l'intestin moyen de *Bombyx mori* induite par la delta-endotoxine de *Bacillus thuringiensis*.
UEMURA T., IHARA H., WADANO A., HIMENO M.
Faculty of Textile Science, Kyoto University of Industrial Arts and Textile Fibers, Kyoto, Japan.
1992 Biosci. Biotechnol. Biochem., Vol. 56, 1976. (E)

The ultrastructure observation of primary cell culture of silkworm strain infected by *Bombyx mori* densonucleosis virus.
Observation de l'ultrastructure d'une culture de cellules primaire d'une souche de vers à soie infestés par le virus de la densonucléose.
WANG K.F. *et al.*
1993 Canye Kexue, Vol. 19(2), 113-115. (C)

Kinetic characterization of baculovirus-induced cell death in insect cell cultures.
Caractérisation cinétique de la mort de cellules induite par un baculovirus dans des cultures de cellules d'insectes.
WU S.C., DALE B.E., LIAO J.C.
1993 Biotechnol. Bioeng., Vol. 41(1), 104-110. (E)

Difference of feeding habit among silkworm races to the diet of different contents of mulberry leaf powder.
Différence d'habitudes alimentaires entre les races de vers à soie en fonction de la teneur en poudre de feuilles de mûriers dans l'aliment.
XU J. *et al.*
1993 Canye Kexue, Vol. 19(1), 44-46. (C)

A test method of the silkworm resistance to fluoride by using fluoride susceptibility index.
Méthode de test de la résistance du ver à soie au fluorure par utilisation de l'index de susceptibilité au fluorure.
YANG M., ZHU G., YAO Y.
Department of Sericulture, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029, China.
1992 Canye Kexue, Vol. 18(4), 227-231. (C,e)

Experiment of feeding young silkworms once a day under plane condition.
Essai de nourrissage des jeunes vers à soie une fois par jour.
YANG R., ZHUANG H.
1992 Canye Kexue, Vol. 18(1), 46-49. (C)

Induction of a novel protein kinase in pupae of the silkworm *Bombyx mori* after infection with nuclear polyhedrosis virus.
Induction d'une nouvelle protéine kinase dans la chrysalide du ver à soie Bombyx mori après infestation par le virus de la polyédrose nucléaire.
ZEMSKOV E.A., ABRAMOVA E.B., MIKHAILOV V.S.
N.K. Zoltzov Institute of Development Biology, Academy of Sciences, Vavilov st. 26, Moscow 117 808, Russia.
1992 J. General Virology, Vol. 73, 3231-3234. (E)

Virus-induced phosphoproteins in silkworm pupae infected with nuclear polyhedrosis virus.
Phosphoprotéines induites par le virus de la polyédrose nucléaire chez les chrysalides de vers à soie infectées.
ZEMSKOV E.A., ABRAMOVA E.B., MIKHAILOV V.S.
N.K. Zoltzov Inst. of Developmental Biol., Academy of Sci., Vavilov st. 26, Moscow 117 808, Russia.
1991 Biochemistry, Vol. 56, 1563. (E)

Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie

Non -mulberry silkworms : rearing, feeding, pathology

Research breakthrough in oak tasar.
Progression de la recherche sur le tasar du chêne.
BAJPAI A.K., SINHA A.K.
Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(1), 6-7. (E)

Control of the life cycle of the silkmoth, *Antheraea yamamai*. 8 : Rearing two generations of the wild silkmoth *Antheraea yamamai* throughout one year by artificial hatching with imidazole compound.
Contrôle du cycle du papillon du ver à soie *Antheraea yamamai*. 8 : Elevage de deux générations du ver à soie sauvage *Antheraea yamamai* au cours d'une année par éclosion artificielle à l'aide d'un composé d'imidazole.
HASHIOTO S., FUJISAWA T., KUWANO E., SUZUKI K.
Laboratory of Applied Entomology, Faculty of Iwate University, Morioka 020, Japan.
1992 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 61(4), 378-379. (J)

Non-mulberry sericulture.
Sériciculture des non-mûriers.
KAPILA M.L., SAHAY A.
Central Tasar Research and Training Institute, Piska Nagri, Ranchi 834 005, Bihar, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(2), 9-11. (E)

Bactericidal effect of antibacterial peptide D from chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi*.
Effet bactéricide du peptide antibactérien D du ver à soie du chêne chinois *Antheraea pernyi*.
LI W., LU K., HUANG Z., DAI Z., HUANG D.
South China Agricultural University, Guangzhou, China.
1991 Canye Kexue, Vol. 17(3), 163-168. (C,e)

A study on the practical technology of rearing *Antheraea yamamai*.
Etude des techniques d'élevages d'*Antheraea yamamai*.
MA W.
Sericultural Research Institute of Jilin Province, Kouqian 132200, China.
1992 Canye Kexue, Vol. 18(1), 30-34. (C,e)

New technique of tasar cocoon cooking and silk reeling.
Nouvelle technique d'étouffage et de dévidage de la soie des cocons tasar.
MOON M.A., CHANDRA SHEKAR M.N., THANGAVELU K.
Central Tasar Research and Training Institute, Post Hehal, Ranchi 834 005, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(2), 26-27. (E)

Cercetari comparative privind utilizarea diferitelor soiuri de ricin in cresterea viermilor de matase. / Comparative research regarding the use of various kinds of castor-oil plants in silkworm breeding.
Recherches comparatives au regard de l'utilisation de quelques variétés de ricin pour l'élevage des vers à soie.
POPESCU M., CIOVICA C.
Central Sericultural Research Station, N° 69, Bucuresti-Ploiesti street, Bucharest, Sector 1, Romania.
1992 Medicina Veterinara si Cresterea Animalelor, Vol. XLII(11-12), 29-32. (Ro)

Species of carabid beetles endangering the larvae of oak silkworms in China.
Les espèces de carabes menaçant les vers à soie du chêne en Chine.
QU T., QI K., ZHANG X., ZHANG Q., PEI Y.
Sericultural Research Institute of Liaoning Province, Fengcheng 118101, China.
1992 Canye Kexue, Vol. 18(1), 35-39. (C,e)

Role of nutrition in synthesis of tasar silk.
Rôle de la nutrition dans la synthèse de la soie du tasar.
SAHAY A., KAPILA M.L.
Central Tasar Research and Training Institute, Post Hehal, Ranchi 834 005, Bihar, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(1), 8-11. (E)

Weight loss in chemical processing of *A. proylei* pierced cocoons.
Perte de poids pendant le traitement chimique des cocons percés de *A. proylei*.
SANJAY KUMAR GUPTA, VARUN KULSHRESTHA
Central Tasar Research and Training Institute, Nagri, Ranchi 835 303, Bihar, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(2), 45. (E)

Ideal tasar grainage house and grainage techniques.
Magnanerie idéale et techniques de grainage pour le tasar.
SINGH M.K., JAISWAL J., THANGAVELU K.
Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi 834 005, Bihar, India.
1993 Indian Silk, Vol. 31(12), 21-26. (E)

Tasar reeling on mulberry charka with hydrogen peroxide cooking technique.
Dévidage de cocons tasar sur des charka mûriers avec la technique de cuisson au peroxyde d'hydrogène.
SIVAKUMAR M., JAGANATHAN K., MOON M.A., MAJHI S.K., THANGAVELU K.
Central Tasar Research and Training Institute, Post Hehal, Ranchi 834 005, Bihar, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(1), 47-49. (E)

Rearing of tropical tasar silkworm on sal flora.
Elevage du ver à soie tropical tasar sur sal (plante nourricière).
THANGAVALU K., SINHA B.R.R.PD., SINHA A.K., BANSAL A.K., KUMAR A.
Central Tasar Research and Training Insitute, Ranchi 834 005, Bihar,India.
1993 Indian Silk, Vol. 31(12), 52-55. (E)

Breeding of white cocoon variety 'Huabai 1' of Chinese tussah silkworm.
Sélection de la variété de ver à soie tussah chinois à cocons blancs "Huabai 1".
WANG Y., PENG N., LUO F.
Sericultural Research Institute of Heilongjiang Province, Haerbin 150086, China.
1993 Canye Kexue, Vol. 19(1), 37-43. (C,e)

An electrophysiological study on the structure activity relationship of sex pheromone and analogs of *Antheraea pernyi* female.
Etude électro-physiologique de la relation activité-structure de la phéromone sexuelle et de ses analogues chez la femelle d'*Antheraea pernyi.*
WU C.
Anhui Agricultural College, Department of Plant Protection, Heifei City, Anhui Province, China.
1991 Kunchong Xuebao, Vol. 34(3), 266-270. (C)

Breeding of two new varieties of Antheraea pernyi yantai n 6 and 789 and selection of its hybrid F1 combination.
Sélection de deux nouvelles variétés d'Antheraea pernyi yantai n 6 et 789 et de son hybride F1.
YANG H., SHEN X., Lü W., LIU Z., YU J., LOU Q., WANG P., JIANG S.
Silkworm Institute of Shandong Province, Yantai 264002, China.
1992 Canye Kexue, Vol. 18(3), 177-183. (C,e)

Vers à soie : génetique

Silkworms : genetics

Structural analysis on the single stranded genomic DNAs of the virus newly isolated from silkworm : the DNA molecules share a common termial sequence.
Analyse structurelle des ADN génomiques à simple brin du virus récemment isolé chez le ver à soie : les molécules d'ADN ont une séquence terminale commune.
BANDO H., CHOI H., ITO Y., NAKAGAKI M., KAWASE S.
Faculty of Agriculture, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya, Japan.
1992 Arch. Virol., Vol. 124(1-2), 187-193. (E)

Increase in the weight of silkgland and body during larval development of the hybrid between the domestic silkworm, *Bombyx mori*, and the Chinese wild silkworm, *Theophila mandarina*.
Augmentation du poids de la glande séricigène et du corps au cours du développement larvaire de l'hybride issu du ver à soie domestique *Bombyx mori* et du ver à soie sauvage chinois *Theophila mandarina*.
DAI P., IWASHITA Y.
Faculty of agriculture, Utsunomiya University, Tochigi 321, Japan.
1993 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 62(2), 117-124. (J,e)

Inheritance of a new mutant 'shirotae-ran' in *Bombyx mori*.
Héritabilité d'un nouveau mutant "shirotae-ran" chez *Bombyx mori*.
FUJOKAWA K., KAWAGUCHI Y., BANNO Y., DOIRA H., KOGA K.
Faculty of Agriculture, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan.
1993 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 62(1), 88-90. (J)

Cloning of an early gene promoter of the *Bombyx mori* baculovirus and its use for transient and permanent expression of foreign genes in eukaryotic cells.
Clonage du promoteur d'un gène précoce du baculovirus de *Bombyx mori* et son utilisation pour l'expression temporaire et permanente de gènes étrangers dans les cellules eucaryotiques.
HUYBRECHTS R., VULSTEKE V.
Zoologisch Instituut, Naamsestraat 59, B - 3000 Leuven, Belgium.
1991 Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent, Vol. 56(4a), 1411-1414. (E)

Essential role of duplications of short motif sequences in the genomic evolution of *Bombyx mori*.
Rôle essentiel des duplications de séquences courtes dans l'évolution génomique chez *Bombyx mori*.
ICHIMURA S., MITA K.
Division of Chemistry, National Institute of Radiological Sciences, Chiba 260, Japan.
1992 J. Molec. Evol., Vol. 35, 123-130. (E)

Expression and characterization of cDNAs for cecropin B, an antibacterial protein of the silkworm, *Bombyx mori.*
Expression et charactérisation des ADNc codant pour la cecropine B, une protéine antibactérienne du ver à soie *Bombyx mori.*
KATO S., TANIAI K., HIROCHIKA H., YAMAKAWA M.
Lab. of Biological Defense, National Inst. of Seric. and Entomol. Sci., Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1993 Insect Biochem. and Mol. Biol., Vol. 23, 285. (E)

Cloning of cecropin B gene of *Antheraea yamamai* and purification of its recombinant virus.
Clonage du gène de la cecropine B chez *Antheraea yamamai* et purification de son virus recombinant.
LU M. *et al.*
1992 Canye Kexue, Vol. 18(4), 261-263. (C)

Primary structure of the gene for glycyl-transfer RNA synthetase from *Bombyx mori.*
Structure primaire du gène codant pour la glycyl-tRNA synthétase de *Bombyx mori.*
NADA S., CHANG P.K., DIGNAM J.D.
Dept of Biochemistry, Univ. of Mississippi Medical Center, Jackson, Mississippi 39216-4505, U.S.A.
1993 J. Biol. Chem., Vol. 268, 7660. (E)

Preferential extrachromosomal localization of exogenous DNA in transgenic silkworm, *Bombyx mori.*
Localisation extrachromosomique préférentielle d'ADN exogène chez le ver à soie transgénique *Bombyx mori.*
NIKOLAEV A.I., TCHKONIA T.T., KAFIANIERISTAVI C.A., TARANTUL V.Z.
1993 Mol. Gen. Genetics, Vol. 236, 326. (E)

Basic conditions for the drug selection and transient gene expression in the cultured cell line of *Bombyx mori.*
Conditions indispensables pour la sélection de produits pharmacologiques et l'expression d'un gène étranger dans une lignée de cellules en culture de *Bombyx mori.*
OKANO K., MIYAJIMA N., TAKADA N., KOBAYASHI M., MAEKAWA H.
Dept of Agrobiology, Fac. of Agriculture, Tokyo Univ., 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.
1992 In Vitro Cell. Dev. Biol., Vol. 28A, 779-781. (E)

Purification, cDNA cloning and Nothern blot analysis ot trehalase of pupal midgut of the silkworm, *Bombyx mori.*
Purification, clonage de l'ADNc et analyse par blot Northern de la tréhalase de l'intestin moyen de la chrysalide du ver à soie *Bombyx mori.*
SU Z.H., SATO Y., YAMASHITA O.
Laboratory of Sericultural Sci., School of Agriculture, Nagoya Univ., Chikusa, Nagoya 464-01, Japan.
1993 Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1173, 217-224. (E)

Molecular genetic analysis of ribosomal gene polymorphism in the silkworm, *Bombyx mori.*
Analyse génétique moléculaire du polymorphisme du gène ribosomique chez le ver à soie *B. mori.*
TIKHOMIROVA T.P., TIMOFEEVA M.Y., KUPRIYANOVA N.S., *et al;*
Academy of Sciences, Vavilov st. 26, Moscow 117 808, Russia.
1992 Genetika (Moscow), Vol. 28(8), 13-21. (R)

DNA fingerprints of *Bombyx mori* L. : the problem of identification of individual, family and strain.
Empreintes digitales de l'ADN chez *Bombyx mori* L. : le problème d'identification des individus, des familles et des lignées.
TRETJK A.P., RYSKOV A.P., SEVASTYANOVA G.A., FILIPPOVICH Y.B.
Academy of Sciences, Vavilov st. 26, Moscow 117 808, Russia.
1992 Genetika, Vol. 28(2), 52-62. (E)

DNA fingerprints of *Bombyx mori* L. Testing of genotypic variability of parthenogenetic strains.
Empreintes digitales de l'ADN de *B. mori* L. Analyse de la variabilité des lignées parthénogénétiques.
TRETJK A.P., RYSKOV A.P., SEVASTYANOVA G.A., FILIPPOVICH Y.B., *et al.*
Academy of Sciences, 26 Vavilov st., Moscow 117 808, Russia.
1992 FEBS Lett., Vol. 303, 258-260. (E)

Molecular analysis of the deletion mutants in the E homeotic complex of the silkworm, *Bombyx mori.*
Analyse moléculaire des mutants de délétion dans le complexe homéotique E chez le ver à soie *Bombyx mori.*
UENO K., HUI C.C., FUKUTA M., SUZUKI Y.
National Inst. for Basic and Graduate University for Advanced Studies, Myodaiji, Okazaki 444, Japan.
1992 Development, Vol. 114, 555-563. (E)

Molecular analysis of the deletion mutants in the E homeotic complex of the silkworm *Bombyx mori.*
Analyse moléculaire des mutants de délétion dans le complexe homéotique E chez le ver à soie *Bombyx mori.*
UENO K., HUI C.C., FUKUTA M., SUZUKI Y.
National Institute for Basic Biology, Okazaki 444, Japan.
1992 Development (Cambridge), Vol. 114, 555-563. (E)

TTAA serves as the target site for TFP3 lepidopteran transposon insertions in both nuclear polyhedrosis virus and Trichoplusia ni genomes.
TTAA est un site cible des insertions de transposons de lépidoptères à la fois dans le virus de la polyédrose nucléaire et dans le génome de Trichoplusia ni.
WANG H.G.H., FRASER M.J.
Department of Biological Sciences, University of Notre Dame, Notre Dame, Indiana, U.S.A.
1993 Insect Molecular Biology, Vol. 1(3), 109-116. (E)

Submicroscopic analysis of translocated +p segment in silkworm W+p sex limited strain.
Analyse submicroscopique du segment transloqué +p chez la souche de ver à soie W+p à marquage sexuel.
WANG Y.
1993 Canye Kexue, Vol. 19(1), 51-52. (C)

Dong, a non-long terminal repeat (non-LTR) retrotransposable element from *Bombyx mori.*
Dong, un élément rétrotransposable de *Bombyx mori* avec une courte séquence distale répétée.
XIONG Y., EICKBUSH T.
Department of Biology, University of Rochester, Rochester, New York 14627, U.S.A.
1993 Nucleic Acid Research, Vol. 21(5), 1318. (E)

Induction of sex linkage lethal mutants of *Bombyx mori.*
Induction de mutants léthaux liés au sexe chez *Bombyx mori.*
XU A. *et al.*
1993 Canye Kexue, Vol. 19(1), 47-48. (C)

Construction of gene transfer vectors of chinese oak silkworm, *A. pernyi.* Nuclear polyhedrosis virus and their use for expression of foreign genes in insect cells and the host pupae of *A. pernyi.*
Construction de vecteurs de transfert de gènes chez le ver à soie du chêne chinois *A. pernyi.* Le virus de la polyédrose nucléaire et son utilité pour l'expression des gènes étrangers dans les cellules d'insectes et dans la chrysalide hôte d'A. pernyi
ZHANG C., LIU S., FAN Q., WANG L., LI W., LI G.
Dalian Inst. of Biotechnology, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Dalian 116000, China.
1992 Canye Kexue, Vol. 18(3), 164-172. (C,e)

Vers à soie : physiologie, biochimie

Silkworms : physiology, biochemistry

Biochemical studies of amylases in the silkworm, *Bombyx mori*.. L. : comparative analysis in diapausing and nondiapausing strains.
Etudes biochimiques des amylases chez le ver à soie *Bombyx mori*.. L. : analyse comparative des souches diapausantes et non diapausantes.
ABRAHAM E.G., NAGARAJU J., DATTA R.K.
Central Seric. Research and Training Inst., Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1992 Insect Biochem. Molec. Biol., Vol. 22(8), 867-873. (E)

Assignment of the magnetic resonances of the imino protons and methyl protons of *Bombyx mori*. tRNAGCC Gly.
Attribution des résonnances magnétiques des protons imino et des protons méthyl de l'ARNtGCC Gly. de *Bombyx mori*..
AMANO M., KAWAKAMI M.
Institute of Molecular Biology, Faculty of Science, Nagoya Univ., Chikusa-ku, Nagoya 464, Japan.
1992 Eur. J. Biochem., Vol. 210, 671-681. (E)

Isolation and physicochemical properties of glucose 6 phosphate dehydrogenase form silkworm pupae.
Isolement et propriétés physico-chimiques de la glucose-6-phosphate déshydrogénase de la chrysalide du ver à soie.
BORZAKOVSKYA E.V., KONICHEV A.S., FILIPPOVICH Y.B.
1991 Biochemistry USSR, Vol. 56, 1240. (E)

Effect of fibroin administration on the blood cholesterol level of rats loaded with cholesterol.
Effet de l'administration de fibroïne sur le taux sanguin de cholestérol chez des rats chargés de cholestérol.
CHEN K., IURA K., TAKANO R., HIRABAYASHI K.
Dept of Biotechnology, Fac. of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo 184, Japan.
1993 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 62(1), 56-60. (J,e)

Pupae-waste may be a source for amino acids preparation.
Les déchets de chrysalides peuvent être une source de préparations d'acides aminés.
DATTA R.N., MAJUMDER S.K., KAR R., CHINYA P.K.
Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore 742 101, West Bengal, India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(1), 4-5. (E)

Trehalase of the *Bombyx mori*. L.
Trehalase de *Bombyx mori*. L.
EGOROVA T.A., KHOMIDOV K.S.
1992 Zh Obshch. Biol., Vol. 53(4), 615-632. (E)

Role of calcium ion and cyclic nucleotides in pheromone production in *Bombyx mori*..
Rôle des ions calcium et des nucléotides cycliques dans la production de phéromone chez *Bombyx mori*..
FONAGY A., MATSUMOTO S., UCHIUMI K., MITSUI T.
Physical and Chemical Research Institute, Wako, Saïtama 351, Japan.
1992 J. Pestic. Sci. (Int. ed.), Vol. 17(2), 115-122 .(E)

Action of pheromone biosynthesis activating neuropeptide on pheromone glands of *Bombyx mori*. and *Spodoptera litura*.
Action du neuropeptide activant la biosynthèse de la phéromone sur les glandes à phéromone chez *Bombyx mori*. et *Spodoptera litura*.
FONAGY A., MATSUMOTO S., UCHIUMI K., ORIKASA C., MITSUI T.
Physical and Chemical Research Institute, Wako, Saïtama 351, Japan.
1992 J. Pestic. Sci. (Int. Ed.), Vol. 17(1), 47-54. (E)

Double-stranded ribonuclease activity in the digestive juice and midgut of the silkworm, *Bombyx mori*..
Activité de la ribonucléase à double brin dans le suc digestif et l'intestin moyen du ver à soie *Bombyx mori*..
FURUSAWA T., TAKAYAMA E., ISHIHARA R., HAYASHI Y.
Department of Applied Biology, Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Textile, Kyoto, Japan.
1993 Comp. Biochem. Physiol., Vol. 104, 795. (E)

Opioid detection in pupal extracts of the Chinese oak silkworm *Antheraea pernyi* Guérin.
Détection d'opioïdes dans des extraits de chrysalides du ver à soie du chêne chinois *Antheraea pernyi* Guérin.
GORLENKO V.A., KOLINKO S.I., PSJENICHKIN S.F., KOST N.V. *et al.*
1992 Bull. Exp. Biol. Med. (Eng. tr.), Vol. 113, 691. (E)

Fenoxycarb, a fairly new insect growth regulator : a review of its effects on insects.
Le fénoxycarbe, un régulateur de croissance d'insecte nouveau : une revue sur ses effets chez les insectes.
GRENIER S., GRENIER A.M.
Laboratoire de Biologie. Appliquée 406, INSA-UA INRA 227, 20 avenue A. Einstein, 69621 Villeurbanne Cedex, France.
1993 Ann. Appl. Biol., Vol. 122, 369-403. (E)

Fluctuations in ecdysteroid titre and development during the early stage of the last larval instar of trimoulter strains of the silkworm, *Bombyx mori*..
Fluctuations du titre des ecdystéroïdes et pendant la première phase du dernier stade larvaire des souches trimuantes du ver à soie *Bombyx mori*..
GU S.H., IWASHITA Y., LIN F.J., CHOW Y.S.
Institute of Zoology, Academia Sinica, Taipei, Taiwan 11529, Republic of China.
1992 J. Insect Physiol., Vol. 38(8), 587-593. (E)

Determination of glutamic pyruvic transaminase (GTP) activities in some tissues of silkworm, *Bombyx mori*..
Determination des activités de la pyruvate-glutamate transaminase (GTP) dans quelques tissus du ver à soie *Bombyx mori*..
HUA G., ZHANG J., DAI Y.
Department of Sericulture, Anhui Agricultural College, Hefei 230061, China.
1992 Canye Kexue, Vol. 18(3), 205-207. (C)

Toxicity of commercially available synthetic pyrethroids to silkworm larvae, *Bombyx mori.* (Lepidoptera : Bombycidae).
Toxicité des pyréthrénoïdes synthétiques disponibles dans le commerce sur le ver à soie *Bombyx mori.* (Lepidoptera : Bombycidae).
ICHIDA M.
1992 Nippon Oyo Dobutsu Konchu Gakkaishi, Vol. 36(2), 135-137. (E)

The properties of monoclonal antibody against sepiapterin reductase from fat body of the silkworm, *Bombyx mori.*.
Propriétés de l'anticorps monoclonal contre la sépiaptérine réductase du corps adipeux du ver à soie *Bombyx mori.*.
IINO T., SAWADA H., GYURE W.L., TSUSUE M.
Biological Laboratory, Kitasato University, Sagamihara, Kanagawa, Japan.
1992 Biol. Chem. Hoppe-Seyler, Vol. 373, 1239-1242. (E)

Isolation and partial characterization of binding proteins for immobilized delta endotoxin from solubilized brush borders membranes vesicles of the silkworm, *Bombyx mori.* and the common cutworm, *Spodoptera litura.*
Isolement et caractérisation partielle des protéines liantes des endotoxines delta immobilisées à partir des vésicules des membranes à bordures pileuses du ver à soie *Bombyx mori.* et de *Spodoptera litura.*
INDRASITH L.S., HORI H.
Laboratory of Sericultural Science, Faculty of Agriculture, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464, Japan.
1992 Comp. Biochem. Physiol., Vol. 102, 605. (E)

Midgut sucrase-1 (suc-1) of the silkworm, *Bombyx mori.* : genetics and changes in the activities during the pupal-adult development.
Sucrase-1 (suc-1) de l'intestin moyen chez le ver à soie *Bombyx mori.* : génétique et évolution des activités pendant le développement de la chrysalide en adulte.
KANEKASTU R., SATOH M., KODAIRA M., MIYASHITA T.
Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Ueda 386, Japan.
1993 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 62(1), 13-19. (E,j)

cDNA cloning and sequence determination of the pheromone biosynthesis activating neuropeptide of the silkworm, *Bombyx mori.*.
Clonage de l'ADNc et détermination de la séquence du neuropeptide activant la biosynthèse de la phéromone chez *Bombyx mori.*.
KAWANO T., KATAOKA H., NAGASAWA H., ISOGAI A., SUZUKI A.
Dept of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Tokyo 113, Japan.
1992 Biochem. Biophys. Res. Comm., Vol. 189, 221. (E)

Immunoblot analysis of chitinolytic enzymes in integument and molting fluid of the silkworm, *Bombyx mori.* and the tobacco hornworm, *Manduca sexta.*
Analyse par immunoblot des enzymes chitinolytiques du tégument et du fluide de mue chez le ver à soie *Bombyx mori.* et chez le sphinx du tabac *Manduca sexta.*
KOGA D., FUNAKOSHI T., MIZUKI K., IDE A., KRAMER K.J., ZEN K.C. *et al.*
Laboratory of Biochemistry, Faculty of Agriculture, Yamguchi University, Yamaguchi 753, Japan.
1992 Insect Biochem. and Molec. Bio., Vol. 22, 305. (E)

Impact of permethrin on certain biochemical aspects of the silkworm, *Bombyx mori.* L.
Impact de la perméthrine sur certains aspects biochimiques du ver à soie *Bombyx mori.* L.
KUMARI J.P., NAIDU B.P.
1990 Environ. Ser. 4 (Environ. Concern Tissue Inj. Pt 1), 175-178. (E)

Ultrastructural changes of the prothoracic gland cells during ecdysone secretion at last two larval instars of *Philosomia cynthia ricini*.
Changements ultrastructuraux dans les cellules de la glande prothoracique au cours de la sécretion d'ecdysone aux deux derniers stades larvaires chez *Philosomia cynthia ricini*.
LEE C.
1992 Kunchong Xuebao, Vol. 35(2), 138-141. (E)

The influence of high temperature upon the growth of colleterial galnds and deposition condition of silkworm moth, *Bombyx mori*. L.
Influence d'une haute température sur la croissance des glandes collétériques et condition de déposition chez le papillon de *Bombyx mori*. L.
LIN J., WU W.
Sericultural Department of South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China.
1992 Canye Kexue, Vol. 18(1), 12-19. (C,e)

The pheromone binding protein of *Bombyx mori*. : purification, characterization and immunocytochemical localization.
La protéine liante de la phéromone chez *Bombyx mori*. : purification, caractérisation et localisation immunocytochimique.
MAIDA R., STEINBRECHT A., ZIEGELBERGER G., PELOSI P.
Istituto di Industrie Agrarie, Via S. Michele, 56124 Pisa, Italia.
1993 Insect Biochem. Molec. Biol., Vol. 23(2), 243-253. (E)

Determination of disulfide bond arrangement in bombyxin IV, an insulin superfamily peptide from the silkworm, *Bombyx mori*., by combination of thermolysin digestion of natural peptide and selective synthesis of disulfide bond isomers.
Détermination de l'arrangement des ponts disulfures dans la bombyxine IV, un peptide de la super famille de l'insuline chez *Bombyx mori*., par combinaison de la digestion par la thermolysine et de la synthèse sélective des isomères de ponts disulfures.
MARUYAMA K., NAGASAWA H., ISOGAI A., ISHIZAKI H., SUSUKI A.
Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Tokyo 113, Japan.
1992 J. Protein Chem., Vol. 11(1), 13-20. (E)

Effects of KK-42 on protein biosynthesis of hemolymph and ovary of pupa in *Bombyx mori*..
Effets du KK-42 sur la biosynthèse des protéines de l'hémolymphe et des ovaires de la chrysalide de *Bombyx mori*..
MEI L., ZHOU N.
Cadre Institute of Rural Economic Management of Zhejiang Province, Hangzhou 310029, China.
1992 Canye Kexue, Vol. 18(4), 243-246. (C,e)

Insect muscle actins differ distinctly from invertebrate and vertebrate cytoplasmic actins.
Les actines musculaires des insectes diffèrent des actines cytoplasmiques des invertébrés et des vertébrés.
MOUNIER N., GOUY M., MOUCHIROUD D., PRUDHOMME J.C.
Dépt de Biol. Gén. et Appl., Lab. de Rech. en Biol. Cell., UA92 du CNRS, 43 bd du 11.11.18, 69622 Villeurbanne Cedex.
1992 J. Molecular Evolution, Vol. 34, 406-415. (E)

Neuropeptides of the silkworm, *Bombyx mori*..
Les neuropeptides du ver à soie *Bombyx mori*..
NAGASAWA H.
Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Univ. of Tokyo, Tokyo 113, Japan.
1992 Experentia, Vol. 48, 425-430. (E)

Synthesis of bombyxin II an insulin like heterodimeric peptide of the silkmoth *Bombyx mori.* by regiospecific disulfide bond formation.
Synthèse de la bombyxine II, un peptide hétérodimérique du ver à soie analogue de l'insuline, par formation de liaisons disulfures localisées.
NAGATA K., MARUYAMA K., NAGASAWA H., TANAKA M., ISOGAI A. *et al.*
Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Univ. of Tokyo, Tokyo 113, Japan.
1992 Pept. Chem. 1991 (Pub. 1992) Vol. 29, 1-6. (E)

DNA polymerase-beta from the pupal ovaries of *Bombyx mori*...
ADN-polymérase beta des ovaires de la chrysalide de *Bombyx mori*..
NIRANJANAKUMARI S., GOPINATHAN K.P.
Microbiology and Cell Biology Dept and Centre for Genetic Engineering, Indian Inst. of Sci., Bangalore 560 012, India.
1993 Insect Biochem. Molec. Biol., Vol. 23(3), 345-353. (E)

Immunocytochemical localization of beta-1,3 glucan recognition protein in the silkworm, *Bombyx mori*..
Localisation immunocytochimique de la protéine de reconnaissance du beta-1,3 glucane chez le ver à soie *Bombyx mori*..
OCHIAI M., NIKI T., ASHIDA M.
Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan.
1992 Cell. Tissue Res., Vol. 268, 431-437. (E)

Adenine compounds in the male reproductive tract and spermatophore of the silkmoth, *Bombyx mori*..
Composés à base d'adénine dans l'appareil reproducteur et dans le spermatophore chez le papillon mâle de *Bombyx mori*..
OSANAI M., NAGAOKA S.
Department of Biologie, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku, Tokyo 113, Japan.
1992 Comp. Biochem. Physiol., Vol. 102, 49-55. (E)

Testing trace elements in the pupae by using of ICP-AES.
Analyse ICP-AES des éléments traces dans les chrysalides.
QIAN X., ZHU S.
1991 Canye Kexue, Vol. 17(2), 118-119. (C,e)

Treatment of terramycin on the development and organic composition of the silkworm, *Bombyx mori*..
Effet du traitement à la terramycine sur le développement et la composition organique du ver à soie *Bombyx mori*..
SAILAJA D., DEVAMMA M.N., NAIDU B.P., SREERAMULU A.
1991 Environ. Ecol., Vol. 9(3), 656-658. (E)

New pathway of utilization of ammonia nitrogen for the synthesis of amino acids through NADH dependent transaminases in *Bombyx mori.* L.
Une nouvelle voie d'utilisation de l'azote pour la synthèse des acides aminés par les transaminases dépendantes de la NADH chez *Bombyx mori*..
SESHACHALAM R.V., SUBRAMANYAM M.V.V., KRISHNAMOORTHY R.V.
Bangalore University, Jnana Bharathi, Bangalore 560 056, India.
1992 Physiol. Entomol., Vol. 17(3), 281-287. (E)

Glutamine synthetase activity during embryonic and larval development of the silkworm, *Bombyx mori*. L. and role of a JH analog.
Activité de la glutamine-synthétase au cours du développement embryonnaire et larvaire du ver à soie *Bombyx mori*. L. et rôle d'un analogue de l'hormone juvénile.
SESHACHALAM R.V., SUBRAMANYAM M.V.V., KRISHNAMOORTHY R.V.
Bangalore University, Jnana Bharathi, Bangalore 560 056, India.
1992 Physiol. Entomol., Vol. 17(3), 277-280. (E)

Some observations on the effect of juvenile hormone "Manina" on mulberry silkworms, *Bombyx mori*. in increasing silk content.
Observations de l'effet de l'hormone juvénile "Manina" sur l'augmentation de la production de soie chez les vers à soie du mûrier *Bombyx mori*..
SHARMA A.K., ALAM M.O., AHSAN M.M.
Regional Sericultural Research Station, Kalipong, India.
1990 Biol. Mem., Vol. 16(3), 131-134. (E)

Eclosion hormone activates phosphatidylinositol hydrolysis in silkworm abdominal ganglia during adult metamorphosis.
L'hormone d'éclosion active l'hydrolyse du phosphatidylinositol dans le ganglion abdominal au cours de la métaporphose chez le ver à soie.
SHIBANAKA Y., HAYASHI H., TAKAI M., FUJITA N.
Bio-organics Research Dept, Internat. Research Laboratories, Ciba-Geigy Ltd, 10-66, Miyuki-cho Takarazuka 665, Japan.
1993 Eur. J. Biochem., Vol. 211, 427-430. (E)

Comparisons of arylphorins among species belonging to Saturniidae and Bombycidae (Lepidoptera) by immunodiffusion analysis.
Comparaisons des arylphorines parmi les espèces appartenant aux Saturniidae et Bombycidae (Lepidoptera) par analyse d'immuno-diffusion.
SHIMADA T., KOBAYASHI J., MIYATA T., NAGATA M., KOBAYASHI M.
Laboratory of Sericultural Science, Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Tokyo, Japan.
1992 Nippon Oyo Dobutsu Konchu Gakkaishi, Vol. 36(2), 119-125. (E)

Prothoracicotropic hormone is released 5 times in the 5th larval instar of the silkworm, *Bombyx mori*..
L'hormone prothoracicotrope est déchargée cinq fois au cours du cinquième âge larvaire chez le ver à soie *Bombyx mori*..
SHIRAI Y., AIZONO Y., IWASAKI T., YANAGIDA A., MORI H., SUMIDA M. *et al.*
Fac. of Textile Sci., Kyoto Univ. of Industrial Arts and Textile Fibers, Matsugasaki, Kyoto 606, Japan.
1993 J. Insect Physiol., Vol. 39, 83. (E)

The strain difference and analysis of polymorphic nature of membrane bound alkaline phosphatase in the midgut epithelium of the silkworm, *Bombyx mori*..
Différences entre souches et analyse de la nature polymorphique de la phosphatase alcaline liée à la membrane dans l'épithélium moyen du ver à soie *Bombyx mori*..
TAKEDA S., AZUMA M., ITOH M., EGUCHI M.
Sericultural Experiment Station, Yatabe, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1993 Comp. Biochem. Physiol., Vol. 104, 81. (E)

Partial release of aminopeptidase N from larval midgut cell membranes of the silkworm, *Bombyx mori*., by phosphatidylinositol-specific phospholipase C.
Libération partielle de l'aminopeptidase N des membranes des cellules de l'intestin moyen par la phospholipase C spécifique du phosphatidynilositol chez la larve de *Bombyx mori*..
TAKESUE S., YOKOTA K., MIYAJIMA S., TAGUSHI R., IKEZAWA H., TAKESUE Y.
Biological Institute, Faculty of Science, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464, Japan.
1992 Comp. Biochem. Physiol., Vol. 102, 7-11. (E)

Gross chemical composition of different stages of *Antheraea mylitta*.
Composition chimique brute à différents stades chez *Antheraea myllita*.
TRIPATHI A.K., SINHA D.P., SINGH S.B.
Department of Zoology, Madgah University, Gaya 824 234, India.
1990 Proc. Natl Acad. Sci. India, Vol. 60B, 25-30. (E)

Distribution of beta-endomorphin-like peptide in the central nervous system of *Bombyx mori*..
Distribution d'un peptide analogue à la bèta-endorphine dans le système nerveux central de *Bombyx mori*..
WANG Z.S. *et al.*
1993 Canye Kexue, Vol. 19(2), 119-120. (C)

Effect of removing silkworm larval suboesophagealganglion on lipid metabolism in pupal stage.
Effet de l'ablation du ganglion larvaire suboesophagien sur le métabolisme des lipides chez la chrysalide du ver à soie.
WU D., WU J., YANG X., AO M.
Department of Sericulture, Southwest Agricultural University, Chongqing 630716, China.
1993 Canye Kexue, Vol. 19(1), 32-36. (C,e)

The effect of trimolter inducer KK-42 on the endocrine system in the silkworm, *Bombyx mori*..
Effet du KK-42, inducteur de trimuants, sur le système endocrinien du ver à soie *Bombyx mori*..
WU J., WU Z.D., XU J.L., CAO M.
Zhejiang Agricultural University, Hangzhou City, Zhejiang Province, China.
1991 Kunchong Xuebao, Vol. 34(3), 278-283. (C)

Peptone preparation from silkworm pupae.
Préparation de peptone à partir de chrysalides de vers à soie.
XUE H., DING H., YANG D., GUO X., WANG Y., ZHU S., CHEN H.H., CHEN H.B.
Jiangsu Institute of Microbiology, Wuxi 214063, China.
1992 Canye Kexue, Vol. 18(4), 247-257. (C,e)

Studies on the protein synthesis in the collecterial glands of the silk moth in vitro.
Etudes in vitro de la synthèse des protéines dans les glandes collétériques chez le papillon du ver à soie.
YAO X.
1993 Canye Kexue, Vol. 19(1), 49-50. (C)

Toxicity and residue toxicity of the pesticides on the larvae of *Bombyx mori*..
Toxicité des pesticides et de leurs résidus sur les larves de *Bombyx mori*..
YE Z., LU Y.
South China Agricultural University, Guangzhou, China.
1991 Canye Kexue, Vol. 17(2), 84-89. (C)

Effects of imidazole compound KK-42 on pupal development of *Bombyx mori*..
Effet du KK-42 combiné à l'imidazole sur le développement de la chrysalide de *Bombyx mori*..
ZHOU N., XU J.L., MEI L.
Zhejiang Agricultural University, Hangzhou City, Zhejiang Province, China.
1991 Canye Kexue, Vol. 17(3), 145-149. (C)

Vers à soie : oeufs, embryologie

Silkworms : eggs, embryology

Stage dependent limited degradation of vitellin and its localization in the Japanese oak silkworm, *Antheraea yamamai*, during embryonic development.
Dégradation limitée en fonction du stade et localisation de la vitelline au cours du développement embryonnaire chez le ver à soie du chêne japonais *Antheraea yamamai*.
FURUSAWA T., NARUTAKI A., MITSUDA K., TERAMOTO N.
Department of Applied Biology, Faculty of Textile Science, Kyoto Insitute of Textile, Kyoto, Japan.
1993 Comp. Biochem. Physiol., Vol. 104, 787. (E)

Induction of males from meiotic parthenogenetic eggs and haploid lethality of these eggs in the silkworm, *Bombyx mori*.
Induction de mâles à partir d'oeufs parthénogénétiques méïotiques et mortalité de ces oeufs chez *Bombyx mori*..
HIROKAWA M.
Fukushima Sericultural Experiment Station, Yanagawa, Fukushima 960-07, Japan.
1993 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 62(2), 105-110. (J,e)

Induction of ovarial development of ligatured silkworm pupae by phytogenous molting hormone.
Induction du développement ovarien par une hormone de mue phytogène chez deschrysalides de vers à soie ligaturées.
HUANG L., ZHANG J.
Department of Sericulture, Anhui Agricultural College, Hefei 230061, China.
1992 Canye Kexue, Vol. 18(1), 25-32. (C,e)

Study on accumulation of sugars, lipids and proteins of oak silkworm in diapause and non-diapause silkworm.
Etude de l'accumulation des sucres, lipides et protéines chez les vers à soie du chêne diapausants et non-diapausants.
JIANG S.
1993 Canye Kexue, Vol. 19(1), 53-56. (C)

Mechanism of artificial parthenogenesis in the mulberry silkworm. I. Dependence of the effect of thermoactivation on rate of postactivation cooling.
Mécanisme de la parthénogénèse artificielle chez le ver à soie du mûrier. I.Effet de la vitesse de refroidissement des oeufs après activation thermique sur le taux de parthénogénèse.
KLIMENKO V.V.
Institute of Sericulture, Merefa, Kharkov Region, 312060 Ukraine.
1980 Genetika, Vol. 16(6), 1002-1010. (E)

Mechanism of artificial parthenogenesis in *Bombyx mori*. L. III. Reversibility of secondary activational changes for thermo- and cryoactivation.
Mécanisme de la parthénogénèse artificielle chez *Bombyx mori*. L. III. Réversibilité des changements de l'activation secondaire pour les activations thermique et cryogène.
KLIMENKO V.V.
Institute of Sericulture, Merefa, Kharkov Region, 312060 Ukraine.
1982 Genetika, Vol. 18(1), 64-72. (E)

Mechanism of artificial parthenogenesis in the mulberry silkworm. II. Reactivation of unfertilized eggs deactivated in the cooling gradient after thermal heating.
Mécanisme de la parthénogénèse artificielle chez le ver à soie du mûrier. II. Réactivation des oeufs non fécondés désactivés dans le gradient de refroidissement après chauffage thermique.
KLIMENKO V.V.
Institute of Sericulture, Merefa, Kharkov Region, 312060 Ukraine.
1980 Genetika, Vol. 16(6), 1011-1019. (E)

Observatii asupra ritmului depunerii pontei la fluturii de matase si influenta acestuia asupra calitatii oualor. / Observations upon the rythm of ovipositor in *Bombyx* and its influence on the egg quality.
Observations sur le rythme de ponte chez *Bombyx* et son influence sur la qualité des oeufs.
MATEI A., BRASLA A.
Central Sericultural Research Station, N° 69, Bucuresti-Ploiesti street, Bucharest, Sector 1, Romania.
1992 Medicina Veterinara si Cresterea Animalelor, Vol. XLII(11-12), 15-17. (Ro)

Contents of aminoacids and total carbohydrates and their effects on the egg quality in silkworms.
Contenus en acides aminés et en hydrates de carbone totaux et leurs effets sur la qualité des oeufs des vers à soie.
MIAO Y., WANG Y., FENG J., JIANG Z.
Department of Sericulture, Zhejiang Agricultural Univ., Hangzhou City, Zhejiang Province, China.
1991 Canye Kexue, Vol. 17(3), 141-144. (C,e)

Biosynthesis of NAD sorbitol dehydrogenase is induced by acclimatation at 5 C in diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*..
La biosynthèse de la NAD-sorbitol deshydrogénase est induite par l'acclimatation à 5 C des oeufs diapausants du ver à soie *Bombyx mori*..
NIIMI T., YAGINUMA T.
Lab. of Sericultural Science, Faculty of Agriculture, Nagoya Univ., Chikusa, Nagoya 464, Japan.
1992 Comp. Biochem. and Physiol., Vol. 102, 169-173. (E)

Activity of NAD sorbitol dehydrogenase is caused by biosynthesis of enzyme protein in diapause and non diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*..
L'activité de la NAD-sorbitol-déshydrogénase est due à la biosynthèse d'une enzyme chez les oeufs diapausants et non diapausants du ver à soie *Bombyx mori*..
NIIMI T., YAMASHITA O., YAGINUMA T.
Lab. of Organic Chem. & Laboratory of Seric. Sci., Nagoya Univ., Chikusa-ku, Nagoya 464 01, Japan.
1992 Comp. Biochem. Physiol., Vol. 103, 657. (E)

A cold-inducible *Bombyx* gene encoding a protein similar to mammalian sorbitol dehydrogenase. Yolk nuclei-dependent gene expression in diapause eggs.
Un gène de *Bombyx* inductible par le froid codant pour une protéine analogue à la sorbitol-déshydrogénase des mammifères. Expression du gène dépendant des noyaux du vitellus dans les oeufs diapausants.
NIIMI Y., YAMASHITA O., YAGINUMA T.
Lab. of Sericultural Science, School of Agriculture, Nagoya Univ., Chikusa, Nagoya 464-01, Japan.
1993 Eur. J. Biochem, Vol. 213, 1125-1131. (E)

Content and possible role of ecdysteroids in the larval ovary of the silkworm, *Bombyx mori*..
Taux et rôle possible des ecdystéroïdes dans les ovaires de la larve de *Bombyx mori*..
PARLAK O., SAKURAI S., KAYA M., OHTAKI T.
Department of Biology, Faculty of Science, Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan.
1992 Invertebr. Reprod. Dev., Vol. 21(1), 1-6. (E)

Multiple mating increases fecundity and fertility.
Les accouplements multiples augmentent la fécondité et la fertilité.
RAVIKUMAR G., RAJESWARY H., OJHA N.G., THANGAVELU K.
Central Tasar Research and Training Institute, Nagri, Ranchi, Bihar,India.
1993 Indian Silk, Vol. 32(2), 34. (E)

A new diapause hormone molecule of the silkworm, *Bombyx mori*..
Une nouvelle molécule d'hormone de diapause chez le ver à soie *Bombyx mori*..
SATO Y., NAKAZAWA Y., MENJO N., IMAI K., KOMIYA T., YAMASHITA O. *et al.*
Laboratory of Sericultural Science, School of Agriculture, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya 464 01, Japan.
1992 Proc. Jpn Acad., Ser. B, Vol. 68(5), 75-79. (E)

Precursor polyprotein for multiple neuropeptides secreted form the suboesophageal ganglion of the silkworm, *Bombyx mori*. : characterization of the cDNA encoding the diapause hormone precusor and identification of additional peptides.
Précurseur polyprotéinique des nombreux neuropeptides sécrétés par le ganglion suboesophagien du ver à soie *Bombyx mori*. : caractérisation de l'ADNc codant pour le précurseur de l'hormone de diapause et identification des peptides additionnels.
SATO Y., OGUCHI M., MENJO N., IMAI K., SAITO H., YAMASHITA O. *et al.*
Laboratory of Sericultural Science, School of Agriculture, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-01, Japan.
1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 90, 3251-3255. (E)

Phenotypic sex reversal in cells of the silkworm germ line. Cytological analysis of sex-reversal of male germ line cells.
Inversion phénotypique du sexe dans des cellules de la lignée germinale du ver à soie. Analyse cytologique de l'inversion de sexe des cellules de la lignée germinale mâle.
SHCHEGEL'SKAYA E.A., KLIMENKO V.V.
Institute of Sericulture, Merefa, Kharkov Region, 312060 Ukraine.
1989 Tstiologiya i Genetika, Vol. 23(1),55-61. (E)

Comparison of fatty acid compositions in lipids of diapause and non diapause eggs of *Bombyx mori*..
Comparaison des compositions en acides gras des lipides des oeufs diapausants et non diapausants chez *Bombyx mori*..
SHIMIZU I.
Laboratory for Plant Ecological Studies, Faculty of Science, Kyoto University, Kyoto 606, Japan.
1992 Comp. Biochem. Physiol., Vol. 102, 713. (E)

Acid cysteine proteinase from the eggs of silkmoth, *Bombyx mori*.. Tissue distribution, developmental changes and the sites of synthesis for the enzyme.
Protéiase acide à cystéïne des oeufs de *Bombyx mori*.. Distribution tissulaire, changement au cours du développement et sites de synthèse de l'enzyme.
TAKAHASHI S.Y., ZHAO X.F., KAGEYAMA T., YAMAMOTO Y.
Biological Institute, Faculty of Science, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464, Japan.
1992 Insect Biochem. and Mol. Biol., Vol. 22, 369. (E)

Thyroxine-induced changes in ovarian protein and ecdysteroid levels in the silkworm, *Bombyx mori*. L. : effect on ovarian maturation and egg production.
Modifications induites par la thyroxine sur les protéines ovariennes et le taux d'ecdystéroïdes chez le ver à soie *Bombyx mori*. L. : effet sur la maturation ovarienne et la production des oeufs.
THYAGARAJA B.S., MASLER E.P., KELLY T.J., BORKOVEC A.B.
Regional Sericultural Research Station, Central Silk Board, C.R. Nagar 571 313, India.
1993 Comp. Biochem. Physiol., Vol. 104A(2), 247-253. (E)

Identification of key genes in early development in silk moth.
Identification des gènes clés au cours du développement précoce du papillon du ver à soie.
WATSON C.A.
1991 Wesleyan Univ., Middletown, CT, U.S.A., 152 p. (E)

Actin is a major structural and functional element of the egg cortex of giant silkmoth during oogenesis.
L'actine est un élément principal de la structure et du fonctionnement du cortex des oeufs des papillons géants du ver à soie au cours de l'ovogénèse.
WATSON C.A., SAUMAN I., BERRY S.J.
1993 Dev. Biol., Vol. 155, 315-323. (E)

Ecdysone's influence on biosynthesis and accumulation of yolk proteins and on ovary development of *Bombyx mori*..
Influence de l'ecdysone sur la biosynthèse et l'accumulation des protéines vitellines et sur le développement ovarien chez *Bombyx mori*..
WU X., XU J.
Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029, China.
1992 Canye Kexue, Vol. 18(1), 20-24. (C,e)

Effects of corona discharge on the termination of diapause in silkworm egg.
Effets d'une décharge en couronne sur la fin de la diapause chez les oeufs du vers à soie.
XIAN X., KOBAYASHI M
Chugoku National Agricultural Experimental Station, Nishi-Fukatsu, Fukuyama 721, Japan.
1993 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 62(2), 175-177. (J)

Effects of preserving loose eggs on the quality of silkworm hibernating eggs produced in spring.
Effets de la conservation des oeufs en vrac sur la qualité des oeufs de vers à soie diapausants produits au printemps.
XU S.Q., DING Z.Y., YAO S.M., WU F., DAI S.L., ZHU Z.R.
Suzhou Sericultural College, Suzhou 215151, China.
1993 Canye Kexue, Vol. 19(2), 84-90. (C,e)

Evidence for a gene determining the size of polygonal patterns of the egg chorion in the silkworm.
Mise en évidence d'un gène gouvernant la dimension des motifs polygonaux du chorion de l'oeuf chez le ver à soie.
YAMAMURA T., SAHARA K., KAWAMURA N., IIZUKA T.
Laboratory of Sericology, Faculty of Agriculture, Hokkaido Univ., Sapporo, Hokkaido 060, Japan.
1992 Hereditas, Vol. 117, 163. (E)

Primary studies on cell fusion of spermatocytes in silkworm, *Bombyx mori*..
Etudes préliminaires sur la fusion des cellules des spermatocytes chez le ver à soie *Bombyx mori*..
YU Z.C., KAWANO H., OSHIKI T.
Sericultural Research Institute of Shandong Province, Yantai 264000, China.
1993 Canye Kexue, Vol. 19(2), 100-104. (C,e)

Vers à soie : glandes séricigènes

Silkworms : silkglands

In vitro production of *Bombyx mori* silk fibroin by organ culture of the posterior silk glands. Isotope labeling and fluorination of the silk fibroin.
Production in vitro de fibroïne de soie de *Bombyx mori* par culture des glandes séricigènes postérieures. Marquage avec un isotope et fluoration de la fibroïne.
ASAKURA T., SAKAGUCHI R., DEMURA M., MANABE T., UYAMA A., OGAWA K. *et al.*
Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2-Chome, Nakamachi, Konagei, Tokyo 184, Japan.
1993 Biotechnology and Bioengineering, Vol. 41, 245-252. (E)

P25 gene regulation in *Bombyx mori* silk gland : two promoter-binding factors have distinct tissue and developmental speficities.
Régulation du gène P25 de la glande séricigène chez *Bombyx mori* : deux facteurs se liant au promoteur présentent des spécificités tissulaire temporelles distinctes.
DURAND B., DREVET J., COUBLE P.
Centre de Génétique Mol. et Cell., UMR CNRS 106, Univ. C. Bernard Lyon I, 43 bd du 11.11.1918, 69622 Villeurbanne Cedex.
1992 Molecular and Cellular Biology, Vol. 12(12), 5768-5777. (E)

A shell of F-actin surrounds the branched nuclei of silk gland cells.
Une couche d'actine F entoure les noyaux ramifiés des cellules de la glande séricigène.
HENDERSON S.C., LOCKE M.
Cold Spring Harbor Laboratory, Cairns Laboratory, Cold Spring Harbor, New York 11724, U.S.A.
1992 Cell Motility and the Cytoskeleton, Vol. 23, 169. (E)

Nucleotide sequence of the cDNA encoding silk gland elongation factor 1alpha.
Séquence nucléotidique de l'ADNc codant pour le facteur d'élongation 1alpha de la glande séricigène.
KAMIIE K., TAIRA H., OOURA H., KAKUTA A., MATSUMOTO S., KATSUMATA T. *et al.*
Dept of Bioscience and Technology, Faculty of Agriculture, Iwate University, Ueda 3-18-8, Morioka 020, Japan.
1993 Nucleic Acids Research, Vol. 21(3), 742. (E)

Nucleotide sequence of the cDNA encoding silkgland elongation factor 1beta'.
Séquence nucléotidique de l'ADNc codant pour le facteur d'élongation 1beta de la glande séricigène.
TAIRA H., KAMIIE K., KAKUTA A., OOURA H., MATSUMOTO S., KATSUMATA T. *et al.*
Physical and Chemical Resarch Institute, Wako, Saïtama 351, Japan.
1992 Nuc. Acid Res., Vol. 20, 6734. (E)

Different behaviour of chromatin domains encompassing fibroin heavy chain in active, temporarily inactive, and permanently inactive transcriptional states in silk gland nuclei.
Comportement différent des domaines de la chromatine entourant le gène de la chaîne lourde de fibroïne aux stades de transcription actif, temporairement actif et inactif en permanence des noyaux de la glande sériciène.
WAGA S., MIZUNO S.
Lab. of Mol. Biol., Dept of Appl. Biol. Chem., Tohoku Univ., 1-1, Tsutsumidori-Amamiyamachi, Aoba-ku, Sendai 981, Japan.
1993 J. Biol. Chem., Vol. 268(9), 6429-6436. (E)

Soie

Silk

Pulsed proton NMR study of *Bombyx mori.* silk fibroin : dynamics of fibroin and of adsorbed water.
Etude par RMN de protons en champ pulsé de la fibroïne de soie chez *Bombyx mori* : dynamique de la fibroïne et de l'eau absorbée.
ASAKURA T., DEMURA M., WATANABE Y., SATO K.
Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2-Chome, Nakamachi, Konagei, Tokyo 184, Japan.
1992 J. Polym. Sci., Part B : Polym. Phys., Vol. 30, 693-699. (E)

Effect of PH on silk fibroin gelation.
Effet du PH sur la gélification de la fibroïne de soie.
AYUB Z.H., HIRABAYASHI K., ARAI M.
1992 Sen'i Gakkaishi, Vol. 48(3), 141-144. (E)

Distribution of raw silk size at the return points to the limit size for cocoons feeding.
Distribution du diamètre de la soie grège aux points de retour jusqu'au diamètre limite pour l'alimentation en cocons.
BAI L., YANG Y., SIMAZAKI A.
Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Ueda 386, Japan.
1993 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 62(1), 50-55. (J,e)

A study on silk exfoliation in relation with properties of raw cocoons.
Etude sur l'exfoliation de la soie en relation avec les propriétés des cocons bruts.
CHEN C., HU Z.
Zhejiang Institute of Silk Textiles, Hangzhou 310033, China.
1992 Canye Kexue, Vol. 18(1), 40-45. (C,e)

The factors related to solubility of fibroin peptides.
Les facteurs liés à la solubilité des peptides de la fibroïne.
CHEN K., TAKANO R., HIRABAYASHI K.
Dept of Biotechnology, Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Konagei, Tokyo, Japan.
1993 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 62(2), 132-136. (J,e)

Studies on the difference of fluorescence spectrum among different fluorescent color cocoons.
Etudes sur la différence du spectre de fluorescence parmi les différents cocons de couleur fluorescents.
CHEN R. *et al.*
1993 Bulletin of Sericulture, Vol. 24(1), 31-33. (C)

A study on dissolution conditions, polypeptide components and structure of sericin.
Etude sur les conditions de dissolution, les polypeptides constituants et la structure de la séricine.
CHEN W., YOU Q.
Zhejiang Institute of Silk Textiles, Hangzhou 310033, China.
1992 Canye Kexue, Vol. 18(4), 247-215. (C,e)

Bombyx mori silk fibroin based immobilization method for preparation of urea electrode.
Méthode basée sur l'immobilisation sur la fibroïne de *Bombyx mori* pour la préparation d'une électrode d'urée.
FANG Y., SHAO Z., DENG J., YU T.
1992 Electroanalysis (N.Y.), Vol. 4(6), 669-672. (E)

Chemical modification of arginyl residues in silk fibroin. 1 : Reaction of 1,2 cyclohexanedione in borate buffer.
Modification chimique des résidus arginine dans la fibroïne de soie. 1 : Réaction du 1,2 cyclohexadione dans un tampon borate.
GOTOH Y., TSUKADA M., MINOURA N.
National Institute of Sericultural and Entomological Science, Owashi, Tsukuba 305, Japan.
1992 International J. Biol. Macromolecules, Vol. 14, 198. (E)

Physical properties of silk thread from cocoons of a sex-limited variety, Ouhaku.
Propriétés physiques du filament de soie des cocons de la variété Ouhaku à marquage sexuel.
IIZUKA E., YANG X.L.
Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Ueda, Nagano 386, Japan.
1993 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 62(2), 111-116. (J,e)

Dyeing properties of methacrylamide/glycidylmethacrylate and glycidyl methacrylate grafted silk fabrics.
Propriétés tinctoriales des tissus de soie greffés avec du métacrylamide/glycidylmétacrylate et du glycidyl métacrylate.
KAKO T., KATAYAMA A.
Himeji Junior College, Heimeji 670, Japan.
1993 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 62(2), 137-144. (J,e)

Influence of solvation temperature on the molecular features and physical properties of fibroin membrane.
Influence de la température de solvation sur les caractères moléculaires et les propriétés physiques de membranes de fibroïne.
LIANG C.X., HIRABAYASHI K.
Faculty of Technology, Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo 185, Japan.
1992 Polymer, Vol. 33, 4388-4393. (E)

Characteristics and structure of sericin-fixed silk using glutaric dialdehyde.
Caractéristiques et struture de la séricine fixée à la glutaraldéhyde.
LIU G., WANG X.
1993 Fangzhi Xuebao, Vol. 13(1), 11-14. (E)

Study on yellowing of cocoon filament obtained from the silkworm reared on artificial diets and mulberry leaves.
Etude du jaunissement du filament des cocons issus de vers à soie élevés sur milieu artificiel et sur feuilles de mûrier.
MATSUBARA F., CHEN R., MORI H., SUMIDA M., YAMAZAKI T., ITO H.
Lab. of Sericultural Sci., Faculty of Agriculture, Nagoya Univ., Chikusa-ku, Nagoya 464, Japan.
1993 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 62(2), 162-164. (J)
Hue and glossiness of wild silk fibers degummed with enzyme.

Teinte et éclat des fibres de soie sauvage décreusées avec une enzyme.
NAKAJIMA S., KAWAHARA Y., OKONOGI E.
1993 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 62(2), 165-167. (J)

Fibrous composite structure in a spider silk.
Structure composite fibreuse d'une soie d'araignée.
STUBBS D., TILLINGAST E.K., TOWNLEY M.A., CHERIM N.A.
1992 Naturwissenschaften, Vol. 79, 231. (E)

Dynamic analysis of the exfoliation tension of a cocoon filament and verification by simulation experiments.
Analyse dynamique de la tension d'exfoliation d'un filament de cocon et
vérification par expériences de simulation.
TAKABAYASHI C.
National Institute of Sericultural and Entomological Science, Division of Filature Technology, Okaya City, Nagano 394, Japan.
1993 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 62(1), 20-29. (J,e)

High performance liquid chromatographic determination of tryptophan in silkworm cocoons.
Détermination du tryptophane dans les cocons du ver à soie par HPLC.
WANG Y., YU L., ZHANG X., WANG J., JI T.
1992 Sepu, Vol. 10(5), 307-308. (E)

Studies on the changes of crystallinity and structure of silk fibroin.
Etudes des variations de la cristallinité et de la structure de la fibroïne de soie.
WU C.Y., XU L.Q., JIN Z.M.
Suzhou Institute of Silk Textile Technology, Suzhou 215005, China.
1993 Canye Kexue, Vol. 19(2), 105-110. (C,e)

Studies on the control of the cocoon number in the cocoon supplier of an automatic reeling machine.
Contrôle du nombre de cocons dans l'approvisionneur d'une bassine de dévidage automatique.
YANG Y., BAI L.
Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Ueda 386, Japan.
1993 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 62(1), 7-12. (J,e)

Tests for the production of fishing lines made of silk yarns by coating with photo-curing resins.
Tests pour la production de lignes de pêche en fils de soie enduits de résines photo-vulcanisées.
YASUDA K., KATO H., OBO M.
National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1993 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 62(1), 61-67. (J,e)

INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

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

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

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

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

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

- Le titre suivi du nom de l'auteur et de son adresse complète.
- Le résumé qui doit indiquer le contenu et les conclusions de l'article et doit faire référence à des informations nouvelles. Le résumé ne doit pas excéder 200 mots et peut être divisé en paragraphes numérotés.
- Les mots clés. Une petite liste de mots clés permettant une rapide analyse du contenu de l'article et utilisable pour la compilation de l'index.
- Les articles doivent être divisés en : Introduction, Matériel et Méthodes, Résultats et Discussion. Pour les articles de synthèse, les auteurs peuvent choisir la présentation qui leur convient.
- Remerciements.
- Références. Les auteurs doivent suivre le "Harvard system". Les références doivent être données dans l'ordre suivant : nom de l'auteur et ses initiales, date (entre parenthèses), titre de l'article, nom du journal tel qu'il est abrégé dans la liste mondiale des périodiques scientifiques (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. (1962) Effect of water on molecular motion of silk fibroin. J. Serie. Sci. Jpn. Sous presse.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

* * *

INFORMATION FOR CONTRIBUTORS

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

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

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

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

5) The typescript should contain the following features:

- Title followed by the author's name and full address.
- Abstract which should be a brief summary of the contents and conclusions of the paper and should refer to any new information. It should not exceed 200 words and may be divided into numbered sections.
- Keywords. A short list of keywords provided for rapid scanning of the contents of the paper and used for compiling the index.
- Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion should be given for papers presenting original results. For review, authors may choose the convenient presentation.
- Acknowledgements.
- References. The 'Harvard system' is to be followed. References should be detailed in the following order: author's names and initials, date (in parentheses), the title of the article, the name of the journal as abbreviated in the World List of Scientific Periodicals (4th edit., 1963), the volume and the first and last pages of the article.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

* * *

Directeur Gérant : Dr H. BOUVIER

Dépôt légal : 2e trimestre 1993