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

AKAPANTHU S. (Thaïlande / *Thailand*)
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)
HORIE Y. (Japon / *Japan*)
IATROU K. (Canada)
JOLLY M.S. (Inde / *India*)
KOBAYASHI M. (Japon / *Japan*)
KRISHNASWAMY S. (Inde / *India*)
LEA H. Z. (Corée / *Korea*)
LEGAY J.-M. (France)
LIU S.-X. (Chine / *China*)
LU H.-S. (Chine / *China*)
MANO Y . (Japon / *Japan*)
MAUCHAMP B. (France)
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*)
TRENCZEK T. (Suisse / *Switzerland*)
VAGO C. (France)
VEY A. (France)
XIA J.-G. (Chine / *China*)
YAMASHITA O. (Japon / *Japan*)
YANAGAWA H. (Japon / *Japan*)

VOLUME 35 1995 NUMERO 1

SOMMAIRE - CONTENTS

Articles originaux / Original papers

Translational inhibition of the putative proteins encoded by the retrotransposon, Mag, of *Bombyx mori* in a baculovirus expression system 1
Inhibition de la traduction des protéines putatives codées par le rétrotransposon Mag de *Bombyx mori* dans un système d'expression de baculovirus 11
P. NONY, M. CERRUTTI, A. GAREL, G. DEVAUCHELLE & P. COUBLE

Studies on the inheritance of a deletion type of the blood esterase isoenzymes in the silkworm, *Bombyx mori* L. 17
Etudes sur la transmission héréditaire d'un type de délétion des isozymes de l'estérase du sang chez le ver à soie *Bombyx mori* L. 25
HE J.-L.

The mechanism of cocoon opening in *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae) . . . 29
Le mécanisme de l'ouverture du cocon chez *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae) . . 35
P. ŠVÁCHA & H. AKAI

Fluoride loading and kinetics in different tissues of larvae of fluorosis-affected silkworms (*Bombyx mori* L.) 39
Teneur et cinétique du fluorure dans différents tissus de larves de vers à soie affectées par la fluorose 49
CHEN Y.-Y. & WU Y.-C.

Symptoms of a microsporidian infection in the muga silkworm, *Antheraea assamensis*: effects on egg production and hatching 55
Symptômes d'une infestation microsporidienne chez le ver à soie muga *Antheraea assamensis* : effets sur la production et l'éclosion des oeufs 61
J.N. TALUKDAR

Effect of micronutrients on the biochemical parameters of mulberry (*Morus alba* L.) leaf 65
Effets de certains oligo-éléments sur les paramètres biochimiques de la feuille de mûrier (*Morus alba* L.) 71
P.C. BOSE, N.R. SINGHVI & R.K. DUTTA

Effect of some growth regulators on the biochemical parameters of mulberry (*Morus alba* L.) leaf under rainfed conditions 75
Effet de certains régulateurs de croissance sur les paramètres biochimiques de la feuille de mûrier (*Morus alba* L.) en régime pluvial 79
P.C. BOSE, S.K. MAJUMDER & R.K. DUTTA

Evaluation of eight mulberry germplasm varieties by leaf biochemical and bioassay moulting studies 83
Evaluation de huit variétés de mûrier issues d'une banque génétique par étude des paramètres biochimiques de la feuille et du comportement de mue des vers à soie 95
U.D. BONGALE & CHALUVACHARI

Effect of pruning time, genotypes and environmental factors on the development of *Cercospora moricola* Cooke on mulberry 99
Effet de l'époque de taille, des génotypes et des facteurs environnementaux sur le développement de *Cercospora moricola* Cooke chez le mûrier 105
R.S. TEOTIA, S.K. SEN & S.S. SINHA

Notes brèves / Brief notes

The silkworm, *Bombyx mori* L., on orbit in an earth artificial satellite 109
Le ver à soie *Bombyx mori* en orbite dans un satellite artificiel de la terre 113
SH.R. MADYAROV, E.A. ILYIN & V.A. JANIBEKOV

Docosaploid *Morus nigra* L., a high polyploid mulberry 117
Un mûrier à polyploïdie élevée, un *Morus nigra* docosaploïde 121
S.B. DANDIN & BASAVAIAH

Observations on the surface ultrastructure of conidial stage of *Cercospora moricola* and its infection process in mulberry 123
Observations de l'ultrastructure de la surface des conidies de *Cercospora moricola* et de son processus d'infestation chez le mûrier 129
V.P. GUPTA, S.K. TEWARI, GOVINDAIAH, A.K. BAJPAI & R.K. DATTA

Sex differentiation in the adults of *Sphenoptera cupriventris* Kerr. (Coleoptera: Buprestidae), a pest of tasar food plants 133
Différenciation des sexes chez les adultes de *Sphenoptera cupriventris* Kerr. (Coleoptera : Buprestidae), parasite des plantes nourricières tasar 137
K. JAIPAL REDDY & G. MARUTHI RAM

***Megachalcis fumipennis* Cameron (Hymenoptera: Chalcididae), a larval parasite of the stem borer, *Sphenoptera cupriventris* Kerr. (Coleoptera: Buprestidae)** 139
Megachalcis fumipennis Cameron (Hymenoptera : Chalcididae), parasite larvaire du térébrant de la tige *Sphenoptera cupriventris* Kerr. (Coleoptera : Buprestidae) 143
K. JAIPAL REDDY, G. MARUTHI RAM & M.K. SINGH

First report on *Myllocerus viridanus* Fabricius (Coleoptera: Curculionidae) as a pest of *Terminalia arjuna* Bedd. and *Terminalia tomentosa* W. & A. 145
Première observation de *Myllocerus viridanus* Fabricius (Coleoptera : Curculionidae) parasitant *Terminalia arjuna* Bedd. et *Terminalia tomentosa* W. & A. 147
P.K. MISHRA, R.N. SINGH, J. JAYSWAL & K. THANGAVELU

Bibliographie / Bibliography 149
Sériciculture générale / General sericulture 150
Mûrier / Mulberry 156
B. mori : élevage, nutrition, pathologie / *B. mori*: rearing, feeding, pathology 164
Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie / Non mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology 171
Vers à soie : génétique / Silkworms: genetics 173
Vers à soie : physiologie / Silkworms: physiology, biochemistry 179
Vers à soie : oeufs, embryologie / Silkworms: eggs, embryology 189
Vers à soie : glandes séricigènes / Silkworms: silkglands 193
Soie / Silk 194

Instructions aux auteurs / Information for contributors

TRANSLATIONAL INHIBITION OF THE PUTATIVE PROTEINS ENCODED BY THE RETROTRANSPOSON, MAG, OF *BOMBYX MORI* IN A BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM

P. NONY[1], M. CERRUTTI[2], A. GAREL[1], G. DEVAUCHELLE[2] & P. COUBLE[1]*

1. Centre de génétique moléculaire et cellulaire, CNRS-UMR 106, 43 boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.
2. Station de recherches de pathologie comparée, INRA-CNRS, 30380 Saint-Christol-lez-Alès, France.

*Mag is a retrotransposon of the silkworm, **Bombyx mori**. It is present in a few copies (4 to 15) dispersed into the genome of different strains of **Bombyx**. Its transcription seems to be highly repressed as no messenger has been detected in the different tissues tested at various stages of development, although sensitive methods have been used. Interestingly, the use of the baculovirus expression system to overexpress the proteins encoded by mag showed that the translation, but not the transcription of mag RNA is certainly highly repressed. However, a protein that we thought to be the mag endonuclease, based on its nuclear localization and its apparent molecular weight is observed.*

Keywords: *Bombyx mori*, retrotransposon, endonuclease, baculovirus.

INTRODUCTION

Transposable elements are widely distributed in the genomes of eucaryotic species (Finnegan, 1989, 1992; Boeke, 1989; Grandbastien, 1992). They can be classified into distinct groups depending on their structure and their mode of transposition. In the silkworm, *Bombyx mori*, five mobile elements have been described to date. Three of them, R1Bm, R2Bm and Dong, belong to the group of non-LTR retrotransposons (Burke *et al.*, 1987; Xiong and Eickbush, 1988, 1993) and the other two, mag and Pao, belong to the group of LTR retrotransposons (Michaille *et al.*, 1990; Xiong *et al.*, 1993).

Mag (from 'magnan', a French vernacular name for 'silkworm') is the first element of this last class to be discovered. It is present as a few copies whose number varies from 4 to 15 according to the strain considered. We hypothesize that mag has transposed in a recent past as it is located at different loci in near strains.

Mag comprises 4564 bp, including two surprisingly short direct terminal repeats of only 77 bp, whereas terminal repeats of LTR retrotransposons range generally from 300 to 400 nucleotides. Nevertheless, these terminal repeats and their immediately adjacent sequences present all the signals necessary for transcription into genomic RNA and for reverse transcription. The core sequence of mag contains two open reading frames, ORF1 and ORF2. They overlap over 222 pb and are out of frame of -1 nucleotide. These ORFs are organized as those of the gag and pol of retroviruses: ORF1 encodes a putative nucleic acid binding peptide and ORF2, a putative protease, reverse transcriptase/RNase H and endonuclease. A putative initiation codon of the ORF2 overlaps the termination codon of the ORF1 (Fig. 1A). Sequence comparison of these proteins places mag within the gypsy group of LTR retrotransposons (Garel *et al.*, 1994). Transcription of mag seems to be highly

* To whom correspondence should be addressed.

repressed as no messenger has yet been detected although sensitive techniques such as RT-PCR have been carried out on *Bombyx* ovaries, testes, fat body or silk glands at different stages of development.

With the aim of unraveling the mechanisms of mobilization of mag, we attempted to overexpress mag proteins in recombinant baculovirus infected cells. Only one specific protein with a nuclear localization and a molecular mass comparable to that predicted for the mag endonuclease was observed. Moreover, our data suggest the existence of a strong translation inhibition of mag RNA in this expression system that could reflect mechanisms by which mag transposition may be controlled *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS

Construction of recombinant baculoviruses:

The baculovirus, *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus (AcMNPV), was propagated in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells (Summers and Smith, 1987). In the first step, three fragments of mag have been inserted into a baculovirus transfer vector. The transfer vector pVL1393 (Invitrogen), in which the initiation codon of the polyhedrin was removed through site-directed mutagenesis, was used to clone the ORF1 as an EcoRI-XbaI fragment. It contains the proper initiation and termination codons of translation of this ORF. The baculovirus transfer fusion vector pAc702 (Invitrogen) was used to clone the entire ORF2 plus the 222 overlapping nucleotides. For this, we used the opportunity of a BfrI restriction site located just at the beginning of this overlapping sequence. These 222 nucleotides were then entirely deleted by use of the Bal 31 enzyme (Boehringer-Mannheim) and the resulting fragment was cloned in the baculovirus transfer vector, pAc701. The pAc701 and pAc702 vectors represent the two open reading frames needed for the correct translation of ORF2 as a fusion protein with few amino acids of the polyhedrin.

The protein-coding sequence of the cloned fragments was verified by sequencing using the Sanger method (Sanger *et al.*, 1977) and the T7 DNA polymerase of phage T7 (Pharmacia). The recombination between the resulting transfer vectors and the wild type AcMNPV viral DNA was triggered by their cotransfection in Sf9 cells using DOTAP (Boehringer-Mannheim). Recombinants were plaque-purified by screening for occlusion-negative phenotypes (Summers and Smith, 1987). Two independent recombinant baculoviruses were prepared for each construct and tested by Southern Blot using the A75 probe (Fig. 1A and below) for the presence of the mag sequences.

Mag protein analysis:

Insoluble fraction of cell lysates prepared from Sf9 infected cells was carried out as described by Craigie *et al.* (1990) and purification of nuclei was done as described by Summers and Smith (1987). These preparations were performed three days post-infection (p.i.). Protein extracts were analyzed by SDS-PAGE on 12% polyacrylamide gel (Laemmli, 1970) and stained with Coomassie blue.

Northern Blot analysis:

Total RNA was prepared from 3×10^6 infected Sf9 cells one or two days p.i. Cell lysis was performed as described by Sambrook *et al.* (1989) followed by a cesium chloride ultracentrifugation for RNA preparation. Denatured RNA samples (10 µg per lane) were run on a 1% agarose formaldehyde eletrophoretic gel (Sambrook *et al.*, 1989) and blotted onto a nitrocellulose membrane (Amersham). The blots were hybridized overnight at 42 °C in 50% formamide, 5× SSC (1× SSC is 0.15M NaCl, 0.015M sodium citrate), 5× Denhart, 0.2% SDS and denaturated salmon DNA at a final concentration of 50 µg/ml. Filters were washed up to stringent conditions (0.1× SSC, 0.1% SDS) at 65 °C. The membrane was exposed to Kodak XOMAT-AR films at -80 °C between two intensifying screens.

The probe, named A75, corresponding to the EcoRI'-XhoI fragment of mag (2994 bp) (Fig. 1A) was labeled using a random primer DNA-labeling kit Boehringer-Mannheim to a specific activity of 10^9 cpm/µg of DNA.

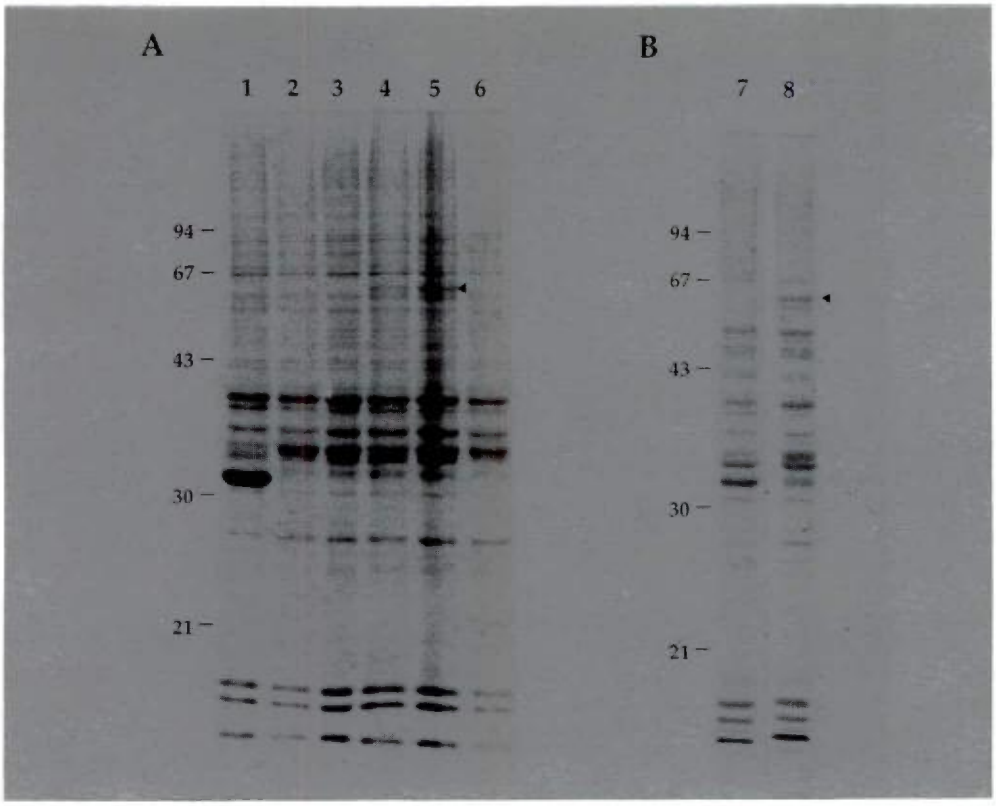

Fig. 1A: Structural organization of the retrotransposon mag.

The internal body of mag, flanked by short 5′ and 3′ terminal repeats (TR) contains two overlapping open reading frames designated ORF1 and ORF2. The ORF2 encodes for a putative protease (PR), reverse transcriptase-RNaseH (RT-RH) and endonuclease (ENDO). The initiation and termination codons of the ORF1 are shown as well as the ORF2 initiation codon, which is partially included in the ORF1 stop codon. The A75 probe used in Northern experiments is indicated.

Fig. 1B: Portions of mag ORF1-ORF2 inserted into recombinant baculoviruses.

Recombinant viruses contained internal portions of mag fused to the polyhedrin promoter and inserted at the polyhedrin locus. The polyhedrin gene sequence (hatched boxes) carries (vertical lines) or does not carry (horizontal lines) the initiation codon of the viral gene. Restriction sites are abbreviated as follows: E, EcoR I (E′ corresponds to a polymorphic EcoR I site); B, Bfr I; X, Xba I; Xh, Xho I.

Fig. 1A : Organisation de la structure du rétrotransposon mag.

Le corps interne de mag, flanqué par des répétitions terminales courtes en 5′ et 3′ (TR), contient deux cadres de lecture ouverts, ORF1 et ORF2, qui se chevauchent. ORF1 code pour une protéase putative (PR), une transcriptase inverse-RNaseH (RT-RH) et une endonucléase (ENDO). Les codons d'initiation et de terminaison d'ORF1 sont présentés, ainsi que le codon d'initiation d'ORF2, qui est partiellement inclus dans le codon d'arrêt d'ORF1. La sonde A75 utilisée dans les expériences "Northern" est indiquée.

Fig. 1B : Portions des ORF1-ORF2 de mag insérées dans les baculovirus recombinants.

Les virus recombinants contiennent les portions internes de mag fusionnées avec le promoteur de la polyédrine et insérées au niveau de son locus. La séquence des gènes de la polyédrine (parties hachurées) porte (lignes verticales) ou non (lignes horizontales) le codon d'initiation du gène viral. Les abréviations pour les sites de restriction sont les suivantes : E, EcoR I (E′ correspond à un site EcoR I polymorphe); B, Bfr I; X, Xba I; Xh, Xho I.

RESULTS

Mag recombinant baculoviruses:

In order to study the properties of the proteins encoded by the retrotransposon mag of *Bombyx mori*, we overexpressed them in the baculovirus system, *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (Summers and Smith, 1987). Three coding sequences of mag were first cloned in a baculovirus transfer vector at the polyhedrin locus (Fig. 1B). They correspond respectively to the ORF1 plus the beginning of the ORF2 ending at the position of the XbaI restriction site (resulting recombinant viruses were named vORF1), the full length ORF2 including the overlapping sequence (vORF2/OV) and finally, the full length ORF2 deleted of this overlapping region (vORF2). In this context, the transcription of the cloned sequences was under the control of the strong polyhedrin gene promoter and the stabilization of the transcripts under virus signals. The mag polyadenylation signal, located in the middle of the 3'TR was conserved in vORF2 and vORF2/OV as well as the initiation codon of the mag ORF1 in vORF1. Interestingly, we observed at about 1100pb upstream of the mag polyadenylation, the sequence AATTAA characteristic of two AcNPV genes (Westwood *et al.*, 1993).

The reading frames of the different clones were controlled by sequencing before the preparation of the recombinant baculoviruses. Two independent viruses were prepared for each construct. They were tested for the presence of mag sequence by Southern experiments (data not shown) before they were analyzed for their proteins produced.

On the basis of the conservation of amino acids characteristic of the gag and pol proteins (protease, reverse transcriptase and endonuclease) of other retrotransposons, we have estimated the molecular weight of the putative protein encoded by mag ORF1 to 26 kDa, and those of the putative protease, reverse transcriptase/RNase H and endonuclease to 21 kDa, 45 kDa and 58 kDa, respectively.

Expression of mag proteins in Sf9 baculovirus-infected cells:

In a first step, we analyzed (by SDS-PAGE) a whole protein extract from Sf9 infected cells at various days after infection. But no protein that we could attribute to mag sequences was observed. We then assayed the presence of the putative mag proteins in the insoluble fraction (Fig. 2A) or in the nucleus (Fig. 2B) of the infected cells, three days p.i. In these conditions and in a reproducible way, we identified one protein encoded by the mag ORF2 sequence (Fig. 2A, lanes 4 and 5; Fig. 2B, lane 8). The apparent molecular weight of this protein was estimated to 60 kDa. The abundance of this specific protein could be estimated low compared to those of the polyhedrin (compare polyhedrin lane 1 with mag protein lanes 4 and 5, Fig. 2A).

The specific protein was observed only in Sf9 cells infected with recombinant baculoviruses carrying the ORF2 deleted of the overlapping sequence. We verified that the overlapping region and the ORF2 were in frame with the polyhedrin initiation codon by sequencing the region of interest, excluding by this fact an artefactual termination of translation that could explain the absence of mag endonuclease in the insoluble fraction or in the nucleus of baculovirus vORF2 infected cells (data not shown).

No protein that we could attribute to the ORF1 was observed in the two clones tested.

Thus, the expression of a specific mag ORF2 protein located in the nucleus of the Sf9 infected cells and of a molecular weight of 60 kDa, in accordance with those estimated for the mag putative endonuclease (58 kDa), strengthen the suggestion that it corresponds to this protein.

Analysis of mag RNA in baculovirus infected Sf9 cells:

With the aim of understanding the reasons of the apparent limitation of mag protein accumulation, we analyzed the diversity and abundance of mag RNA in cells infected with the three types of recombinant baculoviruses. Total RNA was extracted from either one- or two-day Sf9 infected cells, as described in Materials and Methods and studied by Northern blot hybridizations. Mag RNA analyzed two days p.i. are qualitatively identical to those observed one day p.i. but are more abundant (data not shown).

The analysis of the autoradiogram (Fig. 3) after hybridization with the A75 probe (Fig. 1A) revealed no specific band for those cells infected by wild type viruses (lane 1), but one specific band

for the cells infected by vORF1 (lane 6) and three bands for the cells infected by vORF2/OV (lanes 2 and 3) or vORF2 (lanes 4 and 5).

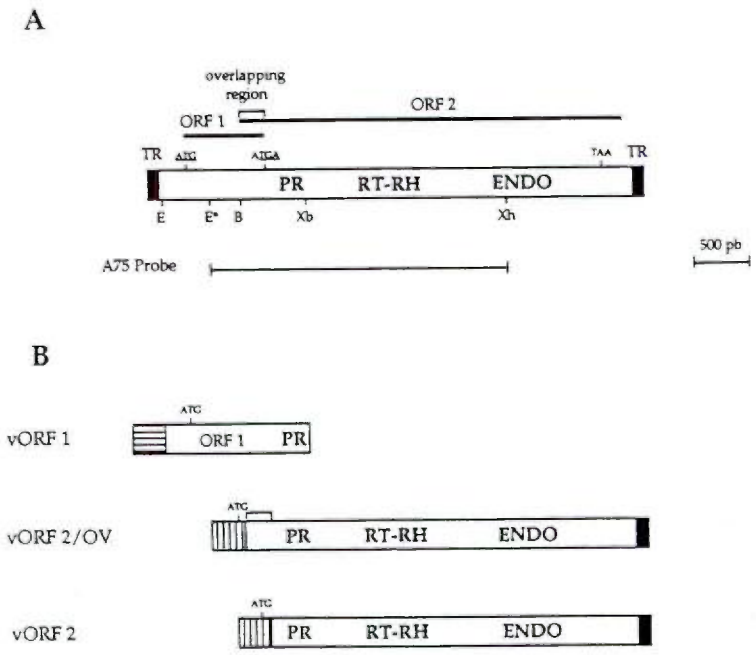

Fig. 2: Mag endonuclease expression in a baculovirus system.

A and B correspond respectively to proteins from the insoluble fraction or from nuclei, extracted from Sf9 cells 72 hours p.i. and stained with Coomassie blue after SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Infections were carried out with wild type virus (lanes 1 and 7), vORF2/OV (lanes 2 and 3), vORF2 (lanes 4, 5 and 8), or vORF1 (lane 6). Molecular weights are indicated in kDa. The arrow head points to the putative endonuclease encoded by mag.

Fig. 2 : Expression de l'endonucléase de mag dans un système baculoviral.

A et B correspondent respectivement aux protéines issues de la fraction non soluble ou aux noyaux extraits des cellules Sf9 72 heures après l'infection et colorées avec du bleu de Coomassie après électrophorèse sur gel SDS-polyacrylamide. Les infections ont été réalisées avec un virus de type sauvage (puits 1 et 7), vORF2/OV (puits 2 et 3), vORF2 (puits 4, 5 et 8), ou vORF1 (puits 6). Les poids moléculaires sont donnés en kDa. La flèche indique l'endonucléase putative codée par mag.

The single RNA species in vORF1 infected cells is 2400 nucleotides long and corresponds to a termination of transcription via the polyhedrin polyadenylation site, as expected for this virus. The difference in size of the three RNAs from cells infected with vORF2 or vORF2/OV is accounted for the absence or presence of the overlapping sequence. In both cases, we observed that the three RNAs are distributed as two major and one minor species. The last type is about 4600 nucleotides for vORF2/OV and 4400 nucleotides for vORF2. It corresponds to the expected size for messengers calibrated at the polyadenylation site of the polyhedrin gene. The most abundant RNA species are

3800 and 2700 nucleotides for vORF2/OV and 3600 and 2500 nucleotides for vORF2. The RNA of 3800 or 3600 nucleotides has the size expected for messengers ending via the mag polyadenylation signal which is located in the middle of the 3'TR and at 790 nucleotides from the polyhedrin one.

The presence of the last RNA species of 2700 or 2500 nucleotides could be explained by the termination of transcription via the sequence AATTAA. Indeed, such a sequence is used as a polyadenylation signal for the AcNPV p26 ORF and AcNPV IEI genes (Westwood *et al.*, 1993). It is located at about 1100 nucleotide upstream from the polyadenylation site of mag.

Mag RNAs are abundant in Sf9 infected cells. Indeed, strong hybridization signals were obtained with total RNA and only after two hours of exposure of the membrane to X-ray films. This result is confirmed by the comparison with the very low signal given in the same conditions by total RNA extracted from Sf9 cells transfected with a plasmid corresponding to the ORF2 under the *Bombyx* actin A3 promoter (Mounier *et al.*, 1986) (data not shown). Interestingly, the abundance of RNA calibrated at the mag or at the polyhedrin polyadenylation signal in cells infected by vORF2 or vORF2/OV is identical (Fig. 3).

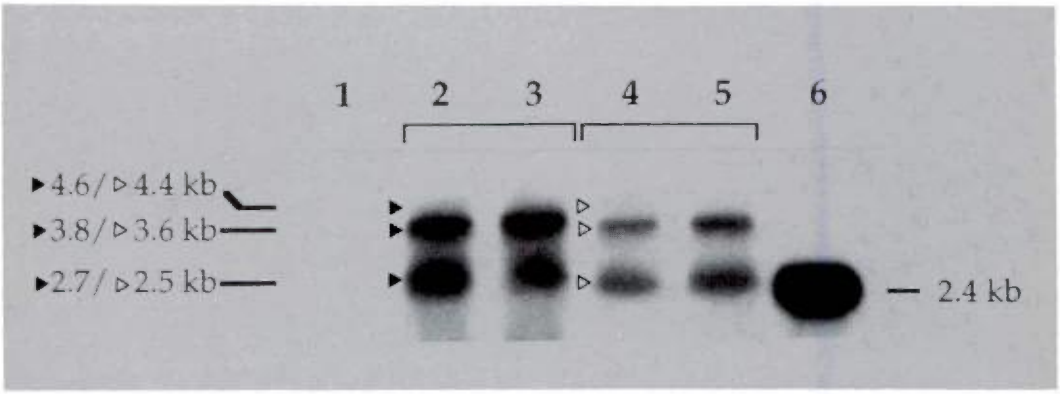

Fig. 3: Northern blot analysis of mag RNA in baculovirus infected cells.

Sf9 cells were infected with wild type baculovirus (lane 1), vORF2/OV (lanes 2 and 3), vORF2 (lanes 4 and 5) or vORF1 (lane 6). Ten µg of total RNA extracted 1 day post infection were deposited in each lane and hybridized with the A75 probe (see Figure 1A). The film was exposed for two hours at -80 °C, between two intensifying screens.

Fig. 3 : Analyse en transfert en "Northern" de l'ARN de mag dans les cellules infectées avec le baculovirus.

Les cellules Sf9 ont été infectées avec un baculovirus de type sauvage (puits 1), vORF2/OV (puits 2 et 3), vORF2 (puits 4 et 5) ou vORF1 (puits 6). Dix µg de l'ARN total extrait 1 jour après l'infection ont été déposés dans chaque puits et hybridés avec la sonde A75 (voir la figure 1A). Le film a été exposé deux heures à -80 °C entre deux écrans renforçateurs.

DISCUSSION

With the aim of studying the putative proteins encoded by the retrotransposon mag of *Bombyx mori*, we made an attempt to overexpress them in the baculovirus expression system derived from the *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus (Summers and Smith, 1987).

Three recombinant viruses carrying either the ORF1 or the ORF2 — with or without their natural overlapping region — were analyzed, but none led to the visible mag-specific proteins in whole extracts of Sf9 infected cells, showing that their expression is somehow inhibited.

Further investigations in which the proteins of the insoluble or nuclear fraction were examined revealed, however, the accumulation of a 60 kDa peptide encoded by the mag sequence inserted into vORF2 recombinant virus.

This protein is presumed to correspond to the mag endonuclease because its apparent molecular weight of 60 kDa is almost identical to that of 58 kDa predicted from mag sequence conceptual translation (in contrast, the expected molecular weights of the reverse transcriptase/RNase H and of the protease were estimated at 45 and 21 kDa, respectively). Its nuclear localization is in agreement with its presumed function as to catalyze the integration of a copy of a transposon into the chromosomal DNA. Our observations are strengthened by those of Craigie *et al.* (1990) who observed that the endonuclease of the Moloney Leukemia virus is located in the insoluble fraction of the Sf9 infected cells when expressed in a baculovirus expression system and by those of Abad *et al.* (1993) who showed that the putative transposase of the *Caenorhabditis elegans* transposable element Tc1 is concentrated in the nucleus of the Sf9 cells infected by a recombinant baculovirus.

The mag presumed endonuclease represents a small fraction of the total nuclear proteins. This apparent rate limiting accumulation may be the consequence of independent causes that would restrict mag sequences translation or transcription, or both.

Such cases of limited production of mobile elements encoded proteins in Sf9 cells have been observed on *C. elegans* Tc1 transposase (Abad *et al.*, 1993) and on *Trichoplusia ni* TED retrotransposon proteins (Lerch and Friesen, 1992) whose detection required that they are labeled *in vivo* with [^{35}S]methionine. Conversely, there are various examples of viral proteins that are well produced in this expression system (Craigie *et al.*, 1990; Montross *et al.*, 1991).

Whether the poor yield of production of mag proteins could arise from a limitation at the step of transcription was examined by studying the mag RNA in Sf9 infected cells. Our data show that discrete mag RNA species accumulate regularly during the first two days after infection with all the different recombinant viruses, irrespective of their capacity to lead or not to accumulation of proteins. In particular, the overlapping region is not responsible for any effects on transcription as mag RNAs expressed in cells infected by vORF2/OV are produced with the same efficiency as those by vORF2. This result suggests that the RNA sequence of the overlapping region is inhibitory for ORF2 translation.

The intensity of the hybridization signal and its comparison with that given by an Sf9 transfected construct indicate that mag RNAs are highly abundant, strongly suggesting that their accumulation is driven, as expected, by the powerful virus polyhedrin gene promoter. Their post-transcriptional maturation is eventually impaired by the usage of a cryptic polyadenylation signal, but this affects only a fraction of the entire pool of mag RNAs.

Taken together, our observations strongly suggest that the limitation of the production of mag proteins is the consequence of strong inhibitions at the step of translation. The absence of any traces of the protein encoded by the ORF1 in Sf9 cells infected with vORF1, whereas corresponding RNAs are abundant, confirm this result; this may constitute a limitation of ORF2 access to ribosomes.

The absence, on our polyacrylamide gels, of the mag putative reverse transcriptase and protease is not surprising because of the low production of the putative endonuclease itself. Indeed, it can be expected that the 3 proteins are produced in the same molar amount as they are the result of proteolytic cleavage of the ORF2 polyprotein. The putative endonuclease is observed because of its concentration into the nucleus. On the contrary, the reverse transcriptase and the protease located in the cytoplasm, are probably diluted in the whole protein fraction analyzed.

The process of elongation rather than the initiation is involved in the strong repression of the translation. Indeed, the substitution of the mag initiation site by that of the AcNPV polyhedrin does not restore the accumulation of mag proteins. It is likely that mag RNA organizes in secondary structures that may impair the progression of the ribosome. Interestingly, the use of a software for the prediction of secondary structures in RNA (Precuso software, Papanicolaon *et al.*, 1984) indicates that a very stable one (-41.7 kcal) could form within the first 130 bp of the overlapping sequence.

Such a hypothesis that the defect in translatability of mag RNA is induced by intrinsic properties of their sequence is strengthened by our observation that the same above mag sequences introduced into a bacteria expression vector do not lead to visible accumulation of their encoded proteins, unless they are pulse-labeled (results not shown).

It is likely that these phenomena reflect a manner by which the mobilization of the mag element, and may be other mobile elements, is strongly inhibited *in vivo*. With the efficient repression of its transcription, these mechanisms may explain the extremely rare occurrence of mobilization events affecting mag.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Jean-Claude Prudhomme for critical discussions. Special thanks to Béatrice Horard and Alain Mangé for their helpful discussions and constant encouragements.

REFERENCES

ABAD P., CERUTTI M., PAURON D., QUILES C., PALIN B., DEVAUCHELLE G., DALMASSO A. (1993) Expression and biochemical characterization of the DNA binding activity of TcA, the putative transposase of *Caenorhabditis elegans* transposable element Tc1. Biochem. Biophys. Res. Commun., 192, 1445-1452.

BOEKE J. (1989) Transposable elements in *Saccharomices cerevisiae*. *In* Mobile DNA (Edited by Berg D.E. and Howe M.M.), pp. 335-374. American Soc. for Microbiology, Washington, USA.

BURKE W.D., CALALANG C.C., EICKBUSH T.H. (1987) The site-specific ribosomal insertion element type II of *Bombyx mori* (R2Bm) contains the coding sequence for a reverse transcriptase-like enzyme. Mol. Cell. Biol., 7, 2221-2230.

CRAIGIE R., FUJIWARA T., BUSHMAN F. (1990) The IN protein of Moloney Leukemia virus processes the viral DNA ends and accomplishes their integration *in vivo*. Cell, 62, 829-837.

FINNEGAN D.J. (1989) Eucaryotic transposable elements and genome evolution. Trends Genet., 5, 103-107.

FINNEGAN D.J. (1992) Transposable elements. Current Opinion in Genetics and Development, 2, 861-867.

GAREL A., NONY P., PRUDHOMME J.-C. (1994) Structural features of mag, a gypsy-like retrotransposon of *Bombyx mori*, with unusual short terminal repeats. Genetica, 93, 125-137.

GRANDBASTIEN M.A. (1992) Retroelements in higher plants. Trends Genet., 8, 103-108.

LAEMMLI U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.

LERCH R.A., FRIESEN P.D. (1992) The baculovirus-integrated retrotransposon TED encodes *gag* and *pol* proteins that assemble into virus-like particles with reverse transcriptase. J. Virol., 66, 1590-1601.

MICHAILLE J.-J., MATHAVAN S., GAILLARD J., GAREL A. (1990) The complete sequence of mag, a new retrotransposon in *Bombyx mori*. Nucl. Acids Res., 18, 674.

MONTROSS L., WATKINS S., MORELAND R.B., MAMON H., CASPAR D.L.D., GARCEA R.L. (1991) Nuclear assembly of Polyomavirus capsids in insect cells expressing the major capsid protein VP1. J. Virol., 65, 4991-4998.

MOUNIER N., PRUDHOMME J.-C. (1986) Isolation of actin genes in *Bombyx mori*: the coding sequence of a cytoplasmic actin gene expressed in the silk glands is interrupted by a single intron in an unusual position. Biochimie, 68, 1053-1061.

PAPANICOLAON C., GOUY M., NINIO J. (1984) An energy model that predicts the correct folding of both the tRNA and 5S RNA molecules. Nucl. Acids Res., 12, 31-44.

SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SANGER F.S., NICKLEN S., COULSON A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci., 74, 5463-5467.

SUMMERS M.D., SMITH G.E. (1987) A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. Texas Exp. Station Bulletin No. 1555.

WESTWOOD J.A., JONES I.M., BISHOP D.H.L. (1993) Analyses of alternative Poly(A) signals for use in baculovirus expression vectors. Virology, 195, 90-99.

XIONG Y., EICKBUSH T.H. (1988) The site-specific ribosomal DNA insertion element R1Bm belongs to a class of non-long-terminal-repeat retrotransposons. Mol. Cell Biol., 8, 114-123.
XIONG Y., EICKBUSH T.H. (1990) Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequence. EMBO J., 9, 3353-3362.
XIONG Y., EICKBUSH T.H. (1993) *Dong*, a non-long terminal repeat (non-LTR) retrotransposable element from *Bombyx mori*. Nucl. Acids Res., 21, 1318.
XIONG Y., BURKE W.D., EICKBUSH T.H. (1993) *Pao*, a highly divergent retrotransposable element from *Bombyx mori* containing long terminal repeats with tandem copies of the putative R region. Nucl. Acids. Res., 21, 2117-2123.

INHIBITION DE LA TRADUCTION DES PROTEINES PUTATIVES CODEES PAR LE RETROTRANSPOSON MAG DE *BOMBYX MORI* DANS UN SYSTEME D'EXPRESSION DE BACULOVIRUS

P. NONY[1], M. CERRUTTI[2], A. GAREL[1], G. DEVAUCHELLE[2] & P. COUBLE[1]*

1. Centre de génétique moléculaire et cellulaire, CNRS-UMR 106, 43 boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.
2. Station de recherches de pathologie comparée, INRA-CNRS, 30380 Saint-Christol-lez-Alès, France.

Mag est un rétrotransposon du ver à soie ***Bombyx mori****. Il est présent en quelques exemplaires (4 à 15) disséminés dans le génome de différentes souches de* ***Bombyx****. Il semble que sa transcription soit fortement inhibée car aucun messager n'a été détecté dans les divers tissus testés à différents stades du développement, bien que des méthodes sensibles aient été utilisées. Il est intéressant de noter que l'utilisation du système d'expression de bacoluvirus pour surexprimer les protéines codées par mag montre que la traduction mais pas la transcription de mag est certainement fortement inhibée. Cependant, nous avons observé la présence d'une protéine qui semble être l'endonucléase de mag, étant donné sa localisation nucléaire et son poids moléculaire apparent.*

INTRODUCTION

Les éléments transposables sont largement répartis dans les génomes des espèces eucaryotes (Finnegan, 1989 ; Boeke, 1989 ; Finnegan, 1992 ; Grandbastien, 1992). On peut les classer en groupes distincts en fonction de leur structure et de leur mode de transposition. Chez le ver à soie *Bombyx mori*, cinq éléments mobiles ont été décrits à ce jour. Trois d'entre eux (R1Bm, R2Bm et Dong) appartiennent au groupe des rétrotransposons non-LTR (Burke et coll., 1987 ; Xiong et Eickbush, 1988 ; Xiong et Eickbush, 1993) et les deux autres (mag et Pao) appartiennent au groupe des rétrotransposons LTR (Michaille et coll., 1990 ; Xiong et coll., 1993).

Mag (de "magnan" qui signifie "ver à soie" en français méridional) a été le premier élément découvert pour cette classe. Il est présent en quelques exemplaire dont le nombre varie de 4 à 15 suivant la souche considérée. Nous avons émis l'hypothèse que mag a été transposé dans un passé récent car il est situé à des locus différents chez des souches voisines.

Mag contient 4564 bp, dont deux répétitions terminales directes courtes de seulement 77 bp, ce qui est étonnant si l'on considère que les répétitions terminales des rétrotransposons LTR se situent généralement entre 300 et 400 nucléotides. Néanmoins, ces répétitions terminales et leurs séquences directement adjacentes présentent tous les signaux nécessaires à la transcription en ARN génomique et à la transcription inverse. La séquence centrale de mag contient deux cadres ouverts de lecture : ORF1 et ORF2. Ils se chevauchent sur 222 pb et sont décalés d'un nucléotide. Ces ORF sont organisés de la même façon que ceux de gag et de pol des rétrovirus : ORF1 code un peptide supposé se lier aux acides nucléiques et ORF2, une protéase putative, une transcriptase inverse/RNase H et une endonucléase. Un codon d'initiation supposé d'ORF2 chevauche le codon de terminaison d'ORF1 (Fig. 1A). La comparaison des séquences de ces protéines permet de placer mag à l'intérieur du groupe "gypsy" des rétrotransposons LTR (Garel et coll., 1994). La transcription de mag semble être

* Auteur auquel la correspondance doit être adressée.

fortement inhibée car aucun messager n'a encore été détecté bien que des techniques sensibles comme le RT-PCR aient été appliquées sur les ovaires, les testicules, le corps adipeux ou les glandes séricigènes de *Bombyx* à différents stades du développement.

Afin d'élucider les mécanismes de mobilisation de mag, nous avons tenté de surexprimer les protéines de mag dans des cellules infestées avec des bacoluvirus recombinants. Une seule protéine spécifique, présentant une localisation nucléaire et une masse moléculaire comparables à celles estimées pour l'endonucléase de mag, a pu être observée. De plus, nos données suggèrent l'existence d'une forte inhibition de la traduction de l'ARN de mag dans ce système d'expression, inhibition qui pourrait refléter les mécanismes par lesquels la transposition de mag serait contrôlée *in vivo*.

MATERIELS ET METHODES

Construction de bacoluvirus recombinants :

Le baculovirus du virus de la polyédrose nucléaire d'*Autographa californica* (AcNPV) a été propagé dans des cellules Sf9 de *Spodoptera frugiperda* (Summers et Smith, 1987). En premier lieu, trois fragments de mag ont été insérés dans un vecteur de transfert baculoviral. Le vecteur de transfert pVL1393 (Invitrogen), duquel a été ôté le codon d'initiation de la polyédrine par mutagenèse dirigée, a été utilisé pour cloner ORF1 sous la forme d'un fragment EcoRI-XbaI. Il contient les codons d'initiation et de terminaison appropriés à la traduction de cet ORF. Le vecteur fusion de transfert baculoviral pAc702 (Invitrogen) a été utilisé pour cloner la totalité d'ORF2 plus les 222 nucléotides imbriqués. Pour cette expérience, nous nous sommes servis d'un site de restriction BfrI situé tout au début de cette séquence imbriquée. Ces 222 nucléotides ont ensuite été entièrement supprimés à l'aide de l'enzyme Bal 31 (Boehringer-Mannheim) et le fragment obtenu a été cloné dans le vecteur de transfert de baculovirus pAc701. Les vecteurs pAc701 et pAc702 représentent les deux cadres ouverts de lecture nécessaires à la traduction correcte d'ORF2 sous forme de protéine de fusion avec quelques acides aminés de la polyédrine.

La séquence codant les protéines des fragments clonés a été vérifiée par séquençage suivant la méthode de Sanger (Sanger et coll., 1977) et l'ADN polymérase T7 du phage T7 (Pharmacia). La recombinaison entre les vecteurs de transferts obtenus et l'ADN viral AcMNPV de type sauvage a été déclenchée par cotransfection dans les cellules Sf9 avec du DOTAP (Boehringer-Mannheim). Les recombinants ont été purifiés sur plaques par sélection des phénotypes occlusion-négatifs (Summers et Smith, 1987). Deux baculovirus recombinants indépendants ont été préparés pour chaque construction et testés par "Southern Blot" à l'aide de la sonde A75 (Fig. 1A et suivantes) afin de déterminer la présence des séquences mag.

Analyse protéique de mag :

Une fraction insoluble de lysats cellulaires préparés à partir de cellules Sf9 infestées a été réalisée selon la méthode décrite par Craigie et coll. (1990) et la purification des noyaux a été effectuée selon la méthode décrite par Summers et Smith (1987). Ces préparations ont été faites trois jours après l'infestation (p.i.). Les extraits protéiques ont été analysés par SDS-PAGE sur un gel de polyacrylamide à 12 % (Laemmli, 1970) et colorés avec du bleu de Coomassie.

Analyse par transfert en "Northern" :

L'ARN total a été préparé à partir de 3×10^6 cellules Sf9 un à deux jour p.i. La lyse cellulaire a été réalisée selon la méthode décrite par Sambrook et coll. (1989) puis par ultracentrifugation sur chlorure de césium pour la préparation de l'ARN. Les échantillons d'ARN dénaturé (10 µg par puits) ont été soumis à électrophorèse en formaldéhyde sur un gel d'agarose à 1 % (Sambrook et coll., 1989) et buvardés sur une membrane en nitrocellulose (Amersham). Les blots ont été hybridés pendant une nuit à 42 °C dans 50 % formamide, 5× SSC (1× SSC correspond à 0,15m NaCl, 0,015M citrate de sodium), 5× Denhardt, 0,2 % SDS et de l'ADN de saumon dénaturé à une concentration finale de 50 µg/ml. Les filtres ont été lavés jusqu'à obtention de conditions stringentes (0,1× SSC, 0,1 % SDS) à 65 °C. La membrane a été exposée sur des pellicules Kodak XOMAT-AR à -80 °C entre deux écrans renforçateurs.

La sonde, dénommée A75 et correspondant au fragment EcoRI'-XhoI de mag (2994 pb) (Fig. 1A), a été marquée à l'aide d'un kit de marquage d'ADN par amorçage aléatoire de Boehringer-Mannheim pour une activité spécifique de 10^9 cmp/µg d'ADN.

RESULTATS

Baculovirus recombinants de mag :

Afin d'étudier les propriétés des protéines codées par le rétrotransposon mag de *Bombyx mori*, nous les avons surexprimées avec le système baculoviral du virus de la polyédrose nucléaire d'*Autographica californica* (Summers et Smith, 1987). Trois séquences codantes de mag ont été tout d'abord clonées dans un vecteur baculovirus de transfert au niveau du locus de la polyédrine (Fig. 1B). Elles correspondent respectivement à l'ORF1 plus le début de l'ORF2 qui se termine à la position du site de restriction XbaI (les virus recombinants obtenus ont été dénommés vORF1), l'ORF2 dans sa longueur totale qui comprend la séquence imbriquée (vORF2/OV) et enfin, l'ORF2 dans toute sa longueur moins la région imbriquée (vORF2). Dans ce contexte, la transcription des séquences clonées est gouvernée par le promoteur du gène de la polyédrine et la stabilisation des transcrits par des signaux viraux. Le signal de polyadénylation de mag, situé au milieu du 3'TR, a été conservé chez vORF2 et vORF2/OV ainsi que le codon initiateur de l'ORF1 de mag chez vORF1. Il est intéressant de noter que nous avons observé, à environ 1100 bp en amont du signal de polyadénylation de mag, la séquence AATTAA caractéristique de deux gènes de AcNPV (Westwood et coll., 1993).

Les cadres de lecture des différents clones ont été contrôlés par séquençage avant préparation des baculovirus recombinants. Deux virus indépendants ont été préparés pour chaque construction. Ces deux virus ont été soumis à des tests afin de vérifier la présence de la séquence de mag par "Southern" (données non présentées) avant analyse des protéines qu'ils ont produites.

Sur la base de la conservation des acides aminés caractéristiques des protéines de gag et de pol (protéase, transcriptase inverse et endonucléase) d'autres rétrotransposons, nous avons estimé le poids moléculaire des protéines putatives codées par l'ORF1 de mag à 26 kDA et ceux de la protéase putative, de la transcriptase inverse/RNase H et de l'endonucléase respectivement à 21 kDa, 45 kDa et 58 kDa.

Expression des protéines de mag dans les cellules Sf9 infestées par le baculovirus :

En premier lieu, nous avons analysé (par SDS-PAGE) un extrait protéique entier de cellules Sf9 infestées à différents jours après l'infestation. Nous n'avons cependant observé aucune protéine susceptible d'appartenir aux séquences de mag. Nous avons ensuite testé la présence des protéines putatives de mag dans la fraction insoluble (Fig. 2A) ou dans le noyau (Fig. 2B) des cellules infestées trois jours p.i. Dans ces conditions et de manière reproductible, nous avons identifié une protéine codée par la séquence ORF2 de mag (Fig. 2A, puits 4 et 5 ; Fig. 2B, puits 8). Le poids moléculaire apparent de cette protéine a été estimé à 60 kDa. L'abondance de cette protéine spécifique semble faible en comparaison de celle de la polyédrine (comparer la polyédrine sur le puits 1 avec la protéine de mag sur les puits 4 et 5, Fig. 2A).

Cette protéine spécifique a été observée uniquement sur les cellules Sf9 infestées avec des baculovirus recombinants portant l'ORF2 moins la séquence imbriquée. Nous nous sommes assurés que la région imbriquée et l'ORF2 sont en phase avec le codon d'initiation de la polyédrine par séquençage de la région d'intérêt, qui exclue de ce fait une terminaison artificiellement fabriquée de la traduction qui pourrait expliquer l'absence de l'endonucléase de mag dans la fraction insoluble ou dans le noyau des cellules infestées par vORF2 du baculovirus (données non présentées).

Aucune protéine susceptible d'appartenir à ORF1 n'a été observée chez les deux clones testés.

L'expression d'une protéine ORF2 spécifique de mag située dans le noyau des cellules Sf9 infestées et d'un poids moléculaire de 60 kDa, conformément à celles estimées pour l'endonucléase putative de mag (58 kDa), appuie l'hypothèse qu'elle correspond bien à cette protéine.

Analyse de l'ARN de mag dans les cellules Sf9 infestées par le baculovirus :

Dans le but de comprendre les causes de la limitation apparente de l'accumulation des protéines de mag, nous avons analysé la diversité et l'abondance de l'ARN de mag dans les cellules infestées avec trois types de baculovirus recombinants. L'ARN total a été extrait de cellules Sf9 infestées après un et deux jours, suivant le protocole décrit dans les Matériels et Méthodes et étudié par hybridation en "Northern Blot". Les ARN de mag analysés deux jours p.i. sont qualitativement identiques à ceux observés un jour p.i. mais sont plus abondants (données non présentées).

L'analyse de l'autoradiogramme (Fig. 3) après hybridation avec la sonde A75 (Fig. 1A) ne fait apparaître aucune bande spécifique pour les cellules infestées par les virus de type sauvage (puits 1) mais révèle une bande spécifique pour les cellules infestées par vORF1 (puits 6) et trois bandes pour les cellules infestées par vORF2/OV (puits 2 et 3) et vORF2 (puits 4 et 5).

La seule espèce d'ARN présente chez les cellules infestées par vORF1 est longue de 2400 nucléotides et correspond à la terminaison de transcription via le site de polyadénylation de la polyédrine, comme on peut s'y attendre chez ce virus. La différence de taille des trois ARN des cellules infestées avec vORF2 ou vORF2/OV s'explique par la présence ou l'absence de la séquence imbriquée. Dans les deux cas, nous avons observé que les trois ARN sont répartis en deux espèces majeures et une espèce mineure. Ce dernier type est d'environ 4600 nucléotides pour vORF2/OV et 4400 nucléotides pour vORF2. Il correspond à la taille estimée pour les messagers calibrés au site de polyadénylation du gène de la polyédrine. Les espèces d'ARN les plus abondantes sont de 3800 et 2700 nucléotides pour vORF2/OV et de 3600 et 2500 nucléotides pour vORF2. L'ARN de 3800 et 3600 nucléotides présente la taille estimée pour les messagers se terminant via le signal de polyadénylation de mag qui est situé au milieu du 3'TR et à 790 nucléotides de celui de la polyédrine.

La présence de la seconde espèce d'ADN de 2700 ou 2500 nucléotides pourrait s'expliquer par la terminaison de la transcription via la séquence AATTAA. En effet, ce type de séquence sert de signal de polyadénylation pour l'ORF des p26 d'AcNPV et pour les gène IEI d'AcNPV (Westwood et coll., 1993). Il se situe à environ 1100 nucléotides en amont du site de polyadénylation de mag.

Les ARN de mag sont abondants dans les cellules Sf9 infestées. En effet, les signaux intenses d'hybridation ont été obtenus avec l'ARN total et seulement après deux heures d'exposition de la membrane aux rayons X. Ce résultat est confirmé par la comparaison avec le signal très faible produit dans les mêmes conditions par l'ARN total extrait des cellules Sf9 transfectées avec un plasmide correspondant à l'ORF2 sous contrôle du promoteur de l'actine A3 de *Bombyx* (Mounier et coll., 1986) (données non présentées). En outre, l'abondance des ARN calibrés au signal de polyadénylation de mag ou de la polyédrine dans les cellules infestées par vORF2 ou vORF2/OV est identique (Fig. 3).

DISCUSSION

Afin d'étudier les protéines putatives codées par le rétrotransposon mag de *Bombyx mori*, nous avons tenté de surexprimer celles-ci dans un système d'expression baculoviral dérivé du virus de la polyédrose nucléaire d'*Autographica californica* (Summers et Smith, 1987).

Trois virus recombinants portant soit l'ORF1, soit l'ORF2 – avec ou sans leur région imbriquée naturelle – ont été analysés mais aucun n'a donné de protéines spécifiques de mag visibles dans des extraits entiers de cellules Sf9 infestées, ce qui montre que leur expression est, d'une manière ou d'une autre, limitée.

Des études complémentaires, au cours desquelles les protéines de la fraction insoluble ou nucléaire ont été analysées, ont cependant fait apparaître l'accumulation d'un peptide de 60 kDa codé par la séquence de mag insérée dans le virus recombinant de vORF2.

On suppose que cette protéine correspond à l'endonucléase de mag car son poids moléculaire apparent, qui est de 60 kDa, est pratiquement identique à celui de 58 kDa estimé sur la base de la traduction conceptuelle de la séquence de mag (par contraste, les poids moléculaires pour la transcriptase inverse/RNase H et pour la protéase sont estimés respectivement à 45 et 21 kDa). Sa localisation nucléaire est conforme à sa fonction présumée qui serait de catalyser l'intégration d'une copie d'un transposon dans l'ADN chromosomique. Nos observations sont corroborées par celles de Craigie et coll. (1990) qui ont observé que l'endonucléase du virus de la leucémie de Moloney est

située dans la fraction insoluble des cellules Sf9 infestées lorsqu'elles s'expriment dans un système d'expression de baculovirus et par celles d'Abad et coll. (1993) qui ont montré que la transposase putative de l'élément transposable Tc1 de *Caenorhabditis elegans* est concentrée dans le noyau des cellules Sf9 infestées par un baculovirus recombinant.

L'endonucléase présumée de mag représente une petite fraction des protéines nucléaires totales. Cette accumulation à taux apparent limité pourrait être la conséquence de causes indépendantes qui restreindraient la traduction et/ou la transcription des séquences de mag.

De tels cas de production limitée de protéines codées d'éléments mobiles dans les cellules Sf9 ont été observés chez la transposase Tc1 de *C. elegans* (Abad et coll., 1993) et chez les protéines du rétrotransposon TED de *Trichoplusia ni* (Lerch et Friesen, 1992) dont la détection nécessite leur marquage *in vivo* avec de la [^{35}S]méthionine. A l'inverse, il existe de nombreux exemples de protéines virales qui sont bien produites dans ce système d'expression (Craigie et coll., 1990 ; Montross et coll., 1991).

Nous avons examiné si ce faible rendement en protéines de mag pourrait provenir d'une inhibition au stade de la transcription en étudiant l'ARN de mag dans les cellules Sf9 infestées. Nos données montrent que les espèces d'ARN de mag s'accumulent de façon régulière au cours des deux premiers jours après l'infestation avec tous les virus recombinants, qu'ils soient ou non capables d'entraîner une accumulation de protéines. En particulier, la région imbriquée n'est responsable d'aucun effet sur la transcription car les ARN de mag exprimés dans les cellules infestées par vORF2/OV sont produits de manière aussi efficace que ceux obtenus par vORF2. Ce résultat suggère que la séquence d'ARN de la région imbriquée est inhibitrice pour la traduction d'ORF2.

L'intensité du signal d'hybridation et sa comparaison avec celui donné par une construction transfectée Sf9 indique que les ARN de mag sont abondants, ce qui suggère fortement que leur accumulation est conduite, comme on le pensait, par le puissant promoteur du gène de la polyédrine virale. Leur maturation post-transcriptionnelle pourrait être détériorée par l'utilisation d'un signal de polyadénylation cryptique, mais ceci concerne une fraction seulement du réservoir total des ARN de mag.

Dans leur ensemble, nos résultats suggèrent fortement que la limitation de la production de protéines de mag est la conséquence d'inhibitions puissantes au stade de la traduction. L'absence de toute trace de la protéine codée par ORF1 dans les cellules Sf9 infestées avec vORF1, alors que les ARN correspondants sont abondants, conforte ce résultat ; ceci pourrait constituer une limitation de l'accès d'ORF2 aux ribosomes.

L'absence, sur nos gels de polyacrylamide, de la transcriptase inverse et de la protéase putatives de mag n'est pas surprenante étant donné la faible production de l'endonucléase putative elle-même. En effet, on peut penser que les trois protéines sont produites en quantités molaires identiques car elles sont issues d'un clivage protéolytique des polyprotéines d'ORF2. On peut observer l'endonucléase putative en raison de sa concentration dans le noyau. Au contraire, la transcriptase inverse et la protéase situées dans le cytoplasme sont probablement diluées dans la fraction protéique entière analysée.

Le processus d'élongation plutôt que d'initiation est impliqué dans la forte inhibition de la traduction. En effet, la substitution du site d'initiation de mag par celui de la polyédrine d'AcNPV ne permet pas de rétablir l'accumulation des protéines de mag. Il est vraisemblable que l'ARN de mag s'organise en structures secondaires qui pourraient altérer la progression du ribosome. Il est intéressant de noter que l'utilisation d'un logiciel pour prédire les structures secondaires dans l'ARN (logiciel Precuso, Papanicolaon et coll., 1984) indique qu'une structure très stable (-41,7 kcal) pourrait se former dans les 130 premières pb de la séquence imbriquée.

Une telle hypothèse, selon laquelle le manque de traduction des ARN de mag est induit par des propriétés intrinsèques de leur séquence, est corroborée par le fait que ces mêmes séquences de mag introduites dans un vecteur d'expression bactérien n'entraîne pas d'accumulation visible des protéines qu'elles codent, sauf si elles sont marquées par pulse (résultats non présentés).

Il est possible que ces phénomènes reflètent la manière par laquelle la mobilisation de l'élément de mag, et peut-être d'autres éléments mobiles, est fortement inhibée *in vivo*. Etant donné la puissance de l'inhibition de sa transcription, ces mécanismes pourraient expliquer la présence extrêmement rare d'événements de mobilisation affectant mag.

STUDIES ON THE INHERITANCE OF A DELETION TYPE OF THE BLOOD ESTERASE ISOENZYMES IN THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

HE J.-L.

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

The silkworm variety, Dong34, which has a deletion of haemolymph esterase isoenzymes in the A region on gel electrophoretograms, is a homozygote for the codominant multiple allele BesA0. The genotype symbol of Dong34 is BesA0/A0. The esterase isoenzyme in the A region has been identified as a cholinesterase.

Keywords: *Bombyx mori*, blood esterase isoenzymes, deletion type, cholinesterase, inheritance.

INTRODUCTION

In the haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*, polymorphic variations are found in three esterase isoenzymes named AA, BB, and CC, according to their electrophoretic mobility. There is also an esterase deletion type, OO, without enzymatic activity (Eguchi *et al.*, 1965; Gamo, 1978). In my research, polyacrylamide gel electrophoretograms of silkworm blood esterase exhibit many more staining bands, which were generally divided into three regions designated as A, B and C for esterase isoenzymes with fast, intermediate and slow mobility, respectively. Some silkworm varieties did not exhibit a staining zone in the A region. This deletion type of blood esterase isoenzymes was named the A0 type. Discovering the phenotype of the A0 deletion in the variety Dong34 among Chinese croosbreeding varieties (He, 1981; He and Yi, 1983), the author carried out studies on the inheritance of the deletion type. The present paper describes the inheritance of the variation (deletion), and some properties of the blood esterase isoenzymes.

MATERIALS AND METHODS

Silkworm varieties:

Dong34, which was obtained from Zhenjiang Silkworm Egg Producing Farm, is used for commercial silkworm egg production in Jiangsu Province; Dong34(Zhe) is used for egg production in Zhejiang Province. 34Ji and Su17, which were the original parents for crossbreeding of Dong34, as well as Su12 were provided by the Research Division of Silkworm Genetic Resources in the Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences. 34Ji × Su17, Dong34 × 34Ji, Dong34 × Su17, Dong34 × Su12, Su12 × Dong34, and (Su12 × Dong34) × (Su12 × Dong34) were produced in the author's laboratory.

Assay methods:

Silkworm larvae of each variety were reared with mulberry leaves by routine methods. After pupation, the young pupae were taken out of cocoons and kept at 4 °C.

According to the procedures of preceding papers (He, 1981; He and Yi, 1983), electrophoresis was carried out on discontinuous thin layer slab polyacrylamide gels (concentrating gel: 0.5 cm length,

T 3.1%, C 20%, pH 6.7, 20% (w/v) sugar; segregating gel: 10 cm length, T 7.2%, C 2.6%, pH 8.9; whole gel plate; 0.2 cm thick, 18 cm wide; electrode buffer: pH 8.3, Tris-glycine. In 4-10 °C, run gel until Bromthymol blue dye front just runs out of the gel, 22 mA, 9 hr).

For observation of esterase zymograms, mixed blood of five pupae randomly sampled from each variety was separated by electrophoresis and stained. For studies on zymogram differences among individuals of a variety, the fresh haemolymph was removed from a single pupa by penetrating the skin with a micro-injector, and 20 µl of haemolymph was immediately applied to each slot of the gel without any pre-treatment. Esterase activity was detected with α-naphthyl acetate substrate and Fast Blue RR staining agent.

β-naphthyl acetate and Fast Blue B were used as substrate and staining agent in the staining reaction of haemolymph. The method for identification of the nature of esterase isoenzymes was essentially the same as that described by Chen *et al.* (1980).

The stained esterase bands were recorded with a Shimadzu dual-wavelength TLC scanner CS-910 using a linear scanning wavelength (LS) of 500 nm and a linear reference wavelength (LR) of 720 nm.

Relative migration of enzymic band, $Rm = X2 \times L1 / X1 \times L2$.
X1 = migration distance of staining marker in non-staining gel;
X2 = migration distance of enzymic band in staining gel;
L1 = gel length before staining;
L2 = gel length after staining.

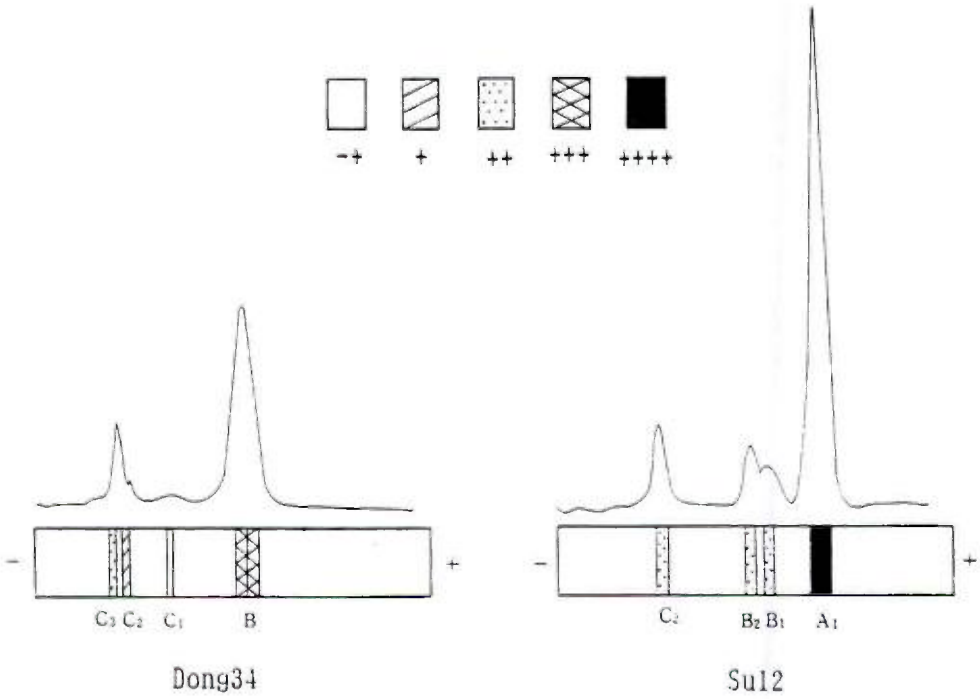

Fig. 1: Silkworm blood esterase electrophoretograms and scanning zymograms showing the relative staining intensity in varieties Dong34 and Su12.

Fig 1 : Electrophorégrammes et spectres des zymogrammes de l'estérase du sang de ver à soie montrant l'intensité de la coloration relative chez Dong34 et Su12.

RESULTS AND DISCUSSION

1. Comparison of the blood esterase electrophoretograms among different varieties:

As shown in Figures 1 and 2, blood esterases in the three different regions are designated as A, B and C for isoenzymes with fast, intermediate, and slow mobility, respectively. In the C region, three isoenzyme bands migrating at different mobilities are detected in the variety Dong34 and the most rapidly migrating of the three bands was designated as C1, the intermediate as C2, and the slowest as C3, respectively (Fig. 1). Only C2 was observed in variety Su17. In the B region a single band was observed in variety Dong34, and two bands, B1 and B2, in variety Su17. In the A region, a variant phenotype lacking this esterase band was observed in variety Dong34 and was designated as A0 (deletion type), although the pupal and larval haemolymph in most varieties have an A1 band in this staining region. One band (A1) is observed in the variety Su12. In addition, 34Ji and Su17, the original parents of the crossbreed variety Dong34, also have esterase band A1. The latter varieties all belong to the A1 type.

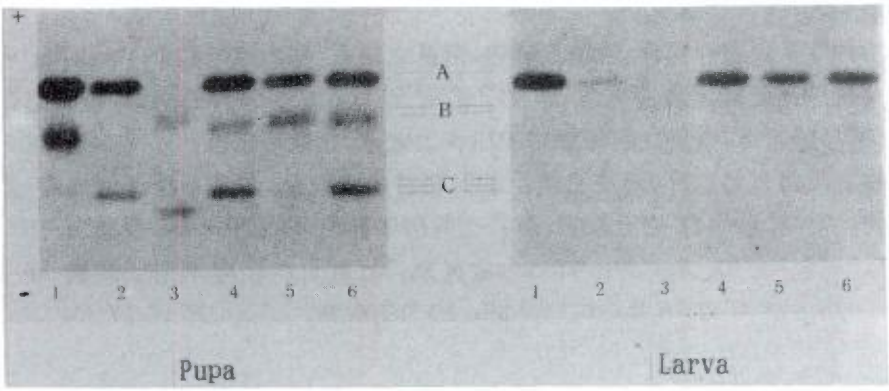

Fig. 2: Silkworm blood esterase electrophoretograms of Dong34, Su12, its F_1 hybrid and the original parents of Dong34.

1: Su17, **2:** 34Ji, **3:** Dong34, **4:** Su12, **5:** Su12 × Dong34, **6:** Dong34 × Su12.
Su17 and 34Ji are the original parents of Dong34.

Fig. 2 : Electrophorégrammes de l'estérase du sang de ver à soie chez Dong34, Su12, son hybride F_1 et les souches parentales de Dong34.

1 : Su17, 2 : 34Ji, 3 : Dong34, 4 : Su12, 5 : Su12 × Dong34, 6 : Dong34 × Su12.
Su17 et 34Ji sont les souches parentales de Dong34.

2. Blood esterase zymograms of individuals from the F_1 hybrid of 34Ji and Su17:

Figure 3 illustrates the blood esterase electrophoretograms of 32 pupae obtained from the F_1 hybrid of 34Ji and Su17. Two samples of the 64 individuals tested expressed phenotypes lacking an esterase band in the A region (A0 deletion type), although the remaining 62 individuals have an A1 band in the A region. In the blood staining reaction, 35 samples of 36 pupal individuals produced a purplish red precipitate; only one sample showed an orange red coloration, which indicated the absence of an esterase band in the A region. To sum up, 3% of the individuals in the F_1 hybrid of 34Ji × Su17 express the phenotype lacking an esterase band in the A region (A0 deletion type), and 97% of the individuals have this enzymic band (A1 type).

Fig. 3: Blood esterase electrophoretograms of F_1 hybrid 34Ji × Su17.
Fig. 3 : Electrophorégrammes de l'estérase de sang chez l'hybride F_1 34Ji × Su17.

3. Blood esterase electrophoretograms of individuals in the progeny of backcrosses Dong34 × 34Ji and Dong34 × Su17:

The electrophoretic zymogram showed that 34 of 48 pupal individuals in progeny of Dong34 × 34Ji expressed a phenotype lacking the A1 band (A0 deletion type), and the remaining 14 individuals in the progeny showed the A1 type (Fig. 4). In other words, 70.8% of the progeny of the backcross Dong34 × 34Ji expressed the A0 type. On the contrary, all 48 individuals of the progeny of the backcross Dong34 × Su17 expressed the A1 type, but the A0 deletion type failed to appear.

Fig. 4: Blood esterase electrophoretograms of individuals in progeny of backcross Dong34 × 34Ji.

Fig. 4 : Electrophorégramme de l'estérase dans le sang d'individus descendant du rétrocroisement Dong34 × 34Ji.

4. Blood esterase electrophoretograms of individuals from varieties 34Ji and Su17:

The presence of individuals homozygous for BesA0/BesA0 (deletion type A0) in the population of variety 34Ji was shown by electrophoretograms in which 4 of 16 pupal individuals expressed the A0 deletion phenotype (25%, Fig. 5). However, no deletion type, A0, was observed on electrophoretograms of 26 individuals and in blood staining reactions of 24 individuals from variety Su17.

Fig. 5: Blood esterase electrophoretogram of individuals from variety 34Ji.

Fig. 5 : Electrophorégramme de l'estérase de sang chez les individus de la variété 34Ji.

5. Blood esterase electrophoretograms of individuals from progeny of backcross (Dong34 × Su12) × Dong34:

Figure 6 is the blood esterase electrophoretograms of male individuals obtained from offspring of backcross (Dong34 × Su12) × Dong34. Individuals with and without the esterase band in the A region are presented in two experimental groups.

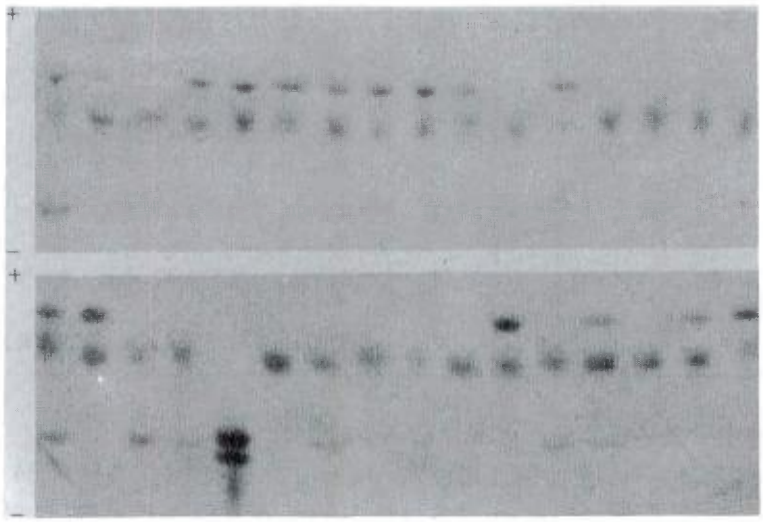

Fig. 6: Blood esterase electrophoretograms of male individuals obtained from offspring of backcross (Dong34 × Su17) × Dong34.

Fig. 6 : Electrophorégramme de l'estérase dans le sang des individus mâles issus du rétrocroisement (Dong34 × Su17) × Dong34.

A1 type individuals / *Individus de type A1* = 16. A0 type individuals / *Individus de type A0* = 16.

Results obtained from various crosses are presented in Table I. The genetic segregation patterns for esterase isoenzyme A obtained in the offspring by various crosses coincided with expected Mendelian ratios for a single gene controlling the esterase A locus. For example, the offspring obtained from the backcross of (Dong34 × Su12) × Dong34 segregated into two types, A1A1 and A0A0, at a ratio of 1:1. In the offspring obtained by crosses of heterozygous moths (Dong34 × Su12) *inter se*, two homozygous and one heterozygous type segregated in the expected three phenotypes at a ratio of 1:2:1, or two phenotypes in a ratio of 3:1. According to a χ^2 test, the difference between the theoritically expected data and experimentally observed values is insignificant.

The polymorphic variations in blood esterase isoenzyme components in polyacrylamide gels behave as if they are controlled by codominant autosomal alleles, which are designated BesA, BesB, and BesC. For esterase isoenzyme A, the codominant allele is designated as BesA1, and the deletion (null) type as BesA0. Dong34 may be homozygous for an esterase isoenzyme deletion in the A region; its genotype is designated as BesA0/BesA0, and the heterozygote, Dong34 × Su12, as BesA1/BesA0.

Table I. χ^2 determination.

Tableau I. Détermination du χ^2.

Variety	Gene type	Number of pupae	Sex	Expected		Observed		DF	χ^2	P
				A1A1 A1A0	A0A0	A1A1 A1A0	A0A0			
Variété	*Type de gènes*	*Nombre de chrysalides*	*Sexe*	*Estimé*		*Observé*		*DF*	χ^2	*P*
				A1A1 A1A0	*A0A0*	*A1A1 A1A0*	*A0A0*			
(Dong34×Su12)×Dong34	A1A0×A0A0	32	M	16	16	16	16	1	0	1
(Dong34×Su12)×Dong34	A1A0×A0A0	32	FM	16	16	18	14	1	0.5	70.5
(Su12×Dong34)× (Su12×Dong34)	A1A0×A1A0	64	M	48	16	50	14	1	0.33	70.5

M: Male / *Mâle*. **F:** Female / *Femelle*. **DF:** Degree of freedom / *Degrés de liberté*. **P:** Probability / *Probabilité*.

$\chi^2 = \Sigma (\frac{d^2}{e})$

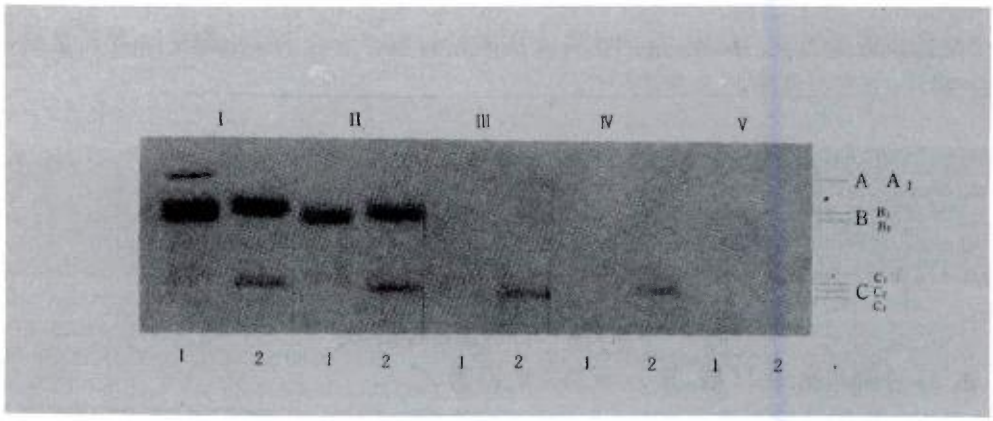

Fig. 7: Inhibitory effect of DDVP in different concentrations on the activity of blood esterase isoenzymes.

Fig. 7 : Effet inhibiteur du DDVP à différentes concentrations sur l'activité des isoenzymes de l'estérase du sang.

Variety / *Variété*: **1:** Su12; **2:** Dong34.
Concentration of DDVP (M) / *Concentration en DDVP (M)*: **I:** 10^{-7}; **II:** 10^{-6}; **III:** 10^{-5}; **IV:** 10^{-4}; **V:** 10^{-3}.

6. Genotype of Dong34 (Zhe):

Dong34 (Zhe) is a strain used for silkworm egg production in Zhejiang province. Seventeen of 21 pupal individuals from strain Dong34 (Zhe) exhibited an esterase isoenzymic band in the A region on polyacrylamide gels, and the remaining 4 individuals lacked an A1 band. This indicates that a small number of individuals in the strain Dong34 (Zhe) may be heterozygous (designated as BesA1/BesA0), and segregation occurred in the mating between two moths that emerged from pupae of same strain. All the individuals obtained from the F_1 hybrid of 34Ji × Su17 should be of the A1 type, but 3 % of individuals appeared with the A0 deletion phenotype. This suggested that a high BesA1 gene frequency and a low BesA0 gene frequency may be present in the population of variety Su17.

Although it is possible that Dong34 carries a deletion for the BesA locus, other models can also explain the author's observations, such as an altered regulatory gene or element that prevents expression of BesA. For this reason, it might be more precise to use the term 'null' type in place of 'deletion' type throughout the paper.

Table II. Identification of the nature of silkworm blood esterase isoenzymes of varieties Su12 and Dong34.

Tableau II. Identification de la nature des isoenzymes de l'estérase du sang de ver à soie des variétés Su12 et Dong34.

Enzymatic band	Rm	Su12		Dong34		Inhibition					
		Activity	Esterase type	Activity	Esterase type	Eserine 10^{-3}	Eserine 10^{-4}	Tpp 10^{-4}	Paraoxon 10^{-6}	DDVP (M) 10^{-3}	DDVP (M) 10^{-6}
Bande enzymatique	*Rm*	*Activité*	*Type d'estérase*	*Activité*	*Type d'estérase*	*Eserine 10^{-3}*	*Eserine 10^{-4}*	*Tpp 10^{-4}*	*Paraoxon 10^{-6}*	*DDVP (M) 10^{-3}*	*DDVP (M) 10^{-6}*
A1	0.47	++++	Cholinesterase			+	+-	-	+	+	+
B1	0.39		Arylesterase	+++	Arylesterase	-	-	-	+-	+	-
B2	0.37	++	Arylesterase			-	-	-	+-	+	-
C1	0.30			+-	Arylesterase	-	-	-	+-	+	-
C2	0.24	++	Arylesterase	+	Arylesterase	-	-	-	+-	+-	-
C3	0.21			++	Arylesterase	-	-	-	+-	+-	-

7. Identification of the nature of the silkworm blood esterase isoenzymes:

10^{-3} M of eserine inhibits the enzymatic activity completely and 10^{-4} M of eserine inhibits the enzymatic activity to a great degree in the A region. However, eserine does not inhibit the enzymatic activity in the B and C regions. 10^{-6} M of trichlorphon (DDVP) inhibits the enzymatic activity in the A region, but it does not inhibit the enzymatic activity in the B and C regions. At a higher concentration of DDVP (10^{-3}M), the C3 band of Dong34 and the C2 band of Su12 still exhibit a small amount of the enzymatic activity; this indicates that esterase isoenzyme bands in the B and C regions are much more resistant to DDVP. All of the bands in the A, B and C regions are resistant to 10^{-4} M of triphenylphosphoester (TPP). In 10^{-6} M of Paraoxon (diethyl-4-nitrophenyl phosphate), the enzymatic activity in the A region was fully inhibited, the enzymatic activity in the B region decreased slightly, but the staining bands in the B and C regions did not fully disappear. Because the bands in the A region

may be inhibited by Paraoxon, DDVP and eserine, this enzyme should belong to the cholinesterase family. Because the enzymatic activity in the B and C regions were not inhibited by eserine, and exhibited resistance to TPP and Paraoxon, these enzymes should be arylesterases. The enzymatic bands in the B region also exhibited partial carboxylesterase activity, due to their inhibition by 10^{-6} M of Paraoxon. The identification of the nature of the enzyme bands in each staining zone is shown in Table II.

It has been shown experimentally that Dong34 is much more resistant to chlordimeform [N'-(4-chloro-2-methylphenyl)-N, N-dimethymethanimidamide]; the survival rate of silkworm larvae (cocooning ratio) is 15 times higher than that of the control group. Dong34 is also resistant to infection by silkworm densonucleosis virus (BmDNV), but Dong34 (Zhe), on the contrary, is susceptible to BmDNV infection. Insect cholinesterase is the target enzyme of the organic phosphorus insecticides, and generally, esterase activity in insects is positively correlated with resistance to organic phosporus insecticides. The relationship between the A0 deletion of the variety Dong34 and the susceptibility to organic phosphorous insecticides is worthy further study. The relationship between DNV and organic phosphorous resistance could be coincidental or could reflect a common underlying mechanism related to cholinesterase activity.

REFERENCES

BROOTH G.M., CONNER J., METCALF R.A., LARSEN J.R. (1973) A comparative study of the effects of selective inhibitors on esterase isoenzymes from the mosquito, *Anopheles punctipennis*. Comp. Biochem. Physiol., 44B, 1185-1195.

CHEN C.-Y., JIANG C.-L., LIN G.-F., LIU W.-D. (1980) Studies on the resistance of the Dipterex-resistant mosquito, *Culex pipiens pallens* Coq — On the relationship between hydrolase and resistance. Acta Entomologica Sinica, 23(4), 350-357.

EGUCHI M., YOSHITAKE N., KAI H. (1965) Type and inheritance of blood esterase in the silkworm, *Bombyx mori* L. J. Genetics, 40(1), 15-19.

GAMO T. (1978) Chromosome mapping of the blood esterase gene in the silkworm, *Bombyx mori*. J. Genetics, 53(2), 129-131.

HE J.-L. (1981) Blood esterase isoenzymes in the silkworm, *Bombyx mori*. Acta Sericologia Sinica, 7(1), 65-67.

HE J.-L., YI W.-Z. (1983) The blood esterase map in the silkworm varieties. Acta Sericologia Sinica, 9(2), 103-136.

YE X.-Y., YI W.-Z. (1981) Studies of the resistance to chlordimeform in the silkworm varieties. Jiangsu Sericulture, 4, 22-25.

ETUDES SUR LA TRANSMISSION HEREDITAIRE D'UN TYPE DE DELETION DES ISOZYMES DE L'ESTERASE DU SANG CHEZ LE VER A SOIE *BOMBYX MORI* L.

HE J.-L.

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

La variété de ver à soie Dong34, qui présente une délétion des isoenzymes de l'estérase de l'hémolymphe visible par électrophorèse sur gel dans la région A, est homozygote pour l'allèle multiple codominant BesA0. Le symbole du génotype de Dong34 est BesA0/A0. L'isoenzyme estérase de la région A a été identifiée comme étant une cholinestérase.

INTRODUCTION

Dans l'hémolymphe du ver à soie *Bombyx mori*, on observe des variations polymorphiques chez trois isoenzymes de l'estérase dénommées AA, BB et CC, en fonction de leur mobilité électrophorétique. Il existe également un type de délétion estérase (OO) ne présentant aucune activité enzymatique (Eguchi et coll., 1965 ; Gamo, 1978). Dans les travaux présentés ici, les électrophorèses sur gel de polyacrylamide de l'estérase sanguine du ver à soie révèlent beaucoup plus de bandes colorées, généralement divisées en trois régions dénommées A, B et C correspondant respectivement aux isoenzymes à mobilité rapide, moyenne et lente. Certaines variétés de vers à soie ne présentent pas de bande colorée dans la région A. Ce type de délétion des isoenzymes de l'estérase du sang est appelé le type A0. A la suite de la découverte, parmi des croisements chinois, du phénotype de la délétion A0 chez la variété Dong34 (He, 1981 ; He et Yi, 1983), l'auteur a réalisé des études sur la transmission de ce type de délétion. La transmission de la variation (délétion) et certaines propriétés des isoenzymes de l'estérase du sang sont décrites dans cet article.

MATERIELS ET METHODES

Variétés de vers à soie :

Dong34, qui a été fourni par la station de grainage de Zhenjiang, est utilisé pour la production d'oeufs de vers à soie à l'échelle commerciale dans la province de Jiangsu ; Dong34 (Zhe) est également utilisé pour le grainage dans la province de Zhejiang. 34Ji et Su17, les parents d'origine du croisement Dong34, et Su12 ont été fournis par la division de recherches sur les ressources génétiques du ver à soie de l'Institut de recherches séricicoles de l'Académie des sciences agricoles de Chine. Les variétés 34Ji × Su17, Dong34 × Ji, Dong34 × Su17, Dong34 × Su12, Su12 × Dong34, et (Su12 × Dong34) × (Su12 × Dong34) ont été produites au laboratoire de l'auteur.

Méthodes de dosage :

Des larves de chacune de ces variétés ont été élevées sur feuilles de mûrier selon les méthodes conventionnelles. Après la nymphose, les jeunes chrysalides ont été retirées de leurs cocons et conservées à 4 °C.

Selon les protocoles décrits dans des publications précédentes (He, 1981 ; He et Yi, 1983), l'électrophorèse a été réalisée sur des gels de polyacrylamide en plaques fines discontinues (gel de

concentration : 0,5 cm de longueur, T 3,1 %, C 20 %, pH 6.7, 20 % (p/v) ; gel de séparation : 10 cm de longueur, T 7,2 %, C 2,6 %, pH 8,9 ; plaque de gel entier : 0,2 cm d'épaisseur, 18 cm de largeur ; tampon électrode : pH 8,3, Tris-glycine ; l'électrophorèse est effectuée entre 4 et 10 °C jusqu'à ce que le bleu de Bromthymol sorte du gel, 22 mA, 9 h).

Pour l'observation des zymogrammes de l'estérase, du sang issu de cinq chrysalides sélectionnées au hasard dans chaque variété est mélangé puis séparé par électrophorèse et coloré. Pour l'étude des différences entre les zymogrammes des individus d'une variété, l'hémolymphe fraîche est prélevée sur une seule chrysalide en insérant une micro-seringue dans la peau et 20 µl d'hémolymphe sont appliqués immédiatement sur chaque puits du gel, sans pré-traitement. L'activité estérase a été détectée en utilisant comme substrat de l'α-naphtyl acétate et le colorant Fast Blue RR.

Le β-napthyl acétate et le colorant Fast Blue B ont été utilisés comme substrat et agent de coloration pour la réaction de coloration de l'hémolymphe. La méthode de détermination de la nature des isoenzymes de l'estérase est identique à celle décrite par Chen et coll. (1980).

Les bandes estérases colorées ont été enregistrées avec un scanner TLC à double longueur d'onde Shimadzu CS-910 en utilisant une longueur d'onde de lecture linéaire (LS) de 500 nm et une longueur d'onde de référence linéaire (LR) de 720 nm.

Migration relative de la bande enzymatique : $Rm = X2 \times L1 / X1 \times L2$.

X1 = distance de migration du marqueur colorant dans le gel non coloré ;

X2 = distance de migration de la bande enzymatique dans le gel coloré ;

L1 = longueur du gel avant coloration ;

L2 = longueur du gel après coloration.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Comparaison des électrophorégrammes de l'estérase sanguine entre les différentes variétés :

Comme le montre les figures 1 et 2, les estérases sanguines des trois régions distinctes sont dénommées A, B et C et correspondent respectivement aux isoenzymes à mobilité rapide, moyenne et lente. Dans la région C, on détecte trois bandes d'isoenzymes migrant à des vitesses différentes chez la variété Dong34 ; la plus rapide de ces trois bandes est dénommée C1, la bande à migration moyenne C2 et la plus lente C3 (Fig. 1). Seule C2 a été observée chez la variété Su17. Pour la région B, une seule bande a été observée chez la variété Dong34 et deux bandes (B1 et B2) ont été observées chez la variété Su17. Pour la région A, un phénotype variant dépourvu de cette bande a été observé chez la variété Dong34 et dénommé A0 (type de délétion), bien que l'hémolymphe des larves et des chrysalides de la plupart des variétés présentent une bande A1 dans cette région de coloration. La variété Su12 présente une bande (A1). De plus, 34Ji et Su17, les souches parentales du croisement Dong34, révèlent également une bande estérase A1. Ces variétés appartiennent toutes au type A1.

2. Zymogrammes des estérases sanguines d'individus issus de l'hybride F_1 de 34Ji et Su17 :

La figure 3 illustre les électrophorégrammes des estérases sanguines de 32 chrysalides issues de l'hybride F_1 de 34Ji et Su17. Deux échantillons des 64 individus testés expriment des phénotypes dépourvus de bande estérasique dans la région A (type de délétion A0), bien que les 62 individus restant présentent une bande A1 dans la région A. Lors de la réaction de coloration, 35 échantillons de 36 chrysalides individuelles produisent un précipitat rouge violacé ; un seul échantillon présente une coloration rouge orangé, indiquant l'absence d'une bande estérasique dans la région A. En résumé, 3 % des individus de l'hybride F_1 de 34Ji × Su17 expriment le phénotype dépourvu de bande estérase dans la région A (type de délétion A0) et 97 % des individus présentent cette bande enzymatique (type A1).

3. Electrophorégrammes des estérases sanguines chez des descendants des rétrocroisements Dong34 × 34Ji et Dong34 × Su17 :

Le zymogramme électrophorétique montre que 34 des 48 chrysalides des descendants de Dong34 × 34Ji expriment un phénotype dépourvu de bande A1 (type de délétion A0) et que les

14 individus restant présentent le type A1 (Fig. 4). En d'autres termes, 70,8 % des descendants du rétrocroisement Dong34 × 34Ji expriment le type A0. A l'inverse, les 48 individus de la descendance du rétrocroisement Dong34 × Su17 expriment le type A1 mais le type de délétion A0 n'a pas été détecté.

4. Électrophorégrammes des estérases sanguines des individus des variétés 34Ji et Su17 :

La présence d'individus homozygotes pour BesA0/BesA0 (type de délétion A0) dans la population de la variété 34Ji a été révélée par électrophorégrammes pour lesquels 4 des 16 chrysalides expriment le phénotype de délétion A0 (25 %, Fig. 5). Cependant, aucun type de délétion A0 n'a été observé, ni sur les électrophorégrammes de 26 individus, ni dans les réactions de coloration du sang de 24 individus de la variété Su17.

5. Electrophorégrammes des estérases sanguines d'individus issus du rétrocroisement (Dong34 × Su12) × Dong34 :

La figure 6 présente les électrophorégrammes des individus mâles issus de la descendance du rétrocroisement (Dong34 × Su12) × Dong34. Les individus avec ou sans la bande estérase dans la région A sont répartis en deux groupes expérimentaux.

Les résultats obtenus pour les divers croisements sont présentés dans le tableau I. Les modèles de ségrégation génétique pour l'isoenzyme estérase A obtenue chez les descendants des divers croisements coïncident avec les rapports mendéliens estimés pour un seul gène gouvernant le locus de l'estérase A. Par exemple, la descendance issue du rétrocroisement (Dong34 × Su12) × Dong34 se divise en deux types (A1A1 et A0A0) dans un rapport de 1:1. Chez les descendants obtenus par croisement *inter se* des papillons hétérozygotes (Dong34 × Su12), deux types homozygotes et un type hétérozygote se divisent, conformément aux estimations, en trois phénotypes dans un rapport de 1:2:1 ou en deux phénotypes dans un rapport de 3:1. D'après un test χ^2, la différence entre les données théoriques estimées et les données observées n'est pas significative.

Les variations polymorphiques des composants des isoenzymes de l'estérase du sang dans les gels de polyacrylamide semblent indiquer qu'elles sont gouvernées par des allèles autosomiques codominantes, dénommées BesA, BesB et BesC. Pour l'isozyme A, l'allèle codominant est dénommé BesA1 et le type de délétion (nul) BesA0. Dong34 pourrait être homozygote pour une délétion de l'isoenzyme de l'estérase de la région A ; son génotype a été appelé BesA0/BesA0 et le croisement hétérozygote Dong34 × Su17 a été appelé BesA1/BesA0.

6. Génotype de Dong34 (Zhe) :

Dong34 (Zhe) est une souche utilisée pour la production d'oeufs dans la province de Zhejiang. Dix-sept des 21 chrysalides de la souche Dong34 (Zhe) présentent une bande d'isoenzyme de l'estérase dans la région A sur gel de polyacrylamide et les 4 individus restants sont dépourvus de bande A1. Ceci indique qu'un petit nombre d'individus de la souche Dong34 (Zhe) pourrait être hétérozygotes (dénommés BesA1/BesA0), et la ségrégation se produit au moment de l'accouplement entre deux papillons issus de chrysalides d'une même souche. Tous les individus obtenus à partir de l'hybride F_1 de 34Ji × Su17 devraient être du type A1 mais 3 % d'entre eux présentent le phénotype de délétion A0 ; ceci suggère une fréquence élevée de gènes BesA1 et une fréquence faible de gènes BesA0 chez la population de la variété Su17.

Bien qu'il soit possible que Dong34 porte une délétion pour le locus BesA, d'autres modèles peuvent également expliquer les observations de l'auteur, comme une modification du gène ou de l'élément régulateur qui inhibe l'expression de BesA. Pour cette raison, l'expression "type nul" semble plus juste que "type de délétion" dans cet article.

7. Détermination de la nature des isoenzymes de l'estérase dans le sang du ver à soie :

L'ésérine à 10^{-3} M inhibe totalement l'activité enzymatique et l'ésérine à 10^{-4} M inhibe fortement l'activité enzymatique de la région A. Cependant, l'ésérine n'inhibe pas l'activité enzymatique dans les régions B et C. Le trichlorphon (DDVP) à 10^{-6} M inhibe l'activité enzymatique dans la région A mais pas dans les régions B et C. A fortes concentrations de DDVP (10^{-3} M), la bande C3 de Dong34

et la bande C2 de Su12 continuent de présenter une faible activité enzymatique ; ceci indique que les bandes d'isoenzymes de l'estérase dans les régions B et C sont beaucoup plus résistantes au DDVP. Toutes les bandes des régions A, B et C sont résistantes à 10^{-4} M de triphénylphophoester (TPP). A 10^{-6} M de Paraoxon (diéthyl-4-nitrophényl phosphate), l'activité enzymatique de la région A est totalement inhibée, l'activité enzymatique de la région B diminue légèrement mais les bandes de coloration des régions B et C ne disparaissent pas complètement. Les bandes de la région A pouvant être inhibées par le Paraoxon, le DDVP et l'ésérine, cette enzyme doit appartenir à la famille des cholinestérases. L'activité enzymatique des régions B et C n'étant pas inhibée par l'ésérine et présentant une résistance au TPP et au Paraoxon, ces enzymes devraient être des arylestérases. Les bandes enzymatiques de la région B présentent également une activité carboxylase partielle liée à leur inhibition par 10^{-6} M de Paraoxon. La détermination de la nature des bandes enzymatiques dans chaque zone de coloration est présentée dans le tableau II.

Des expériences ont démontré que Dong34 est beaucoup plus résistant au chlordiméforme [N'-(4-chloro-2-méthylphényl)-N, N-diméthyméthanimidamide] ; le taux de survie des larves (pourcentage de filage) est 15 fois plus élevé que celui du groupe témoin. Dong34 est également résistant au virus de la densonucléose du ver à soie (BmDNV), mais Dong34 (Zhe), au contraire, est sensible à l'infestation par le BmDNV. La cholinestérase des insectes est l'enzyme cible des insecticides à base d'organo-phosphorés et, en règle générale, l'activité estérase chez les insectes est corrélée positivement avec la résistance à ce type d'insecticide. La relation entre la délétion A0 de la variété Dong34 et la sensibilité aux insecticides à base d'organo-phosphorés pourrait soit être due à un effet de coïncidence, soit refléter un mécanisme sous-jacent commun lié à l'activité cholinestérase.

THE MECHANISM OF COCOON OPENING IN *BOMBYX MORI* (LEPIDOPTERA, BOMBYCIDAE)

P. ŠVÁCHA* & H. AKAI**

National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

The cocoon of ***Bombyx mori*** *is opened by the action of a maxillary protease (cocoonase) dissolved in the crop fluid. The fluid is not produced by the crop itself, but originates from the swallowed moulting fluid, and may thus contain its own proteases. In addition, some cocoonase may dissolve in the moulting fluid before the latter is swallowed. Published reports suggesting the participation of a midgut-produced protease in cocoon opening are critically re-examined and re-interpreted, and such participation is considered highly unlikely.*

Keywords : *Bombyx mori*, cocoon opening, proteases, moulting fluid.

INTRODUCTION

The cocoon opening mechanism in silk-producing moths with valveless cocoons has been studied mainly in the genus *Antheraea* of the Saturniidae (Kafatos, 1976, and references therein). It has been found that the maxillae metamorphose into a glandular organ producing a protease (named cocoonase), which is extruded and present in dry form on the maxillary surface before hatching. The newly hatched adult (still within the cocoon) dissolves the enzyme in buffered liquid produced by the metamorphosed labial glands, and the solution is delivered to the cocoon. The enzyme attacks the sericin layers of the silk, thus softening the apical part of the cocoon through which the adult is then able to escape.

Maxillary development and cocoonase production in *Bombyx mori* are very similar to those described by Selman et Kafatos (1975) for *Antheraea*, including the transitory occurrence of flagellar structures during development of the glandular units (unpublished; see Fig. 1). However, the labial glands, which function as silk glands during larval development, completely disappear during metamorphosis (Ito, 1915; personal observation). Thus, the question arises as to what is the origin of the fluid used to dissolve the enzyme.

MATERIALS AND METHODS

We used silkworms from standard breedings of the National Institute of Sericultural and Entomological Science in Tsukuba. Larvae were maintained on an artificial diet at 24-28 °C. At this temperature the development from pupal ecdysis to adult emergence lasts about 11-12 days. Insects were dissected during the last three days of the pupal instar to determine when the crop fluid first occurs.

To visualise the flow of the moulting fluid, a small crystal of neutral red was inserted into the ecdysial space (through a small incision in the pupal cuticle) near the mouth at the time of fluid

* Present address: Institute of Entomology, Czech Academy of Sciences, Branišovská 31, 370 05 Ceské Budejovice, Czech Republic.

** Present address: 1030-34, Miyawada, Fujishiro-machi, Ibaraki 300-15, Japan.

swallowing (pharate adults within 2 days before emergence). The stream of dissolved dye could be seen through the semi-transparent pupal cuticle under a binocular microscope. Overall staining of the fluid, however, was weak because the crystal surface was soon covered by clogged moulting fluid material.

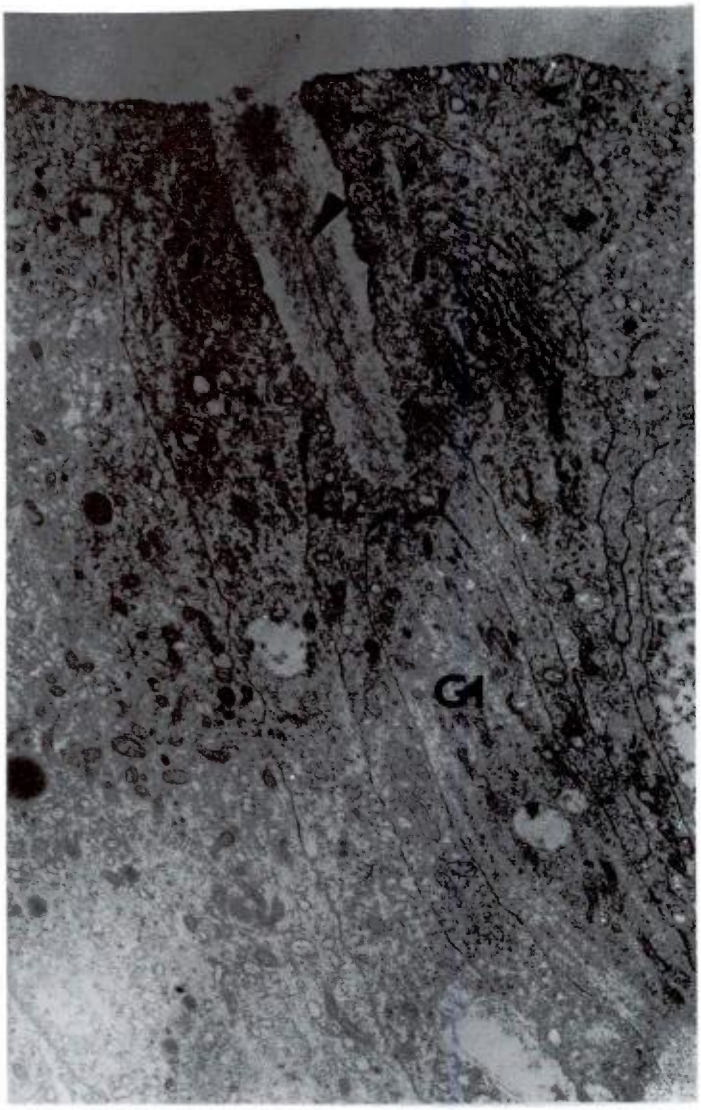

Fig. 1: Transmission electron micrograph of a developing maxillary glandular unit of *Bombyx mori* at the moment of beginning of cuticle production (the epicuticular plaques have not yet been united).

G1, G2: Prospective glandular cells. **D:** Duct cell. **Arrowhead:** Transitory flagellar structure. Compare with Selman and Kafatos, 1975.

Fig. 1 : Vue au microscope électronique à transmission d'une unité glandulaire maxillaire en développement de* Bombyx mori *au début de la production de cuticule (les plaques épicuticulaires n'ont pas encore été unifiées).

G1, G2 : Cellule mère de la glande. D : Cellule souche du canal. Flèche : Structure flagellaire transitoire. Comparer avec Selman et Kafatos, 1975.

To stain the swallowed fluid more intensely, a small piece of the pupal cuticle (about 2-4 mm^2) above the mouth of the pharate adult was removed, and a drop of *Bombyx* saline with 0.5-1% toluidine blue was placed over the mouth (the procedure was repeated several times). After being swallowed,

the stain could be localised in the dissected alimentary tract. Non-dissected individuals survived and could escape from the pupal cuticle, but were usually unable to escape from the cocoon.

To find out whether constraint or injections can restore production of the fluid for cocoon moistening, we injected 0-24 hr old adults with varying amounts of distilled water (up to 0.3 ml) and/or confined them in cocoons or immobilised them by adhesive tape.

Each experiment was repeated at least 3-5 times, and results were entirely consistent and unambiguous.

RESULTS AND DISCUSSION

After shedding the pupal cuticle, the emerging *Bombyx* adult (observed through a side window made in the cocoon) first delivers a large drop of fluid on the inner apical surface of the cocoon, and then bathes the whole anterior part of head, including the maxillary lobes, in the liquid, obviously to dissolve the maxillary cocoonase. The enzyme is present in crystal form on the surface of the maxillary lobes. Crystals dissolved in phosphate buffer at a pH close to 8 exhibit high enzymatic activity when applied to cocoon fragments, and considerable activity is retained even if the enzyme is dissolved in distilled water, although neutral pH is probably far from the enzyme's optimum (the pH optimum for the *Antheraea* cocoonase has been reported to be about 8.3: Kafatos *et al.*, 1967).

The fluid used for cocoon moistening and cocoonase dissolving is delivered from the crop as has been described (Honda, 1926, and references therein), but it is not produced by it. The crop, which has the form of a large and membranous dorsal stomodaeal diverticulum (Fig. 2) with very fine transparent walls and no secretory epithelium, is empty until about 24 hours before emergence when it begins to fill with the moulting fluid.

The moulting fluid is gradually swallowed during the last 1-2 days before adult emergence. When a small crystal of some dye (e.g., neutral red) is inserted into the moulting fluid near the mouth, the periodical flow of the liquid into the mouth opening can be visualised. Staining of the moulting fluid indicates that some fluid passes into the midgut (the crop volume may not be sufficient for receiving all the fluid swallowed), but much of it, and mainly the latest portions, are stored in the crop. If, in the period of massive fluid imbibing by the pharate adult, the pupal cuticle in the mouth region is opened and a drop of coloured *Bombyx* saline is placed over the mouth, the drop is quickly swallowed, and on subsequent dissection the stain is found in the crop (normally the crop liquid is clear and colourless). If left alive and confined in a cocoon, on the next day such an adult will hatch and deliver coloured fluid for cocoon opening.

Another piece of evidence indicates that the crop fluid is of extraneous origin and not produced by the crop itself. In *Antheraea* (possessing cocoonase) and *Hyalophora* (lacking cocoonase), both of which actively produce the fluid for cocoon moistening in the labial glands, it has been reported that constraint (in the cocoon or otherwise) or injections of distilled water or diluted salt solutions can provoke fluid secretion from the labial glands even relatively long after the moth's emergence (more than one day in *Hyalophora*; Edwards, 1964; Kafatos, 1968). If *Bombyx* pupae were artificially removed from their cocoons so that the hatched moths did not have to open them, the fluid was not delivered, yet it disappeared within hours (perhaps via midgut) from the crop, which was then filled with air. As soon as the crop was emptied (either by delivering the fluid for cocoon opening, or after the fluid had disappeared without being used), we were unable to provoke new fluid production by constraint and/or injections.

The crop fluid itself (when collected by a syringe from the crop of a dissected pharate adult shortly before emergence) is distinctly active against the cocoon material as well, although much less than if additional maxillary cocoonase is dissolved in it, but this seems easy to explain. First, the moulting fluid may contain its own proteases (see Katzenellenbogen and Kafatos, 1971, for characterization of proteases present in the moulting fluid of *Antheraea polyphemus*). These proteases may also contribute to activation of the cocoonase zymogen — cf. Berger *et al.* (1971). Second, the moulting fluid bathes, or at least partially so, the maxillary lobes until very shortly before emergence, and some maxillary cocoonase may be extruded before all the fluid is swallowed. This might explain why, apparently, the latest possible fractions of the moulting fluid (which would also contain the greatest amounts of cocoonase) are stored in the crop. Otherwise it would seem more logical to fill

the crop first, and to allow only the superfluous moulting fluid to pass into the midgut. The mildly alkaline pH of the moulting fluid of *Antheraea* (7.6; Katzenellenbogen and Kafatos, 1971) is compatible with cocoonase function.

Eguchi and collaborators (Eguchi and Iwamoto, 1975, and references therein) entertained the idea that in *Bombyx* some midgut-produced proteases are involved in cocoon opening. They showed that the midgut contains proteolytic enzymes active against silk proteins; that agar gel electrophoresis shows these enzymes to be of similar size to those in the crop liquid (both midgut and crop obviously contain more than one enzyme); that the midgut protease activity peaks a day or two before emergence, and the enzyme is present in the midgut content and is almost lacking from the midgut cells (Eguchi *et al.*, 1972); that the midgut and crop proteases are apparently antigenically identical while the maxillary protease is different; that removal of the maxillae but also extirpation of the midgut immediately after pupation significantly lowers the protease activity of the cocoon-softening fluid delivered by the emerging moth and its ability to escape from the cocoon. From this, Eguchi and Iwamoto (l.c. p. 1372) concluded: "Different origins of proteases are involved in the cocoon-digesting enzyme. One is produced in the midgut and another in the maxillae. The crop is regarded as a reservoir and pump. Proteases produced in the midgut are transferred to the crop and stored in it.(...) The crop is also considered to produce a buffer, which solubilizes the partially crystalline deposit of maxilla protease." They, however, failed to explain how the midgut proteases are transferred to the crop, and their conclusions were inconsistent with some of their data. Differences in the properties of proteases of the midgut and crop of the pharate adult required speculation about possible modifications of the midgut enzymes in the crop. Distribution of gut proteases was commented on as follows: "In our recent study, the protease activity of the meconium in the rectal sac of the pharate adult is markedly low compared with that of midgut protease in the same animal, consequently we consider that the bulk of midgut protease moves forward." Again, no mechanism of this movement was proposed.

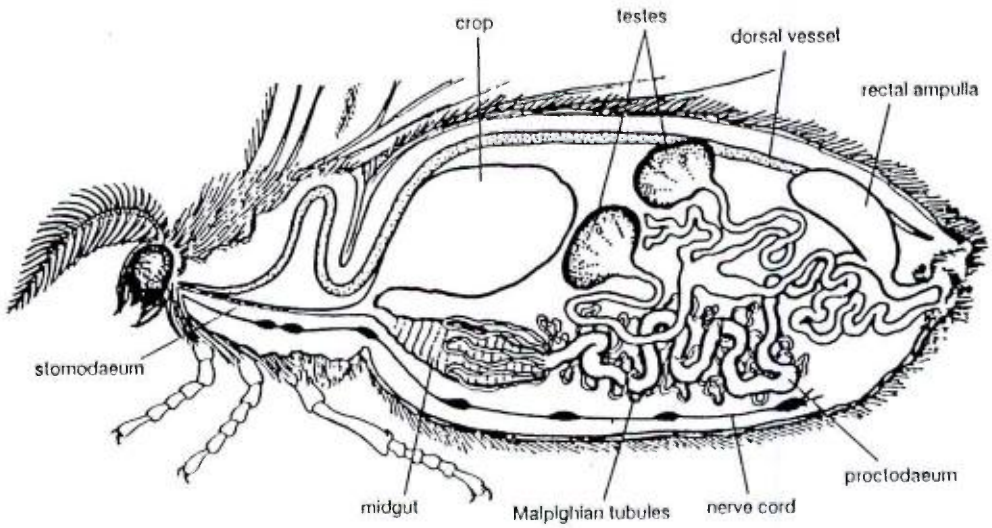

Fig. 2: Schematic drawing of some internal organs of adult male *Bombyx mori*, showing the large stomodaeal diverticulum (the crop) lying dorsally in the anterior abdomen.

(After Mori, 1980).

Fig. 2 : Schéma des organes internes chez l'adulte mâle de* Bombyx mori, *faisant apparaître le grand diverticule stomodéal (gésier) situé sur la partie dorsale de l'abdomen antérieur.

(D'après Mori, 1980).

Our observations do not disprove the possibility that a midgut-produced protease participates in the opening of the cocoon. However, they do provide alternative explanations of the data by Eguchi and collaborators. First, the presence of midgut proteolytic enzymes is not surprising because the larval midgut material is digested within the newly formed pupal-adult midgut. Similarity of cocoonase to trypsin has long been known, and activity of midgut enzyme(s) against sericin might be expected, but this does not indicate that the midgut enzymes participate in cocoon opening. Second, they used pharate adults ready to emerge for their experiments, with the crop fluid already present, and thus the midgut had contained some swallowed moulting fluid. This would account for several of their observations: 1) The qualitative similarity of midgut and crop enzymes (although the electrophoretic properties of the midgut and moulting fluid proteases may be primarily similar, and the electrophoretic mobility of the maxillary cocoonase is very similar to one of the bands of both crop and midgut protease zymograms — Eguchi and Iwamoto, l.c., Fig. 2). 2) The significant quantitative dissimilarity of the midgut and crop enzyme sets (the midgut would contain a mixture of self-produced and moulting fluid enzymes). 3) The antigenic similarity of these two sets which may be caused by the same moulting fluid enzyme present in both. 4) The peak of midgut protease activity shortly before emergence, and the presence of this activity almost exclusively in the midgut contents.

The effect of midgut extirpation cannot be explained so straightforwardly, but there are at least two possibilities. First, such a gross operation may significantly stress the insect and lower its vitality. Second, and perhaps more important, midgut extirpation may prevent swallowing of all the moulting fluid and thus drying of the maxillary surface, which in turn may cause washing off of some maxillary cocoonase before it can be used for cocoon opening. In our experiments this was usually the case when a portion of the pupal cuticle (which channels the moulting fluid towards the mouth) was removed.

The midgut before emergence contains a reddish-brown mass, and it would be difficult to imagine how any midgut enzymes could be sequestered in the clear colourless crop liquid (which is still clear and colourless when it is delivered to the cocoon). These enzymes would have to reach the crop against the flow of the moulting fluid being swallowed. We consider participation of any midgut-produced proteases in cocoon opening highly improbable.

REFERENCES

BERGER E., KAFATOS F.C., FELSTED R.L., LAW J.H. (1971) Cocoonase. III. Purification, preliminary characterization, and activation of the zymogen of an insect protease. J. Biol. Chem., 246, 4131-4137.

EDWARDS J.S. (1964) Diuretic function of the labial glands in adult giant silk moths, *Hyalophora cecropia*. Nature, 203, 668-669.

EGUCHI M., FURUKAWA S., IWAMOTO A. (1972) Proteolytic enzyme in the midgut of the pharate adult of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol., 17, 2457-2467.

EGUCHI M., IWAMOTO A. (1975) Role of the midgut, crop, and maxillae of *Bombyx mori* in the production of cocoon-digesting enzyme. J. Insect Physiol., 21, 1365-1372.

HONDA M. (1926) Studien über die biologischen Wirkungen des Proventrikularsaftes des Seidenraupenschmetterlings. Centralbl. Bakteriol. (Abt. II), 67, 365-369.

ITO H. (1915) On the metamorphosis of the silk glands of *Bombyx mori*. Bull. Imp. Tokyo Sericult., Coll., 1, 19-43.

KAFATOS F.C. (1968) The labial gland: A salt-secreting organ of saturniid moths. J. Exp. Biol., 48, 435-453.

KAFATOS F.C. (1976) Sequential cell polymorphism: A fundamental concept in developmental biology. Adv. Insect Physiol., 12, 1-16.

KAFATOS F.C. , TARTAKOFF A.M., LAW J.H. (1967) Cocoonase. I. Preliminary characterization of a proteolytic enzyme from silk moths. J. Biol. Chem., 242, 1477-1487.

KATZENELLENBOGEN B.S., KAFATOS F.C. (1971) Proteinases of silkmoth moulting fluid: Physical and catalytical properties. J. Insect Physiol., 17, 775-800.

MORI T. (ed.) (1970) The Silkworm: New Biological Experiment. Sanseido, Tokyo (in Japanese), 244 pp.
SELMAN K., KAFATOS F.C. (1975) Differentiation in the cocoonase producing silkmoth galea: Ultrastructural studies. Dev. Biol., 46, 132-150.

LE MECANISME DE L'OUVERTURE DU COCON CHEZ *BOMBYX MORI* (LEPIDOPTERA, BOMBYCIDAE)

P. ŠVÁCHA* & H. AKAI**

National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba, Ibaraki 305, Japon.

Le cocon de Bombyx mori s'ouvre sous l'action d'une protéase maxillaire (la coconase) dissoute dans le suc du gésier. Ce suc n'est pas produit par le gésier lui-même mais provient du liquide de mue avalé et peut ainsi contenir ses propres protéases. De plus, la coconase peut également se dissoudre dans le liquide de mue avant que celui-ci ne soit ingéré. Après réexamen critique et réinterprétation de certains travaux publiés qui suggèrent la participation d'une protéase produite par l'intestin moyen dans l'ouverture du cocon, il apparaît que cette participation est peu probable.

INTRODUCTION

Le mécanisme de l'ouverture du cocon chez les papillons sériciqènes à cocons non valvés a été étudié principalement chez le genre *Antheraea* de la famille des saturnidés (Kafatos, 1976 et autres années). Il a été observé que les machoires se métamorphosent en un organe glandulaire produisant une protéase (appelée coconase) qui est sécrétée et présente sous forme sèche sur la surface avant l'émergence. L'adulte encore à l'intérieur du cocon dissout l'enzyme dans un liquide tamponné produit par les glandes labiales métamorphosées et la solution est délivrée au cocon. L'enzyme attaque les couches de séricine de la soie, amollissant de ce fait la partie apicale du cocon par laquelle l'adulte peut ainsi s'échapper.

Le développement des maxilles et la production de coconase chez *Bombyx mori* sont des phénomènes tout à fait similaires à ceux décrits par Selman et Kafatos (1975) chez *Antheraea*, y compris l'apparition temporaire de structures flagellaires durant le développement des unités glandulaires (résultats non publiés ; voir Fig. 1). Cependant, les glandes labiales, qui servent de glandes sériciqènes au cours du développement larvaire, disparaissent totalement lors de la métamorphose (Ito, 1915 ; observation personnelle). Ceci soulève donc la question de l'origine du suc utilisé pour dissoudre l'enzyme.

MATERIELS ET METHODES

Nous avons utilisé des vers à soie issus d'élevages standard du *National Institute of Sericultural and Entomological Science* de Tsukuba. Les larves ont été élevées sur un aliment artificiel entre 24 et 28 °C. A cette température, le développement entre l'ecdysis nymphale et l'émergence de l'adulte dure environ 11 à 12 jours. Les insectes ont été disséqués au cours des trois derniers jours du stade nymphal afin de déterminer la première apparition du suc dans le gésier.

Afin de visualiser le flux du suc de mue, un petit cristal de rouge neutre est inséré dans l'espace d'ecdysis (par une petite incision dans la cuticule nymphale) près de la bouche au moment de l'ingestion du suc (pré-imagos dans les deux jours avant l'émergence). On peut distinguer, au

* Adresse actuelle : Institute of Entomology, Czech Academy of Sciences, Branišovká 31, 370 05 Ceské Budejovice, République tchèque.

** Adresse actuelle : 1030-34, Miyawada, Fujishiro-machi, Ibaraki 300-15, Japon.

microscope binoculaire, le flux du colorant dissous à travers la cuticule nymphale translucide. La coloration totale du suc est néanmoins faible car la surface cristalline est rapidement recouverte par du suc de mue coagulée.

Pour obtenir une coloration plus intense du suc ingéré, un petit morceau de cuticule nymphale (environ 2 à 4 mm^2) est prélevé au-dessus de la bouche du pré-imago et une goutte de solution saline de *Bombyx* additionnée de bleu de toluidine à 0,5-1 % est déposée au-dessus de la bouche (ce protocole est répété plusieurs fois). Après ingestion, le colorant a pu être localisé dans le canal alimentaire disséqué. Les individus non disséqués ont survécu et ont pu s'échapper de la cuticule nymphale mais n'ont généralement pas pu sortir de leur cocon.

Afin de déterminer si la contrainte ou des injections pouvaient rétablir la production du suc nécessaire à l'humidification des cocons, nous avons injecté différentes quantités d'eau distillée (jusqu'à 0,3 ml) dans des adultes âgés de 0 à 24 h et/ou les avons confinés dans les cocons ou les avons immobilisés avec une bande adhésive.

Chaque expérience a été répétée au moins 3 à 5 fois et les résultats obtenus sont cohérents et sans équivoque.

RESULTATS ET DISCUSSION

Après s'être dépouillé de sa cuticule nymphale, l'adulte de *Bombyx* émergeant (observée par une ouverture latérale percée dans le cocon) émet d'abord une large goutte de suc sur la surface apicale intérieure du cocon et baigne la totalité de la partie antérieure de sa tête, y compris les lobes maxillaires, dans le suc afin, selon toute évidence, de dissoudre la coconase maxillaire. L'enzyme est présente sous forme de cristal à la surface des lobes maxillaires. Les cristaux dissous dans un tampon phosphate à un pH proche de 8 présentent une activité enzymatique élevée lorsqu'ils sont appliqués sur des fragments de cocon et une activité importante est maintenue même si l'enzyme est dissoute dans de l'eau distillée, bien qu'un pH neutre soit probablement loin de l'optimum de l'enzyme (le pH optimum pour la coconase d'*Antheraea* est d'environ 8,3 : Kafatos et coll., 1967).

Le suc utilisé pour humidifier le cocon et dissoudre la coconase provient du gésier, comme cela a été décrit précédemment (Honda, 1926 et autres années), mais n'est pas produit par celui-ci. Le gésier, qui a la forme d'un diverticule stomodéal dorsal membraneux et de grande taille (Fig. 2) avec de fines parois transparentes et sans épithélium sécréteur, est vide jusqu'à environ 24 heures avant l'émergence puis commence à se remplir de suc de mue.

Le suc de mue est ingéré progressivement au cours des 1 à 2 derniers jours avant l'émergence de l'adulte. Si l'on insère un petit cristal de coloration (par exemple, du rouge neutre) dans le suc de mue près de la mandibule, il est possible de visualiser le flux périodique du suc dans l'ouverture des mandibules. La coloration du suc de mue indique qu'un peu de ce suc passe dans l'intestin moyen (il est possible que le volume du gésier ne soit pas suffisant pour recevoir tout le suc avalé) mais la majeure partie, et surtout les dernières portions, est stockée dans le gésier. Si, au moment de l'imbibition massive de suc par le pré-imago, on ouvre la cuticule nymphale de la région des mandibules et si l'on dépose une goutte de solution saline de *Bombyx* colorée sur la mandibule, la goutte est avalée rapidement et, après dissection, on observe la coloration dans le gésier (normalement le suc du gésier est clair et incolore). Si l'adulte est laissé en vie et confiné dans le cocon, il éclôt le jour suivant et produit le suc coloré pour ouvrir son cocon.

Un autre phénomène permet également d'étayer l'hypothèse selon laquelle le suc du gésier est d'origine étrangère et n'est pas produit par le gésier lui-même. Chez *Antheraea* (qui possède la coconase) et chez *Hyalophora* (qui n'a pas de coconase), insectes qui produisent activement le suc nécessaire à l'humidification des cocons dans les glandes labiales, il a été observé qu'une contrainte (dans le cocon ou autrement) ou des injections d'eau distillée ou de solutions salines diluées peuvent provoquer une sécrétion de suc à partir des glandes labiales même dans un laps de temps relativement long après l'émergence du papillon (plus d'un jour chez *Hyalophora* ; Edwards, 1964 ; Kafatos, 1968). Si les chrysalides de *Bombyx* sont artificiellement retirées de leur cocon de telle sorte que les papillons éclos n'aient pas à les ouvrir, le suc n'est pas sécrété mais disparaît du gésier (probablement par l'intestin moyen) en quelques heures, ce dernier étant ensuite rempli d'air. Chez le gésier vidé (soit

par sécrétion du suc pour ouvrir le cocon, soit après qu'il a disparu sans avoir été utilisé), nous n'avons pas pu provoquer une nouvelle production de fluide par contrainte et/ou injection.

Le suc du gésier lui-même (prélevé à l'aide d'une seringue dans le gésier d'un pré-imago disséqué peu avant l'émergence) est visiblement actif vis-à-vis du matériau du cocon, même si cette activité est moins forte que lorsque de la coconase supplémentaire y est dissoute, mais cela s'explique assez facilement. En premier lieu, le suc de mue peut contenir ses propres protéases (voir Katzenellenbogen et Kafatos, 1971, pour la caractérisation des protéases présentes dans le suc de mue d'*Antheraea polyphemus*). Ces protéases peuvent également contribuer à l'activation du zymogène de la coconase (voir Berger et coll., 1971). En second lieu, le suc de mue baigne, au moins partiellement, les lobes maxillaires jusqu'à peu avant l'émergence, et une partie de la coconase maxillaire peut être sécrétée avant que le suc soit totalement ingéré. Ceci pourrait expliquer la raison pour laquelle, en apparence, les fractions les plus tardives possibles du suc de mue (qui doit également contenir de grandes quantités de coconase) sont stockées dans le gésier. Dans le cas contraire, il semblerait plus logique de remplir le gésier d'abord et de laisser seulement le suc de mue superflu s'écouler dans l'intestin. Le pH modérément alcalin du suc de mue d'*Antheraea* (7,6 ; Katzenellenbogen et Kafatos, 1971) est compatible avec le fonctionnement de la coconase.

Eguchi et ses collaborateurs (Eguchi et Iwamoto, 1975 et autres années) ont énoncé l'idée que, chez *Bombyx*, certaines protéases produites par l'intestin moyen sont impliquées dans l'ouverture du cocon. Ils ont montré que l'intestin moyen contient des enzymes protéolytiques actives vis-à-vis des protéines de la soie, que l'électrophorèse sur gel d'agar révèle que ces enzymes ont la même taille que celles du suc du gésier (il est évident que l'intestin moyen et le gésier contiennent plus d'une enzyme), que l'activité protéase de l'intestin moyen culmine 1 à 2 jours avant l'émergence et l'enzyme est présente dans le contenu de l'intestin moyen et pratiquement absente des cellules de l'intestin moyen (Eguchi et coll., 1972), que les protéases de l'intestin moyen et du gésier ont apparemment des propriétés antigénétiques identiques tandis que la protéase maxillaire est différente ; que l'ablation des maxilles mais également l'extirpation de l'intestin moyen tout de suite après la nymphose diminue fortement l'activité protéase du suc d'amollissement du cocon sécrété par le papillon au moment de l'émergence ainsi que sa capacité à s'échapper du cocon. Sur la base de ces observations, Eguchi et Iwamoto (l.c.p. 1372) ont conclu : "Des protéases d'origines différentes sont impliquées dans la digestion des cocons. L'une est produite dans l'intestin moyen et l'autre dans les maxilles. Le gésier est considéré comme un réservoir et une pompe. Les protéases produites dans l'intestin moyen sont transférées dans le gésier où elles sont stockées. (...) On pense également que le gésier produit un tampon qui solubilise le dépôt partiellement cristallin de la protéase maxillaire." Cependant, ils n'ont pas pu expliquer le mécanisme de transfert des protéases de l'intestin moyen dans le gésier, et leurs conclusions ne sont pas cohérentes avec certaines de leurs données. Les différences de propriétés des protéases de l'intestin moyen et du gésier du pré-imago rendent nécessaires des hypothèses quant aux modifications possibles des enzymes de l'intestin moyen dans le gésier. La répartition des protéases de l'intestin a été interprétée ainsi : "Dans notre étude, l'activité protéase du méconium dans le sac rectal du pré-imago est nettement plus faible que celle de la protéase de l'intestin moyen pour un même animal, nous pensons donc que la majeure partie des protéases de l'intestin moyen se déplace vers l'avant." Là encore, aucun mécanisme n'a été proposé pour ce mouvement.

Nos observations n'infirment pas la possibilité qu'une protéase produite dans l'intestin moyen participe à l'ouverture du cocon. Cependant, elles permettent d'expliquer d'une autre façon les données d'Eguchi et ses collaborateurs. Premièrement, la présence d'enzymes protéolytiques dans l'intestin moyen n'est pas surprenante étant donné que la matière de l'intestin moyen larvaire est digérée dans l'intestin moyen nouvellement formé pendant le stade pupe-adulte. La ressemblance de la coconase avec la trypsine est connue depuis longtemps et l'activité de l'enzyme (des enzymes) de l'intestin moyen vis-à-vis de la séricine est prévisible, mais ceci ne prouve pas que les enzymes de l'intestin moyen participent à l'ouverture du cocon. Deuxièmement, Eguchi et coll. ont utilisé, dans leurs expériences, des pré-imagos prêts à émerger et chez lesquels le suc du gésier était déjà présent, l'intestin moyen contenait donc forcément un peu de suc de mue ingéré. Ceci expliquerait plusieurs de leurs observations : 1) la ressemblance qualitative des enzymes de l'intestin moyen et du gésier (bien que les propriétés électrophorétiques des protéases de l'intestin moyen et du suc de mue soient fondamentalement similaires et que la mobilité électrophorétique de la coconase maxillaire soit tout

à fait similaire à l'une des bandes des zymogrammes des protéases du gésier et de l'intestin moyen – Eguchi et Iwamoto, l.c., Fig. 2) ; 2) la dissemblance quantitative significative entre les lots d'enzymes issus de l'intestin moyen et ceux issus du gésier (l'intestin moyen contiendrait un mélange d'enzymes auto-produites et issues du suc de mue) ; 3) la similitude antigénique de ces deux lots qui pourrait être causée par la même enzyme de suc de mue présente chez les deux organes ; 4) le pic d'activité protéase dans l'intestin moyen peu avant l'émergence et la présence de cette activité presque exclusivement dans les contenus de l'intestin moyen.

Il n'est pas possible d'expliquer aussi simplement l'effet de l'extirpation de l'intestin moyen, mais nous disposons d'au moins deux possibilités. Premièrement, une opération aussi grave peut provoquer un stress significatif chez l'insecte et altérer sa vitalité. La deuxième possibilité, qui est également peut-être plus importante, est que l'extirpation de l'intestin moyen pourrait inhiber l'ingestion de la totalité du suc de mue et donc le séchage de la surface maxillaire et, par suite, provoquer une élimination d'une partie de la coconase maxillaire avant qu'elle puisse être utilisée pour ouvrir le cocon. Ceci a souvent été le cas dans nos expériences lorsque nous avons ôté une partie de la cuticule nymphale (qui canalise le suc de mue vers la mandibule).

Avant l'émergence, l'intestin moyen contient une masse marron rougeâtre et il serait difficile d'imaginer combien d'enzymes intestinales peuvent être maintenues dans le suc du gésier incolore (qui reste incolore lorsqu'il est sécrété sur le cocon). Il faudrait que ces enzymes puissent atteindre le gésier à contre-courant du suc de mue en cours d'ingestion. Nous considérons donc que la participation de toute protéase produite par l'intestin moyen dans l'ouverture du cocon est fortement improbable.

FLUORIDE LOADING AND KINETICS IN DIFFERENT TISSUES OF LARVAE OF FLUOROSIS-AFFECTED SILKWORMS (*BOMBYX MORI* L.)

CHEN Y.-Y. & WU Y.-C.

Sericultural Department, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029, P.R. China.

*The relative fluoride loading and kinetics of different body parts were studied in the larvae of two silkworm (**Bombyx mori**) varieties, i.e. Zhenong 1 and Hang 8, by artificially adding NaF in mulberry leaves at the time of feeding, to investigate the mechanism of fluoride-resistance in silkworm larvae. Significant exponential correlations were observed between fluoride contents of the blood, integument, fat body, midgut tissue, Malpighian tubules and feces with that of the mulberry leaves on which they were fed. Comparison of the fluoride contents of mulberry leaves and feces showed that the larvae of the high fluoride-resistant variety, Zhenong 1, can tolerate higher fluoride contents and excrete most of the ingested fluoride. On the other hand, larvae of Hang 8 were very sensitive to fluoride and excreted less ingested fluoride. The fluoride concentrations observed in the fat body and integument were less than that of fed mulberry leaves, but the fluoride concentration was much higher in the midgut tissue and Malpighian tubules which were considered to be the important organs of fluoride attack.*

Keywords: Silkworm larvae, fluoride loading, blood, fat body, integument, midgut tissues, Malpighian tubules.

INTRODUCTION

The mulberry silkworm, *Bombyx mori* L., is a very important economic insect which contributes substantially to the national economy of China. During recent years, atmospheric fluoride pollution resulting from extensively scattered rural industries and coal burning has caused serious economic losses in the main sericultural production regions of China. Chen (1993) has reported that fluoride-polluted mulberry leaves can alter fecundity, growth rates and mortality, and decrease cocoon yield in silkworms. It is also well known that the silkworm is very sensitive to fluoride. Even a slightly elevated fluoride level present in the atmosphere, thought not to be harmful to plants and human beings, will cause serious damage to cocoon production. With the development of Chinese industrialization, the rural industry will increase significantly in the coming years. Therefore, it is imperative to study the toxicology of fluoride in silkworms.

The effects of fluoride on plants and animals are well known. However, little is known about many aspects of fluoride effects on insects. Some works have dealt with the routes and transfer of fluoride from the air to plants to insects. All of these studies have focused on the fluoride uptake and accumulation by insects near pollution sources (Dewey, 1973; Mayer *et al.*, 1988). Field sampling of a wide range of species has invariably shown that, near sources of fluoride pollution, individual invertebrates have greatly elevated fluoride levels and that there is also a great variation in loadings between individuals of the same species (Buse, 1986). The routes of transfer of fluorides to pine sawfly larvae near an aluminum smelter plant and the relative fluoride loading of larvae, feces and exuviae, were studied by Davies *et al.* (1992). The fluoride loading in different parts of the body in farm animals, wild animals, fish and birds has been recorded, indicating that there are great differences in

fluoride loadings in different body parts (Andrews *et al.*, 1982; Bourbon *et al.*, 1984; Gikunju, 1992; Kay, 1975; Kenneth and Sally, 1988; Kessabi, 1988; Morris and Smith, 1982; Seel and Thomson, 1984; Walton, 1984, 1986, 1987). But there has never been an attempt to investigate the partitioning of the fluoride loads between different parts of insect body. This is due to the variances of fluoride loads and the small body size of insects. The variances of fluoride loads and small body size of insects have made this kind of study difficult. It is known that the toxicity of fluoride varies in different parts of an insect body. Therefore, in order to interpret the relative effects of different body tissues to fluoride toxicity, it is necessary to know the fluoride loadings in the different organs of silkworm larvae.

The present investigation is part of a study of fluoride toxicity in silkworm larvae to determine how fluoride attacks the key organs of silkworm larvae.

MATERIALS AND METHODS

The mulberry leaves utilized in this investigation were collected from the experimental mulberry garden of the Department of Sericulture, Zhejiang Agricultural University. The fresh leaves were soaked with 0, 30, 60, 120, 240, 480, 960 mg kg^{-1} NaF solutions for ten minutes, respectively, and then the treated leaves were dried at room temperature. As the leaves grown in the field have gradually accumulated atmospheric fluoride, their fluorine ion concentration varies with a variety of factors such as the age of leaf, atmospheric fluoride contents, etc. The fluoride concentrations of experimental leaves, including the control group and NaF-treated groups, were determined before feeding. There was an intimate linear relationship between the fluoride content in mulberry leaves and the NaF concentration in the solutions used for soaking, $r = 0.9912$, $p < 0.01$. The corresponding actual fluorine ion concentrations of the mulberry leaves were 38.8, 67.3, 104.3, 255.8, 390.6, 603.3, 1135.3 mg kg^{-1}.

Two silkworm varieties, namely Zhenong 1 (Chinese bivoltine) and Hang 8 (Japanese bivoltine), were used. For the present study, three replications of 100 fifth instar larvae of each variety were used. Fifth instar larvae were fed with mulberry leaves soaked in different NaF solutions from the first feeding for a period of 48 hours. The effects of fluoride on larval growth, development and mortality were recorded. The feces were collected at intervals of 24, 48 and 96 hours. Then larvae were sampled from each of the three replications, respectively, for tissue dissection at intervals of 24, 48 and 96 hours. After the larval blood was collected, the integument, midgut tissue, Malpighian tubules and fat body were vivisected separately. The tissues were dried for 24 hours at 80 °C.

Fluoride analysis of silkworm tissues and mulberry leaves was carried out using a fluoride specific ion electrode (Wu, 1982). A 0.2 g dried sample of each specimen was extracted in 25 ml of 0.1 N $HClO_4$ for half an hour using a magnetic stirrer.

RESULTS AND DISCUSSION

Fluoride loading and kinetics of blood in silkworm larvae:

The relationship between blood fluoride content of silkworm larvae and the level of fluoride in mulberry leaves is indicated in Figure 1. The mean fluoride concentration in the blood of larvae fed on untreated leaves was 6.88 mgl^{-1}, and ranged from 4.20 to 9.23 mgl^{-1}. After treatment with fluoride, the fluoride concentrations in the blood of larvae at 24, 48 and 96 hours increased as the fluoride concentration in the leaves increased. There was a significant correlation between fluoride concentration in the blood of larvae (y_b) and that in mulberry leaves (x). The regression equations are as follows.

A. Zhenong 1 variety:

24 hr, $y_b = 10.8414e^{6.5416x}$, $r = 0.8829$ $p < 0.01$

48 hr, $y_b = 8.6765e^{8.2415x}$, $r = 0.8440$ $p < 0.05$

96 hr, $y_b = 5.7178e^{7.3795x}$, $r = 0.8551$ $p < 0.05$

B. Hang 8 variety:

24 hr, $y_b = 8.8995e^{7.1486x}$, $r = 0.9715$ $p < 0.01$

48 hr, $y_b = 8.0276e^{7.8823x}$, $r = 0.8971$ $p < 0.01$

96 hr, $y_b = 4.9452e^{7.2433x}$, $r = 0.8895$ $p < 0.01$

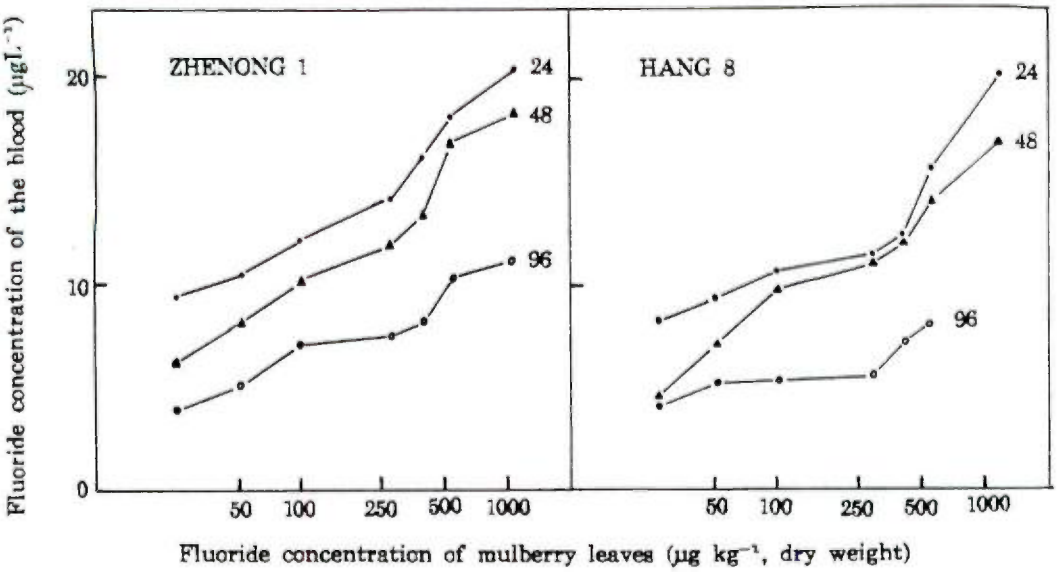

Fig. 1: Fluoride of the blood sampled at intervals of 24 hr, 48 hr and 96 hr from *Bombyx mori* larvae fed on mulberry leaves supplemented with NaF.

Fig. 1 : Taux de fluor dans le sang prélevé à intervalles de 24 h, 48 h et 96 h sur des larves de* Bombyx mori *nourries avec des feuilles de mûrier additionnées de NaF.

When the fluoride-treated larvae were subsequently fed on untreated mulberry leaves for 48 hours, fluoride concentrations in the blood decreased significantly. However, the fluoride concentration in the blood of larvae fed with fluoride remained higher than that of the control group, due to the residual effect of fluoride. Results in Figure 1 show that there was a difference between silkworm varieties in the accumulation of fluoride with higher levels of fluoride. The fluoride-resistant variety, Zhenong 1, had a higher fluoride concentration than the low fluoride-resistant variety, Hang 8. This may be caused mainly by the difference of feeding habits. Zhenong 1 is a summer-autumn rearing variety which eats voraciously and has a good appetite and short duration of the fifth instar. Hang 8 is a spring rearing variety which eats slowly and has a long duration of the fifth instar. Another important factor is their difference of fluoride-tolerance. Due to their higher fluoride-tolerance, the larvae of Zhenong 1 still ate fluoride-treated mulberry leaves when high fluoride concentrations had been administered for 48 hours, although they had lost their appetite greatly. But the larvae of Hang 8, which is sensitive to fluoride, lost appetite completely when high fluoride concentration was administered for less than 36 hours. Therefore, within 48 hours feeding of fluoride-treated mulberry leaves, the larvae of Zhenong 1 had eaten more mulberry leaves and thus consumed more fluoride. The mean weight of leaves consumed per larva within 48 hours of fluoride administration is shown in Table I. It was found that in group I the amount of fresh mulberry leaves ingested was 3.13 ± 0.11 g and 2.17 ± 0.29 g by Zhenong 1 and Hang 8, respectively, and the fluoride amount was 48.24 ± 2.68 μg and 33.40 ± 3.50 μg, respectively. In group VI, the fresh mulberry leaf weight ingested was

1.31 ± 0.34 g and 0.77 ± 0.20 g, respectively, and the fluoride amount was 357.62 ± 56.76 μg and 193.31 ± 40.86 μg, respectively. Furthermore, in Fig. 1, it was also shown that the fluorine ion concentration in the blood of larvae from Zhenong 1 was lower than that of larvae from Hang 8 after fluoride administration had been stopped for 48 hours (that is the blood sample collected in 96 hours). These findings led the authors to a conclusion that the character of Zhenong 1 with higher fluoride-resistance had higher fluoride-tolerance and greater ability to excrete fluoride.

Table I. Ingested amount of fresh mulberry leaves and fluoride within 48 hours of fluoride administration.

Tableau I. Quantités de feuilles de mûrier et de fluor ingérées après administration de fluorure pendant 48 heures.

Groups *Groupes*	Control *Témoins*	I	II	III	IV	V	VI
Zhenong 1							
FML (g)	3.13 ± 0.09	3.13 ± 0.11	3.01 ± 0.26	2.18 ± 0.28	1.60 ± 0.21	1.40 ± 0.24	0.31 ± 0.34
FA (μg)	29.15 ± 1.24	48.24 ± 2.68	71.67 ± 5.21	83.31 ± 9.75	148.25 ± 14.9	202.32 ± 30.18	357.62 ± 56.76
Hang 8							
FML (g)	2.29 ± 0.28	2.17 ± 0.29	1.84 ± 0.26	1.23 ± 0.31	1.08 ± 0.35	0.87 ± 0.22	0.77 ± 0.20
FA (μg)	21.31 ± 1.54	33.40 ± 3.40	38.10 ± 3.61	75.17 ± 6.47	101.44 ± 13.5	125.47 ± 24.74	193.33 ± 40.86

FML: Fresh mulberry leaves / *Feuilles de mûrier fraîches.*
FA: Fluoride amount / *Quantité de fluorure.*

Fluoride loading and kinetics of integument, midgut tissues, Malpighian tubules and fat body in silkworm larvae:

The fluoride loading of integument, midgut tissues, Malpighian tubules and fat body of silkworm larvae is shown in Figures 2-5. These results indicate that the fluoride loadings in all these larval organs showed increasing fluoride accumulation as the fluoride concentration in food increased. There were significant exponential correlations between fluoride concentrations in these organs and in the mulberry leaves (Table II). The sequence of increasing fluoride accumulation is, Malpighian tubules > midgut tissues > fat body > integument. The fluoride concentration in the midgut, which is a digestive organ, is higher than that in mulberry leaves, and the fluoride concentration in Malpighian tubules is much higher than that in mulberry leaves. The fluoride concentrations in the integument and fat body are lower than that in digested mulberry leaves. It was concluded that Malpighian tubules and midgut are the important fluoride accumulation organs. The relatively high fluoride concentration in the midgut tissue and Malpighian tubules in the control group suggests that these organs tend to accumulate fluoride in silkworm metabolism. Figures 2-5 indicate that:

(i) There was a similar tendency of the fluorine ion concentration in the fat body, integument and midgut tissues. It increased as the fluoride concentration in the mulberry leaves increased.

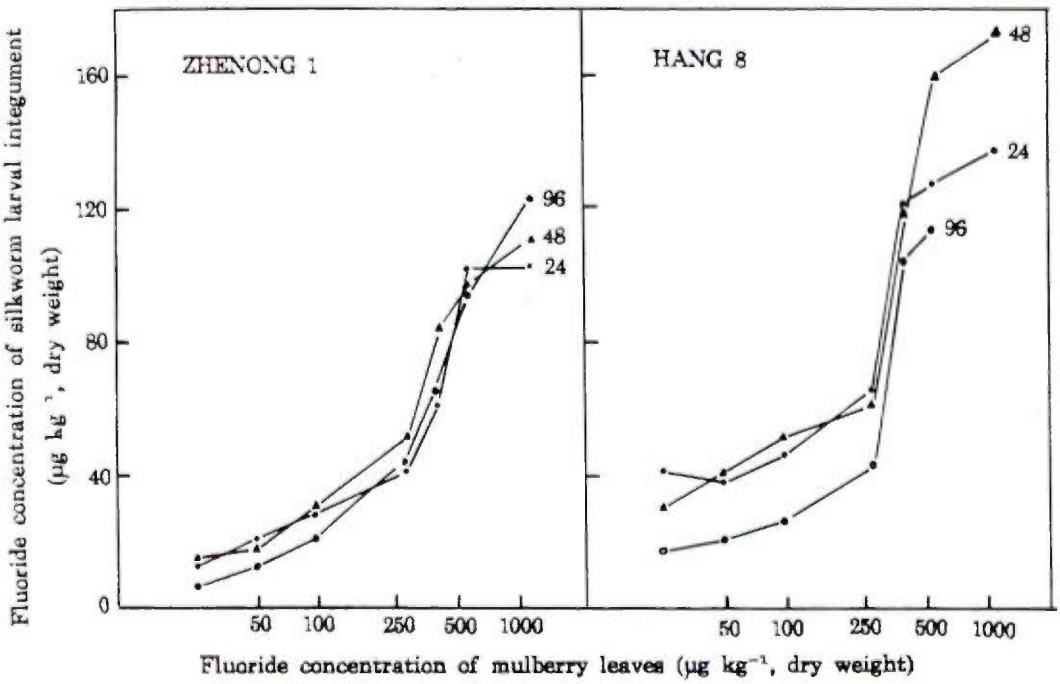

Fig. 2: Fluoride loading and kinetics in the integument of *Bombyx mori* larvae.
***Fig. 2 : Teneur et cinétique du fluor dans le tégument des larves de* Bombyx mori.**

(ii) There was no significant difference in the fluorine ion concentration of these three organs at the intervals of 24, 48 and 96 hours, only a slightly higher fluorine ion concentration at 48 hours when a very high fluoride concentration was administered. It appeared that the accumulation of fluorine ion in these organs of the larvae was affected by the fluoride concentration fed but not accelerated by the feeding times of fluoride-treated leaves. Moreover, the accumulation of fluoride in these organs did not decrease after the larvae had been fed normal leaves for 24 hours. At higher levels of dietary fluoride it increased slightly.

(iii) The fluorine ion concentration in the Malpighian tubules increased with increased feeding time of fluoride-treated mulberry leaves, indicating a successive accumulation of fluoride due to the digestion of the leaves and absorption of fluoride. The Malpighian tubules are an important excretory organ of silkworm larvae, their main function is the separation and excretion of metabolism waste from the blood. Therefore, it is understandable that fluorine ion concentration in the Malpighian tubules is sequenced in the intervals of 96 hours > 48 hours > 24 hours for the Malpighian tubules continue to absorb excess fluoride from the blood.

(iv) A significant difference was observed in the fluoride concentrations of these organs between silkworm varieties, Zhenong 1 and Hang 8. Previous work has shown that Zhenong 1 is ten times more resistant to fluoride than Hang 8. In this experiment, it was found that fluoride accumulated more

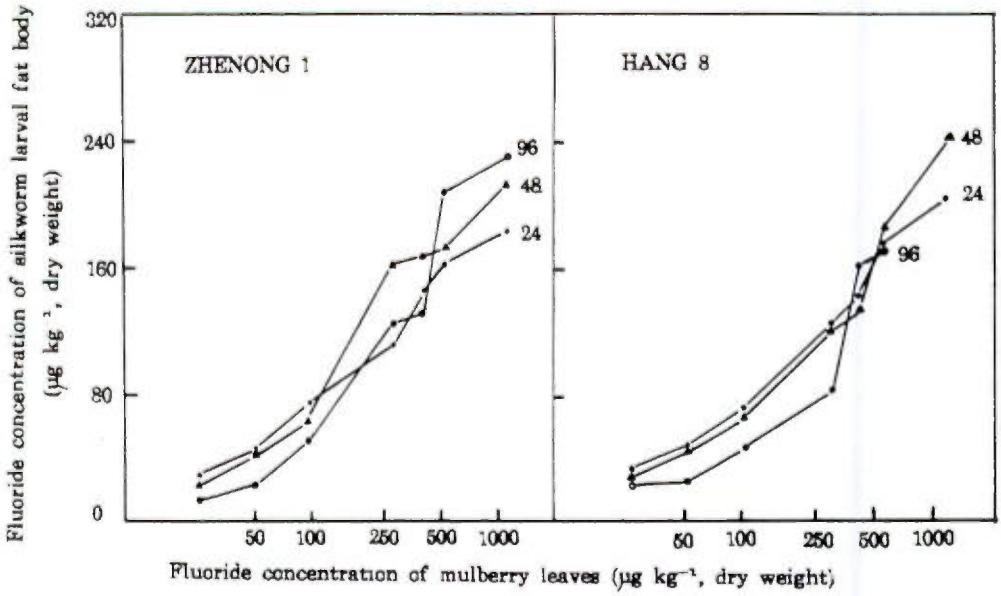

Fig. 3: Fluoride loading and kinetics in the fat body of *Bombyx mori* larvae.
Fig. 3 : Teneur et cinétique du fluor dans le corps adipeux des larves de Bombyx mori.

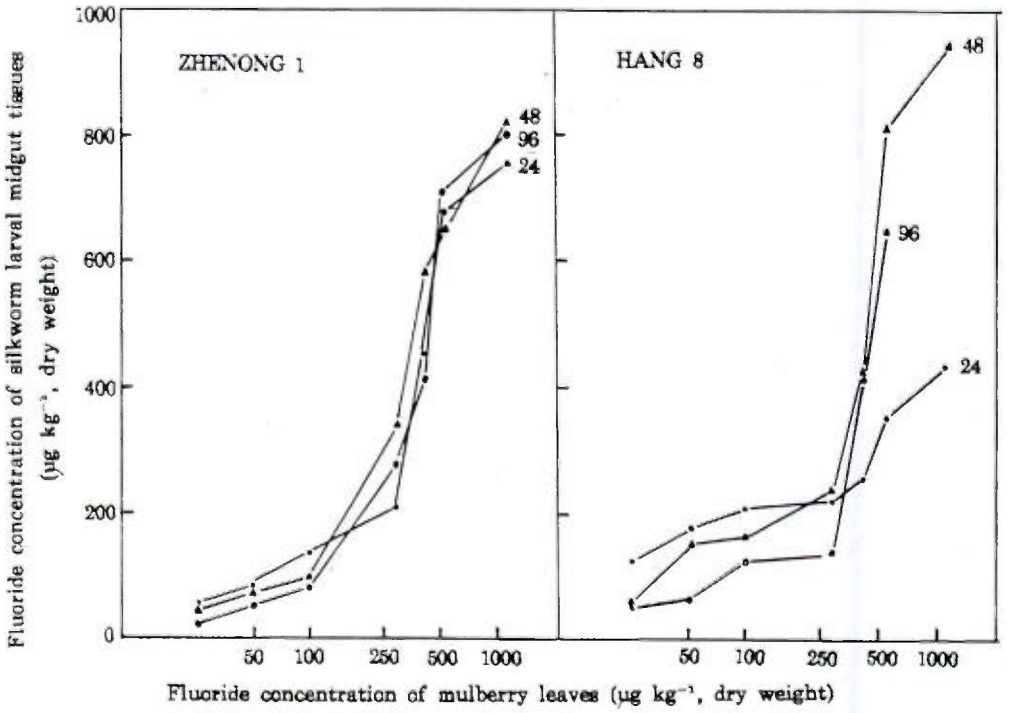

Fig. 4: Fluoride loading and kinetics in midgut tissues of *Bombyx mori* larvae.
Fig. 4 : Teneur et cinétique du fluor dans les tissus de l'intestin moyen des larves de Bombyx mori.

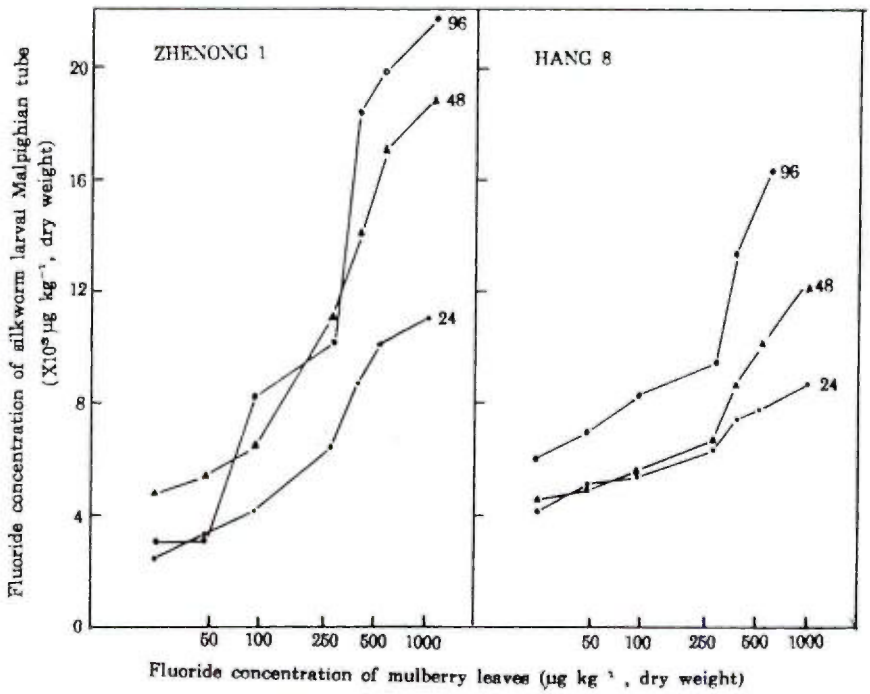

Fig. 5: Fluoride loading and kinetics in the Malpighian tubules of *Bombyx mori* larvae.
***Fig. 5 : Teneur et cinétique du fluor dans les tubes malpighiens des larves de* Bombyx mori.**

in the three organs of fat body, midgut tissues and integument of the low fluoride-resistant variety, Hang 8, than in those of the high fluoride-resistant variety, Zhenong 1, especially obvious in the low fluoride administration groups I, II and III and at the interval of 48 hours. However, for Malpighian tubules, the opposite result was obtained, the high fluoride-resistant variety, Zhenong 1, had accumulated much more fluoride than the low fluoride-resistant variety, Hang 8. This suggests that the fluoride ingested from mulberry leaves was accumulated less and excreted more in the higher fluoride-resistant variety, Zhenong 1, than in the low fluoride-resistant variety, Hang 8. In Figures 2-4, the results for 96 hours in group VII were not listed because all of the larvae of this group had died by that time.

Fluoride concentration and kinetics of feces from silkworm larvae:

Fluoride concentration in the feces (y_f) was exponentially related to that of the mulberry leaves (Fig. 6). The regression equations were as follows.

A. Zhenong 1 variety:
sampled at 24 hours, $y_f = 95.0072e^{1.9955x}$
$r = 0.9107$ $p < 0.01$

sampled at 48 hours, $y_f = 115.6006e^{2.2533x}$
$r = 0.9107$ $p < 0.01$

B. Hang 8 variety:
sampled at 24 hours, $y_f = 31.3987e^{2.5756x}$
$r = 0.9235$ $p < 0.01$

sampled at 48 hours, $y_f = 8.9222e^{2.1211x}$
$r = 0.8325$ $p < 0.01$

Table II. Regression equation of fluoride in silkworm tissue (y) on that in mulberry leaves (x).

Tableau II. Equation de régression du taux de fluorure dans le tissu du ver à soie (y) sur celui des feuilles de mûrier (x).

Tissue *Tissu*	Variety *Variété*	Sampled time *Heure d'échantillonnage*	Regression equation $y = Ae^{Bx}$ *Equation de régression* $y = Ae^{Bx}$	Correlation coefficient (r) *Coefficient de corrélation (r)*
Integument *Tégument*	Zhenong 1	24	$y = 22.3512e^{1.7075x}$	0.8759, $p < 0.01$
		48	$y = 22.1791e^{1.6616x}$	0.8546, $p < 0.05$
		96	$y = 14.7870e^{2.3718x}$	0.8668, $p < 0.05$
	Hang 8	24	$y = 46.2144e^{1.2401x}$	0.8607, $p < 0.05$
		48	$y = 42.0993e^{1.5609x}$	0.8872, $p < 0.01$
		96	$y = 18.4789e^{3.3847x}$	0.9584, $p < 0.01$
Midgut tissue *Tissu de l'intestin moyen*	Zhenong 1	24	$y = 104.3448e^{2.2080x}$	0.8766, $p < 0.01$
		48	$y = 113.7780e^{2.2350x}$	0.8523, $p < 0.05$
		96	$y = 70.1793e^{2.7732x}$	0.8529, $p < 0.01$
	Hang 8	24	$y = 171.7492e^{9.3082x}$	0.9451, $p < 0.01$
		48	$y = 133.5046e^{2.1084x}$	0.9001, $p < 0.01$
		96	$y = 70.6522e^{3.8342x}$	0.9539, $p < 0.01$
Fat body *Corps adipeux*	Zhenong 1	24	$y = 54.5911e^{1.3559x}$	0.7789, $p < 0.05$
		48	$y = 52.0178e^{1.6670x}$	0.8051, $p < 0.05$
		96	$y = 31.2909e^{2.4897x}$	0.8336, $p < 0.05$
	Hang 8	24	$y = 50.1691e^{1.4967x}$	0.7774, $p < 0.05$
		48	$y = 48.0190e^{2.1166x}$	0.9452, $p < 0.01$
		96	$y = 30.5956e^{2.8914x}$	0.9741, $p < 0.01$
Malpighian tubule *Tube malpighien*	Zhenong 1	24	$y = 3814.2579e^{1.2108x}$	0.8516, $p < 0.05$
		48	$y = 6542.6822e^{1.2055x}$	0.8655, $p < 0.05$
		96	$y = 4937.5653e^{1.7258x}$	0.8061, $p < 0.05$
	Hang 8	24	$y = 5182.1352e^{5.3609x}$	0.8842, $p < 0.01$
		48	$y = 5336.2812e^{8.5332x}$	0.9333, $p < 0.01$
		96	$y = 6496.0100e^{1.6031x}$	0.9964, $p < 0.01$

From Figure 6, we can see that the fluorine ion concentration in feces of each group was decreased greatly after the fluoride-treated larvae had been fed on untreated mulberry leaves for 48 hours (line 96 hr), but still the fluorine ion concentration was sequentially increased from the control to group VI in a gentle slope because of the residual effect of fluoride on silkworm larvae. It was also found that the fluoride excretion in feces was greater from the larvae of Zhenong 1 than that from the larvae of Hang 8, and is especially obvious in the high fluoride administration groups.

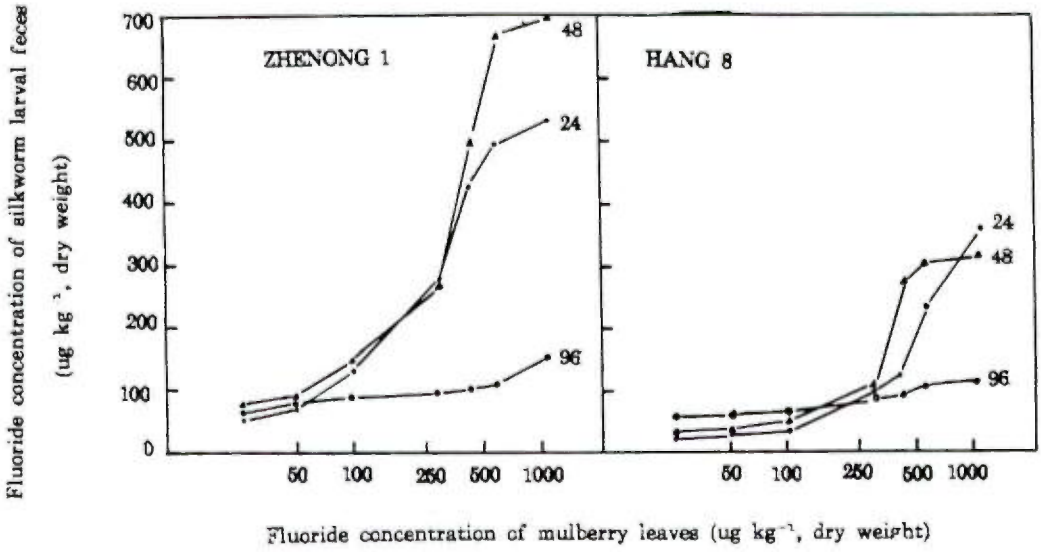

Fig. 6: Fluoride excretion in feces from *Bombyx mori* larvae fed on fluoride- treated mulberry leaves.

Fig. 6 : Excrétion de fluor dans les matières fécales des larves de* Bombyx mori *nourries avec des feuilles de mûrier traitées au fluor.

Based on all the above findings, the authors came to the conclusion that the character of fluoride-resistance of a silkworm variety consists of at least two factors: amount of fluorine ion that can be tolerable and the capability of fluoride discharge. These are the final expressions of biochemical and physiological processes connecting the intrinsic traits of a certain silkworm variety. Silkworm varieties with the trait of high fluoride-resistance can tolerate higher fluorine ion concentrations in the blood absorbed by the midgut cells, and the midgut cells will retain their functions of digestion and absorption even with very high fluoride consumption, meanwhile the Malpighian tubules were able to remove most of the fluorine ions from the blood. On the contrary, silkworm varieties that are sensitive to fluoride can tolerate very low fluorine ion concentrations, the tissue cells are sensitive to fluoride damage, and the Malpighian tubules are unable to discharge the fluoride.

It is known that the total fluoride burden in a whole insect body consists of three major fractions, that fluoride still present in food residues in the digestive tract, that absorbed by the tissues through the gut and that deposited by wet and dry deposition on the outer surfaces. The amount of fluoride retained as a result of wet and dry deposition on the insect surface in laboratory is small in absolute terms and trivial in comparison with that of ingested food, so that the accumulated fluoride in silkworm larvae came primarily from food. The fluoride in an insect body can be fractionated into two principal parts: undigested fluoride in the gut contents that are excreted as feces and fluoride absorbed by the digestive system and retained in tissues. The digestibility of the mulberry leaves was estimated as 40% (Xu, 1983). This means that about 0.6 g of feces were produced from 1 g of mulberry leaves ingested. If fluoride had the same percentage of absorption as the digestibility of the mulberry leaves, then there would be no difference in fluoride concentration between the leaves and the feces. The increase in fluoride concentration in the feces which occurred in Zhenong 1 could only arise if the absorption of fluoride was lower than the digestibility of leaves and the high capacity of fluoride discharge by Malpighian tubes. The low fluoride-resistant variety, Hang 8, had a lower fluoride concentration in feces, indicating that fluoride absorption was higher. The percentage of fluoride

absorbed can be calculated from the digestibility of the leaves, and the concentration of fluoride in the leaves and feces:

$$[F] \text{ absorbed} = \frac{[F] \text{ in leaves} - (0.6 \times [F] \text{ in feces})}{[F] \text{ in leaves}} \times 100$$

This supports that most of the fluoride ingested was excreted with feces when the fluoride concentration was not too high and the high fluoride-resistant variety excreted more fluoride than the low fluoride-resistant variety. This is in agreement with Hughes *et al.* (1985) in *Trichoplusia ni*.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the International Foundation for Science for funding this research.

REFERENCES

ANDREWS S.M., COOKE J.A., JOHNSSON M.S. (1982) Fluoride in small mammals and their potential sources in contaminated grasslands. Fluoride, 15, 63-65.
BUSE A. (1986) Fluoride accumulation in invertebrates near an aluminium reduction plant in Wales. Environmental Pollution (Series A), 41, 199-217.
BOURBON P., RIOUFOL L., LEVY P. (1984) Relationships between blood, urine and bone F levels in Guinea pig after short exposures to HF. Fluoride, 17, 124-131.
CHEN Y.-Y. (1993) Toxicology of fluoride to silkworm and its control, a review. Agricultural Information Research, 2, 36-39.
DAVIES I., DAVISON A.W., PORT G.R. (1992) Fluoride loading of larvae of pine sawfly from a polluted site. J. Applied Ecology, 29, 63-69.
DEWEY J.E. (1973) Accumulation of fluorides by insects near an emission source in Western Montana. Environmental Entomol., 2, 179-182.
GIKUNJU J.K. (1992) Fluoride concentration in Tilapia fish (*Oreochromis leucosticus*) from Lake Nalvasha, Kenya. Fluoride, 25, 37-43.
HUGHES P.R., WEINSTEIN L.H., JOHNSON L.M., BRAUN A.R. (1985) Fluoride transfer in the environment, accumulation and effect on cabbage looper, *Trichoplusia ni*, of fluoride from water soluble salts and HF-fumigated leaves. Environmental Pollution (Series A), 37, 175-192.
KAY C.E. (1975) Fluoride distribution in different segments of male deer. Fluoride, 8, 92-97.
KENNETH C.W., SALLY A. (1988) Fluoride in mandibles and antlers of red deer from different areas of England and Scotland. Environmental Pollution (Series A), 54, 17-27.
KESSABI M. (1988) Experimental fluoride in sheep: fluoride kinetics and alleviating effects of aluminum sulfate. Fluoride, 24, 193-200.
MAYER D.F., LUNDEN J.D., WEINSTEIN L.H. (1988) Evaluation of fluoride levels and effects on honey bees. Fluoride, 21, 113-120.
MORRIS J.B., SMITH F.A. (1982) Regional deposition and absorption of inhaled hydrogen fluoride in the rat. Toxicol. Appl. Pharmacol., 62, 82-89.
SEEL D.C., THOMSON A.G. (1984) Bone fluoride in predatory birds in the British Isles. Environmental Pollution (Series A), 36, 367-374.
WALTON K.C. (1984) Fluoride in fox bone near an aluminum reduction plant in Anglesey, Wales and elsewhere in the United Kingdom. Environmental Pollution (Series B), 7, 237-280.
WALTON K.C. (1986) Fluoride in moles, shrews and earthworms near an aluminum reduction plant. Environmental Pollution (Series A), 32, 361-371.
WALTON K.C. (1987) Fluoride in bones of small rodents living in areas with different pollution levels. Water, Air, Soil Pollut., 42, 113-122.
WU F.-Z. (1982) A simple method to measure the micro fluoride in the mulberry leaves. Sericultural Bulletin, 8(4), 30-32.
XU J.-L. (1983) Anatomy and Physiology of Silkworm (*Bombyx mori*). Beijing, Agricultural Press.

TENEUR ET CINETIQUE DU FLUORURE DANS DIFFERENTS TISSUS DE LARVES DE VERS A SOIE AFFECTEES PAR LA FLUOROSE

CHEN Y.-Y. & WU Y.-C.

Sericultural Department, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029, R.P. Chine.

La teneur et la cinétique du fluorure dans différentes parties du corps ont été étudiées chez les larves de deux variétés de vers à soie ***Bombyx mori*** *(Zhenong 1 et Hang 8) par addition artificielle de NaF dans les feuilles de mûrier au moment du nourrissage afin d'élucider le mécanisme de la résistance au fluorure chez les larves de vers à soie. On observe des corrélations exponentielles significatives entre les contenus en fluorure du sang, du tégument, du corps adipeux, du tissu de l'intestin moyen, des tubes malpighiens et des matières fécales et celui des feuilles de mûrier avec lesquelles les larves ont été nourries. La comparaison entre le contenu en fluorure des feuilles de mûrier et celui des matières fécales révèle que les larves de la variété fortement résistante Zhenong 1 peuvent supporter des contenus en fluorure élevés et excréter la majeure partie du fluorure ingéré. Les larves de Hang 8 sont très sensibles au fluorure et excrètent moins de fluorure ingéré. Les concentrations en fluorure observées dans le corps adipeux et dans le tégument sont inférieures à celles des feuilles de mûrier données en nourriture, mais la concentration en fluorure est nettement plus élevée dans l'intestin moyen et dans les tubes malpighiens, qui sont considérés comme étant les principaux organes cibles du fluorure.*

INTRODUCTION

Le ver à soie du mûrier *Bombyx mori* L. est un insecte très important sur le plan économique car il contribue de manière considérable à l'économie chinoise. Au cours de ces dernières années, la pollution de l'atmosphère par les fluorures, provoquée par l'extension massive des industries rurales et la combustion du charbon, a entraîné des pertes économiques importantes dans les principales régions de production séricicole en Chine. Chen (1993) a observé que le nourrissage avec les feuilles de mûrier polluées par les fluorures peut altérer la fécondité, les taux de croissance et de mortalité et provoquer une diminution du rendement en soie chez le ver à soie. Il est également bien connu que le ver à soie est très sensible au fluorure. Une augmentation, même infime, de la quantité du fluorure présent dans l'atmosphère, considérée comme inoffensive pour les végétaux et les humains, occasionnera des dommages importants dans la production de cocons. Avec le développement de l'industrialisation en Chine, l'industrie rurale est appelée à augmenter de manière significative dans les années à venir. Il est donc impératif d'étudier la toxicologie du fluorure chez les vers à soie.

Les effets du fluorure sur les végétaux et les animaux sont bien connus. Cependant, on sait peu de choses des différents aspects des effets du fluorure sur les insectes. Certains travaux se sont intéressés aux itinéraires et au transfert du fluorure de l'air vers les plantes et des plantes vers les insectes. Toutes ces études se sont focalisées sur l'ingestion et l'accumulation de fluorure par les insectes près des sources de pollution (Dewey, 1973 ; Mayer et coll., 1988). Les prélèvements sur le terrain d'un grand nombre d'espèces montrent invariablement que, près des sources de pollution au fluorure, les invertébrés présentent des teneurs très élevées en fluorure et qu'il y a également une variation importante des teneurs entre individus d'une même espèce (Buse, 1986). Les itinéraires de

transfert des fluorures chez les larves de lophyre du pin près de fours à fusion d'aluminium et la teneur relative en fluorure dans les larves, les matières fécales et les téguments ont été étudiés par Davies et coll. (1992). La teneur de fluorure relevée pour différentes parties du corps chez les animaux domestiques, les animaux sauvages, les poissons et les oiseaux indique que la teneur en fluorure varie fortement en fonction de l'organe (Andrews et coll., 1982 ; Bourbon et coll., 1984 ; Gikinju, 1992 ; Kay, 1975 ; Kenneth et Sally, 1988 ; Kessaby, 1988 ; Morris et Smith, 1982 ; Seel et Thomson, 1984 ; Walton, 1984, 1986, 1987). Cependant, aucune étude n'a été réalisée sur la répartition du fluorure dans les différents organes de l'insecte. Les variations de la teneur en fluorure et la petite taille des insectes rendent ce type d'étude difficile. On sait que la toxicité du fluorure varie entre les différentes parties du corps de l'insecte. Aussi, pour interpréter les effets relatifs de la toxicité du fluorure sur différents tissus, est-il nécessaire de déterminer les taux de fluorure dans différents organes larvaires du ver à soie.

Les travaux présentés ici s'inscrivent dans le cadre d'une étude sur la toxicité du fluorure chez les larves de vers à soie visant à élucider le mécanisme par lequel le fluorure attaque leurs organes clés.

MATERIELS ET METHODES

Les feuilles de mûrier utilisées dans cette étude proviennent de la plantation expérimentale de mûrier du Département de sériciculture de l'Université agricole de Zhejiang. Ces feuilles ont été trempées respectivement dans des solutions de NaF à 0, 30, 60, 120, 240, 480 et 960 mg/kg pendant dix minutes puis séchées à température ambiante. Les feuilles provenant de la plantation ayant accumulé progressivement le fluorure contenu dans l'atmosphère, leur concentration en ions fluor est fonction d'un grand nombre de facteurs comme l'âge de la feuille, les teneurs en fluorure de l'atmosphère, etc. Les concentrations en fluorure des feuilles expérimentales, c'est-à-dire des feuilles témoins et des feuilles traitées au NaF, ont été déterminées avant le nourrissage. Il existe une relation linéaire étroite entre le contenu en fluorure des feuilles de mûrier et la teneur en fluorure des solutions utilisées pour le trempage, $r = 0.9912$, $p < 0.01$. Les concentrations réelles en ions fluor respectives des feuilles de mûrier sont : 38,8, 67,3, 104,3, 255,8, 390,6, 603,3, 1135,3 mg/kg.

Les deux variétés de vers à soie Zhenong 1 (bivoltin chinois) et Hang 8 (bivoltin japonais) ont été utilisées, avec trois réplicats de 100 larves du cinquième âge pour chaque variété. Les larves du cinquième âge ont été nourries avec des feuilles de mûrier imbibées de différentes concentrations de NaF à partir du premier nourrissage pendant 48 heures. Les effets du fluorure sur la croissance, le développement et la mortalité des larves ont été relevés. Les matières fécales ont été prélevées à intervalles de 24, 48 et 96 heures. Des larves ont ensuite été prélevées dans chacun des trois réplicats pour la dissection des tissus à intervalles de 24, 48 et 96 heures. Une fois le sang larvaire collecté, le tégument, le tissu de l'intestin moyen, les tubes malpighiens et le corps adipeux ont été disséqués séparément. Les tissus ont été séchés pendant 24 heures à 80 °C.

L'analyse du fluorure dans les tissus de vers à soie et dans les feuilles de mûrier a été réalisée avec une électrode à ions spécifiques (Wu, 1982). Un échantillon séché de 0,2 g de chacun des spécimens a été extrait dans 25 ml de 0,1 N $HClO_4$ pendant une demi-heure à l'aide d'un agitateur magnétique.

RESULTATS ET DISCUSSION

Teneur et cinétique du fluorure dans le sang des larves de vers à soie :

La relation entre le contenu en fluorure du sang des larves de vers à soie et la teneur en fluorure des feuilles de mûrier est indiquée dans la figure 1. La concentration moyenne en fluorure dans le sang des larves nourries avec des feuilles non traitées est de 6,88 mg/l et varie de 4,20 à 9,23 mg/l. Après traitement au fluorure, la concentration en fluorure dans le sang des larves à 24, 48 et 96 heures augmente parallèlement à celle des feuilles de mûrier. On observe une corrélation positive et

significative entre la concentration en fluorure dans le sang des larves (y_b) et celle des feuilles de mûrier (x). Les équations de régression sont les suivantes :

A. Variété Zhenong 1 :

24 h, $y_b = 10.8414e^{6.5416x}$
$r = 0.8829$ $p < 0.01$

48 h, $y_b = 8.6765e^{8.2415x}$
$r = 0.8440$ $p < 0.05$

96 h, $y_b = 5.7178e^{7.3795x}$
$r = 0.8551$ $p < 0.05$

B. Variété Hang 8 :

24 h, $y_b = 8.8995e^{7.1486x}$
$r = 0.9715$ $p < 0.01$

48 h, $y_b = 8.0276e^{7.8823x}$
$r = 0.8971$ $p < 0.01$

96 h, $y_b = 4.9452e^{7.2433x}$
$r = 0.8895$ $p < 0.01$

Lorsque des larves traitées au fluorure sont ensuite nourries avec des feuilles non traitées pendant 48 heures, les concentrations en fluorure du sang diminuent de manière significative. Cependant, la teneur en fluorure dans le sang des larves nourries avec du fluorure reste plus élevée que celle des groupes témoins, en raison de l'effet résiduel du fluorure. Les résultats de la figure 1 montrent que l'accumulation de fluorure diffère entre les variétés de vers à soie présentant des taux de fluorure supérieurs. La variété de vers à soie résistante au fluorure Zhenong 1 présente une concentration en fluorure plus importante que la variété peu résistante Hang 8. Ceci pourrait être dû principalement aux différences d'habitudes de nourrissage. Zhenong 1 est une variété d'élevage d'été-automne qui mange en grandes quantités, a beaucoup d'appétit et une durée du cinquième âge très courte. Hang 8 est une variété d'élevage de printemps qui mange lentement et dont le cinquième âge est plus long. Un autre facteur important est leur différence de tolérance au fluorure. Du fait de leur forte résistance au fluorure, les larves de Zhenong 1 continuent à manger des feuilles de mûrier traitées au fluorure même lorsque de très fortes concentrations en fluorure leur sont administrées pendant 48 heures, bien qu'elles aient nettement perdu l'appétit. Cependant, les larves de Hang 8, variété très sensible au fluorure, perdent complètement l'appétit après administration de fortes concentrations de fluorure pendant moins de 36 heures. Après 48 heures de nourrissage avec des feuilles de mûrier traitées au fluorure, les larves de Zhenong 1 consomment davantage de feuilles de mûrier et donc davantage de fluorure. Le poids moyen des feuilles consommées par larves pendant 48 heures d'administration de fluorure est présenté dans le tableau I. Chez le groupe I, la quantité de feuilles de mûrier ingérée est de 3,13 ± 0,11 g chez Zhenong 1 et de 2,17 ± 0,29 g chez Hang 8 et la quantité de fluorure est respectivement de 48,24 ± 2,68 µg et de 33,40 ± 3,50 µg. Chez le groupe IV, le poids de feuilles de mûrier fraîches ingérées est respectivement de 1,31 ± 0,34 g et de 0,77 ± 0,20 g et la quantité de fluorure est respectivement de 357,62 ± 56,76 µg et de 193,31 ± 40,86 µg. La figure 1 montre également que la concentration en ions fluor dans le sang des larves de Zhenong 1 est inférieure à celle du sang des larves de Hang 8 après arrêt de l'administration de fluorure pendant 48 heures (c'est-à-dire l'échantillon sanguin prélevé à 96 heures). Ces résultats ont conduit les auteurs à la conclusion que Zhenong 1, qui a une nature plus résistant au fluorure, est plus tolérant au fluorure et a une capacité plus grande à excréter le fluorure.

Teneur et cinétique du fluorure dans le tégument, les tissus de l'intestin moyen, les tubes malpighiens et le corps adipeux des larves de vers à soie :

La teneur de fluorure dans le tégument, les tissus de l'intestin moyen, les tubes malpighiens et le corps adipeux des larves de ver à soie est présenté dans les figures 2 à 5. Ces résultats indiquent que l'augmentation de l'accumulation du fluorure est parallèle à celle de la teneur en fluorure de la nourriture. On observe des corrélations exponentielles significatives entre les concentrations en fluorure dans ces organes et celles des feuilles de mûrier (Tableau II). La séquence de l'augmentation de l'accumulation de fluorure est la suivante : tubes malpighiens > tissus de l'intestin moyen > corps adipeux > tégument. La concentration en fluorure de l'intestin moyen, organe de digestion, est plus élevée que celle des feuilles de mûrier et la concentration en fluorure des tubes malpighiens est beaucoup plus élevée que celle des feuilles de mûrier. Les teneurs en fluorure du tégument et du corps

adipeux sont inférieures à celle des feuilles de mûrier digérées. On en conclut que les tubes malpighiens et l'intestin moyen sont les principaux organes d'accumulation du fluorure. La concentration relativement élevée en fluorure dans le tissu de l'intestin moyen et dans les tubes malpighiens chez le groupe témoin suggère que ces organes tendent à accumuler le fluorure dans le métabolisme du ver à soie. Les figures 2 à 5 suggèrent que :

1) La concentration en ions fluor présente une tendance similaire dans le corps adipeux, le tégument et les tissus de l'intestin moyen. Cette concentration augmente à mesure que la teneur en fluorure dans les feuilles de mûrier augmente.

2) Il n'y a pas de différence significative de la concentration en ions fluor entre ces trois organes à intervalles de 24, 48 et 96 heures, hormis une légèrement augmentation de la concentration en ions fluor à 48 heures lorsque l'on administre une concentration très forte. Il apparaît que l'accumulation d'ions fluor dans ces organes larvaire est affectée par la concentration en fluorure donnée dans l'aliment mais n'est pas accélérée par le nombre de nourrissages avec des feuilles traitées au fluorure. De plus, l'accumulation de fluorure dans ces organes ne diminue pas après nourrissage des larves avec des feuilles normales pendant 24 heures. Elle augmente légèrement après nourrissage avec des teneurs plus élevées.

3) L'augmentation de la concentration en ions fluor dans les tubes malpighiens est fonction de celle du nombre de nourrissages avec des feuilles de mûrier traitées, ce qui indique une accumulation successive de fluorure due à la digestion des feuilles et à l'absorption de fluorure. Les tubes malpighiens sont un organe excréteur important des larves de vers à soie, leur fonction principale est la séparation et l'excrétion des déchets métaboliques du sang. Il est donc compréhensible que la séquence de la concentration en ions fluor dans les tubes malpighiens soit 96 heures > 48 heures > 24 heures pour que les tubes malpighiens absorbent le fluorure excédentaire du sang.

4) On observe une différence significative pour ce qui concerne les concentrations en fluorure dans ces organes entre les variétés de vers à soie Zhenong 1 et Hang 8. Des travaux précédents ont montré que Zhenong 1 est 10 fois plus résistant au fluorure que Hang 8. Dans cette expérience, le fluorure s'accumule davantage dans le corps adipeux, les tissus de l'intestin moyen et le tégument de la race peu résistante au fluorure (Hang 8) que dans les organes correspondant de la variété fortement résistante (Zhenong 1) ; ceci est particulièrement évident chez les groupes à faible administration I, II et III et à l'intervalle de 48 heures. Cependant, le résultat inverse a été obtenu pour les tubes malpighiens : la race résistante Zhenong 1 accumule beaucoup plus de fluorure que la race peu résistante Hang 8. Ceci suggère que le fluorure ingéré à partir de feuilles de mûrier s'accumule moins et est mieux excrété chez la race résistante Zhenong 1 que chez la race peu résistante Hang 8. Dans les figures 2 à 4, les résultats à 96 heures pour le groupe VII n'ont pas été présentés car toutes les larves de ce groupe sont mortes après ce laps de temps.

Concentration en fluorure et cinétique dans les matières fécales des larves de vers à soie :
La concentration en fluorure dans les matières fécales (y_f) est corrélée de manière exponentielle à celle des feuilles de mûrier (Fig. 6). Les équations de régression sont les suivantes :

A. Variété Zhenong 1 :

à 24 heures, $y_f = 95.0072e^{1.9955x}$
$r = 0.9107$ $p < 0.01$

à 48 heures, $y_f = 115.6006e^{2.2533x}$
$r = 0.9107$ $p < 0.01$

B. Variété Hang 8 :

à 24 heures, $y_f = 31.3987e^{2.5756x}$
$r = 0.9235$ $p < 0.01$

à 48 heures, $y_f = 8.9222e^{2.1211x}$
$r = 0.8325$ $p < 0.01$

La figure 6 montre que la concentration en ions fluor dans les matières fécales de chacun des groupes diminue fortement après nourrissage des larves traitées au fluorure avec des feuilles non traitées pendant 48 heures (ligne 96 heures), mais que la concentration en ions fluor continue

d'augmenter de manière séquentielle, bien que faiblement, du groupe témoin au groupe IV en raison de l'effet résiduel du fluorure sur les larves de vers à soie. L'excrétion de fluor dans les matières fécales est également plus importante chez les larves de Zhenong 1 que chez les larves de Hang 8, ceci est particulièrement évident chez les groupes traités avec des concentrations élevées en fluorure.

Sur la base de ces résultats, les auteurs concluent que le caractère de résistance au fluorure d'une variété de vers à soie se compose d'au moins deux facteurs : la quantité d'ions fluor qui peut être tolérée et la capacité d'évacuation du fluorure. Ces deux facteurs sont les expressions ultimes des processus biochimiques et physiologiques qui lient les caractéristiques intrinsèques d'une variété de vers à soie. Les variétés de vers à soie à forte résistance au fluorure peuvent tolérer des concentrations élevées en ions fluor dans le sang absorbé dans les cellules de l'intestin moyen, cellules qui maintiendront leur fonction de digestion et d'absorption même après une forte consommation de fluorure, tandis que les tubes malpighiens sont capables d'éliminer la majeure partie des ions fluor du sang. Au contraire, les variétés de vers à soie sensibles au fluorure ne peuvent tolérer que de très faibles quantités d'ions fluor, les cellules des tissus sont très sensibles aux dommages causés par le fluorure et les tubes malpighiens sont incapables d'évacuer le fluor.

On sait que la teneur totale de fluor dans la totalité du corps d'un insecte se compose de trois fractions majeures, celle du fluorure encore présent dans les résidus alimentaires dans le tube digestif, celle absorbée par les tissus via l'intestin et celle déposée par des dépôts mouillés et secs sur les surfaces externes. La quantité de fluorure conservée par l'intermédiaire des dépôts mouillés et sec sur la surface de l'insecte en laboratoire est faible en termes absolus et négligeable en comparaison de celle de la nourriture ingérée, aussi le fluorure accumulé vient-il originellement de la nourriture. Le fluorure dans le corps de l'insecte peut être divisé en deux parties principales : le fluorure non digérée dans les contenus intestinaux qui sont excrétés sous la forme de matières fécales et le fluorure absorbé par le système digestif et retenu dans les tissus. La digestibilité des feuilles de mûrier a été évaluée à 40 % (Xu, 1963). Ceci signifie qu'environ 0,6 g de matières fécales provient d'1 g de feuilles de mûrier ingérées. Si le fluorure présentait le même pourcentage d'absorption que la digestibilité des feuilles de mûrier, il n'y aurait aucune différence de concentration en fluorure entre les feuilles et les matières fécales. L'augmentation de la concentration en fluorure dans les matières fécales observées chez Zhenong 1 n'a pu se produire que si l'absorption de fluorure était plus faible que la digestibilité des feuilles et que la forte capacité d'évacuation du fluorure par les tubes malpighiens. La variété peu résistante Hang 8 présente une concentration inférieure en fluorure dans les matières fécales, ce qui indique que l'absorption de fluorure est plus importante. Le pourcentage de fluorure absorbé peut être calculé à partir de la digestibilité des feuilles et de la concentration en fluorure dans les feuilles et dans les matières fécales.

$$[\text{F}]\ \text{absorbé} = \frac{[\text{F}]\ \text{dans les feuilles} - (0{,}6 \times [\text{F}]\ \text{dans les matières fécales})}{[\text{F}]\ \text{dans les feuilles}} \times 100$$

Ceci corrobore l'hypothèse que la majeure partie du fluor ingéré est excrétée avec les matières fécales lorsque la concentration en fluorure n'est pas trop élevée et que la variété fortement résistante excrète davantage de fluorure que la variété sensible. Ceci est en accord avec les travaux de Hughes et coll. (1985) chez *Triochoplusia ni*.

SYMPTOMS OF A MICROSPORIDIAN INFECTION IN THE MUGA SILKWORM, *ANTHERAEA ASSAMENSIS*: EFFECTS ON EGG PRODUCTION AND HATCHING

J.N. TALUKDAR

Institute of Advanced Study in Science and Technology, Khanapara, Guwahati - 781022, Assam, India.

*Egg production of the muga silkworm, **Antheraea assamensis**, is significantly reduced by a microsporidian infection. The later the emergence of moths, the smaller is the number of eggs they oviposit. The parasite does not significantly affect the hatching of larvae. There is also no effect of the infection on the total days for larval hatching, on the length of the incubation period of eggs, and on the daily rate of larval hatching. These results indicate that the action of the parasite is mild in the embryonic condition, allowing the host to develop almost normally.*

Keywords: Muga silkworm, *Antheraea assamensis*, microsporidian infection, oviposition, larval hatching.

INTRODUCTION

The muga silkworm, *Antheraea assamensis*, which is found only in the Brahmaputra Valley of Assam, India, is one of the useful insects since it produces "muga" silk which is of commercial value. The insect suffers from some diseases which have been known to rearers since they initiated its cultivation. No systematic studies, however, have been made on these diseases except for the very limited work by Jameson (1922) and some observations by Basu (1915). One of the diseases afflicting this insect is the "phutukia" disease, meaning the disease of spot because of the black spots that appear on the body of the insect. Talukdar (1971) has studied this disease, which is caused by a microsporidian. Specimens were sent for identification to Dr G.M. Thomas, Diagnostician (Division of Entomology, Agricultural Experimental Station, College of Agricultural Science, University of California, Berkeley, USA), who found in these abundance of spores but no other stages in the life cycle of the pathogen. He searched many slides for stages in spore formation but found no pansporoblast, which led him to infer that the microsporidian is probably a *Nosema* sp. The present paper describes the influence of the parasite on the host's egg production and hatching.

MATERIALS AND METHODS

After some microsporidian spores were found in pupae from the brood raised at the Basic Muga Seed Farm, Khanapara, Guwahati, India, 200 seed-cocoons spun on the same day were brought to the laboratory and maintained until metamorphosis. The maximum number of pairings was made with the moths which emerged. After pairing for 16 hr, female moths were confined individually in 500-ml covered glass beakers. A rough-surfaced flat bamboo stick was placed inside each beaker to provide a resting place for the moths and to serve as a surface for egg laying. On the 10th day of oviposition the female moths were examined individually under the microscope to check for the presence or absence of microsporidian spores. The number of eggs in each laying was recorded for healthy and infected moths and the eggs were transferred to a covered Petri dish for further development. Larvae

that hatched from eggs laid by each moth were also computed daily. The data were compared by applying the 't' test to determine the significant difference, if any, between healthy and infected groups, in respect of the number of eggs laid per moth, number of larvae which hatched per 100 eggs, total days taken to complete the hatching of the layings, and incubation periods of the eggs. The period between the laying of the first egg to the hatching of the first egg was considered as the incubation period. The period from the first to the last day of hatching of the eggs of the same batch was considered as the total days taken to complete the hatching. To test whether the daily rate of hatching was independent of infection, the χ^2 test was applied.

RESULTS

As a preliminary study, prior to conducting the experiment reported above, data on some eggs of healthy and infected moths from the same brood were collected randomly to estimate the difference, if any, between the healthy and infected groups in respect of the number of eggs laid per moth. The analytical procedure employed was the same as that for the experiment reported. The results, presented in Table I, show that the average number of eggs per oviposition is invariably lower in all the infected batches than in the healthy ones. It was lower by 36.57, 18.25, 52.10, and 48.20 in the four batches recorded. However, these differences are not statistically significant.

Table I. The egg production by *Antheraea assamensis* infected and non infected by a microsporidian.

Tableau I. Production d'oeufs chez des spécimens d'*Antheraea assamensis *infectés et non infectés par une microsporodie.

Sample	Batch	Number of specimens	Number of eggs		Calculated value of 't'
			Range	Mean ± SE	
Echantillon	*Lot*	*Nombre de spécimens*	*Nombre d'oeufs*		*Valeur calculée pour "t"*
			Fourchette	*Moyenne ± SE*	
15.7.66	Healthy / *Sain*	5	100-233	180.40 ± 26.75	1.0568^{NS}
	Infected / *Infesté*	6	75-209	143.83 ± 22.43	for / *pour* 9 df
2.11.66	Healthy / *Sain*	4	183-279	211.25 ± 22.78	0.9273^{NS}
	Infected / *Infesté*	6	150-243	193.00 ± 14.07	for / *pour* 8 df
22.3.67	Healthy / *Sain*	7	147-218	186.43 ± 10.83	2.115^{NS}
	Infected / *Infesté*	9	41-221	134.33 ± 19.90	for / *pour* 14 df
Date not recorded	Healthy / *Sain*	10	66-280	195.50 ± 20.24	1.50^{NS}
Date non relevée	*Infected / Infesté*	10	24-237	147.30 ± 25.02	for / *pour* 18 df

SE: Standard error / *Ecart type.*
NS: Non significant / *Non significatif.*
df: Degree of freedom / *Degré de liberté.*

Table II. Effect of a microsporidian on *Antheraea assamensis* relative to fecundity, larval hatching, incubation period of eggs[a] and time taken for egg hatching[b].

Tableau II. Effet d'une microsporidie sur la fécondité, l'éclosion larvaire, la durée d'incubation des oeufs[a] et le temps nécessaire à l'éclosion des oeufs[b] chez Antheraea assamensis.

Observations	Batch of mother moths	Total sample	Group	Range	Mean ± SE	't' value
Observations	*Lot des papillons mères*	*Echantillon total*	*Groupe*	*Fourchette*	*Moyenne ± SE*	*Valeur "t"*
Number of eggs/laying	1st day	3	H	195-219	209.66	Not done
Nombre d'oeufs	*1er jour*	2	I	155-209	182.00	*Non calculée*
par ponte	2nd day	13	H	188-235	212.153 ± 3.969	1.477^{NS}
	2e jour	9	I	91-232	192.33 ± 15.23	for / *pour* 20 df
	3rd day	5	H	211-266	235.80 ± 11.63	2.184*
	3e jour	13	I	99-252	193.53 ± 11.03	for / *pour* 16 df
	Overall	21	H	188-266	217.43 ± 4.28	3.195**
	Global	32	I	91-252	186.63 ± 7.28	for / *pour* 51 df
Larval hatching (%)	1st day	3	H	87-96	92.33	Not done
Eclosion larvaire (%)	*1er jour*	2	I	87-96	91.50	*Non calculée*
	2nd day	13	H	81-95	91.23 ± 1.10	1.258^{NS}
	2e jour	9	I	43-95	85.22 ± 5.57	for / *pour* 20 df
	3rd day	5	H	85-94	89.80 ± 1.80	1.161^{NS}
	3e jour	13	I	66-98	84.62 ± 2.64	for / *pour* 16 df
	Overall	21	H	81-96	91.05 ± 0.83	1.692^{NS}
	Global	32	I	43-98	85.88 ± 2.02	for / *pour* 51 df
Incubation period of eggs (days)	Overall	21	H	12-13	12.29 ± 0.14	1.311^{NS}
Durée d'incubation (jours)	*Global*	32	I	12-14	12.50 ± 0.10	for / *pour* 51 df
Days taken to complete egg hatching	Overall	21	H	7-12	9.33 ± 0.29	0.540^{NS}
Nombre de jours nécessaires à l'éclosion des oeufs	*Global*	32	I	5-13	9.06 ± 0.36	for / *pour* 51 df

H: Healthy / *Sain..*
I: Infected / *Infesté..*
* Significant at 5% level / *Significatif au seuil de 5 %.*
** Significant at 1 % level / *Significatif au seuil de 1 %.*
NS: Not significant / *Non significatif.*
a: Covers the period from the 1st day of egg laying to the 1st day of hatching.
a : Couvre la période allant du 1er jour de ponte au 1er jour d'éclosion.
b: Covers the period from the 1st day to the last day of hatching.
b : Couvre la période allant du 1er au dernier jour d'éclosion.

The results of the present experiment, as summarised in Table II, show that on the average the infected moths laid 30.8 eggs less than the healthy ones. The number of eggs in the infected group ranged from 91 to 252, the mean (with standard error) was 186.63 ± 7.28. In the healthy group, the range was from 188 to 266, the mean (with standard error) was 217.43 ± 4.28. The difference is statistically significant at the 1% level for 51 degrees of freedom (df). When the data were analyzed by batches, separating the moths according to days after emergence, a different picture was seen. Specifically, the infected moths on the first, second, and third days after emergence were found to lay 27.66, 19.82 and 42.26 eggs less, respectively, than those of corresponding healthy batches on the average. While the difference was significant at the 5% level in the case of eggs laid on the third day, it was not significant in the case of eggs laid on the second day. Analysis of the data on the first day after emergence was not attempted, as the number of specimens in the infected and healthy groups were only 2 and 3, respectively.

The mean percentage of larvae which hatched was 5.17% less in the infected group than in the healthy group, the means being 85.88 ± 2.02 and 91.05 ± 0.83 in the infected and healthy groups, respectively. This difference, however, is not statistically significant. An analysis of the data according to the emerging date of the moths has revealed that the average percentage of hatching was 91.50, 85.22 (SE 5.57), and 84.62 (SE 2.64), respectively, for the eggs laid on the first, second, and third days of emergence of infected batches. The equivalent figures were 92.33, 91.23 (SE 1.10), 89.80 (SE 1.80) in the case of the healthy batches. The differences observed in the second and third day batches are not statistically significant. The data for the first-day emerged batches were not analyzed since the size of sample was very small, being only 2 in the infected batch and 3 in the healthy one.

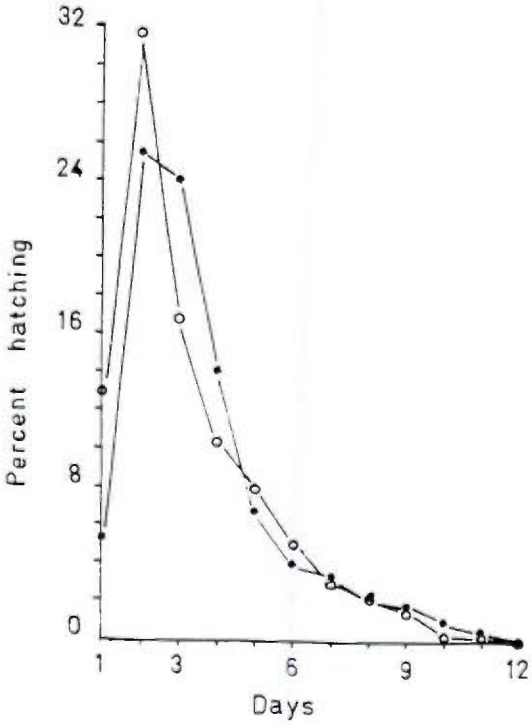

Fig. 1: Daily rate of hatching of eggs laid by moths of *Antheraea assamensis*.

Rate determined from the study of 32 layings laid by infected mothers and 21 layings by healthy mothers.

***Fig. 1 : Taux journalier d'éclosion des oeufs pondus par des papilons d'*Antheraea assamensis.**

Taux calculé sur la base de l'étude de 32 pontes provenant de mères infestées et de 21 pontes de mères saines.

•——• Microsporidian-infected moths / *Papillons infestés par une microsporidie.*

○——○ Uninfected moths / *Papillons sains.*

The daily rate of hatching of eggs as determined from the study of 32 ovipositions by infected mothers and 21 ovipositions by healthy mothers is represented graphically in Figure 1. Assuming that the daily rate of hatching is independent of the microsporidian infection, a χ^2 test was applied to the data obtained from infected and healthy groups and the calculated χ^2 value with 11 df was 6.567, which is less than the value of 19.68 at the 5% level for the same df. Therefore, it is not significant, i.e., the daily rate of hatching for infected and healthy groups is equal.

The average incubation period of the eggs laid by infected moths was 12.50 ± 0.10 days, ranging from 12 to 14 days. It was 12.29 ± 0.14 days, ranging from 12 to 13 days, in the case of eggs laid by healthy moths. This difference of 0.21 day is not statistically significant. The period required for the hatching of the eggs was practically the same in the healthy and the infected groups. On average, it took 9.33 (SE 0.29) days in the former case and 9.06 (SE 0.36) in the latter. This difference is not statistically significant (Table II).

It was also noted that 6 (15.8%) of the 38 ovipositions laid by infected moths failed to hatch, but only 2 (8.7%) of 23 ovipositions laid by healthy moths failed to hatch.

DISCUSSION

Although sporadic checks of isolated samples of eggs (first experiment) suggest that the microsporidian infection had no effect on egg production of *A. assamensis*, a closer examination revealed a mild but definite effect (second experiment). This increased with the age of the mother moths. Talukdar (1971, 1980) has shown that as many as 265 (13.66%) uninfected larvae could be recovered out of a total of 1939 which hatched out of 12 ovipositions by infected moths. If in the present work all the eggs laid by infected moths had been infected, the differences between the infected and the uninfected groups in respect of the number of eggs laid could have been greater. These findings confirm those of other workers (Thomson, 1958; Zimmack *et al.*, 1954; Kramer, 1959; Fox and Weiser, 1959; Talukdar, 1960; Veber and Jasic^{v}, 1961; Smirnoff, 1966; Laird, 1959; Drea *et al.*, 1969).

So far as the percentage of hatching is concerned, there is an apparent difference between the healthy and infected groups. The percentage of hatching is 83.30 in the former case and 71.00 in the latter case. There is also a difference between the healthy and the infected groups as regards the total days taken for egg hatching and also in the incubation period of eggs. While in egg hatching, the healthy group requires 0.27 day more, the incubation period is longer by 0.21 day in the infected group. Interestingly, however, the difference between the two groups is not statistically significant. All these suggest that the action of the parasite is very mild in the embryonic condition, allowing the host to develop almost normally. This phenomenon appears to be linked up with the behaviour of the parasite to stay in vegetative stage condition inside the unlaid egg without further development to spore stage as established by Talukdar (1971).

ACKNOWLEDGEMENTS

The author expresses his gratitude to Dr K.N. Sharma for his guidance, and Dr D.N. Hazarika and Professor B. Das for their statistical advice.

REFERENCES

BASU B.C. (1915) The Silk Industry of Assam. Assam Secy. Print Office, Shillong, India, 68 pp.

DREA J.J. Jr, ANGALET G.W., DAY W.H. (1969) *Nosema* sp. infecting a laboratory colony of alfalfa weevil. J. Invertebr. Pathol., 13, 303-305.

FOX R.M., WEISER J. (1959) A microsporidian parasite of *Anopheles gambiae* in Liberia. J. Parasitol., 45, 21-30.

JAMESON A.P. (1922) Report on the diseases of silkworms in India. Superint, Govt. Print, Calcutta, India, 165 pp.

KRAMER J.P. (1959) Some relationships between *Perezia pyraustae* Paillot (Sporozoa, Nosematidae) and *Pyraustae nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera, Pyralidae). J. Insect Pathol., 1, 25-33.

LAIRD M. (1959) Malayan protozoa. I: *Plistophora collessi* n. sp. (Sporozoa: Microsporidia), an ovarian parasite of Singapore mosquitoes. J. Protozool., 6, 37-45.
SMIRNOFF W.A. (1966) *Thelohania pristiphorae* sp. n., a microsporidian parasite of the larch sawfly, *Pristiphora erichsonii* (Hymenoptera: Tenthredinidae). J. Invertebr. Pathol., 8, 360-364.
TALUKDAR J.N. (1960) Preliminary observations on pebrine disease of *Philosamia ricini* Hutt: control measures. Science and Culture, 26, 81-83.
TALUKDAR J.N. (1971) Studies on some aspects of a microsporidian parasite infecting muga silkworm, *Antheraea assamensis* Ww. PhD Thesis, Gauhati University, Assam, India.
TALUKDAR J.N. (1980) Prevalence of transovarian infection of a microsporidian parasite infecting muga silkworm, *Antheraea assamensis*. J. Invertebr. Pathol., 36, 273-275.
THOMSON H.M. (1958) Some aspects of the epidemiology of a microsporidian parasite of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem). Can. J. Zool., 36, 309-316.
VEBER J., JASIC[v] J. (1961) Microsporidia as a factor in reducing the fecundity in insects. J. Insect Pathol., 3, 103-111.
ZIMMACK H.L., ARBUTHNOT K.D., BRINDLEY T.A. (1954) Distribution of the European corn borer parasite, *Perezia pyraustae*, and its effect on the host. J. Econ. Entomol., 47, 641-645.

SYMPTOMES D'UNE INFESTATION MICROSPORIDIENNE CHEZ LE VER A SOIE MUGA *ANTHERAEA ASSAMENSIS* : EFFETS SUR LA PRODUCTION ET L'ECLOSION DES OEUFS

J.N. TALUKDAR

Institute of Advanced Study in Science and Technology, Khanapara, Guwahati - 781022, Assam, Inde.

La production d'oeufs du ver à soie muga ***Antheraea assamensis*** *diminue fortement après infestation par une microsporidie. Le nombre d'oeufs que le papillon dépose est d'autant plus faible que l'émergence est tardive. Le parasite n'affecte pas de manière significative l'éclosion des larves. L'infestation n'a pas d'effet non plus sur le nombre total de jours nécessaires à l'éclosion, sur la durée de la période d'incubation des oeufs et sur le taux journalier d'éclosion des oeufs. Ces résultats indiquent que l'action du parasite est modérée au stade embryonnaire, ce qui permet à l'hôte de se développer de manière presque normale.*

INTRODUCTION

Le ver à soie muga *Antheraea assamensis*, que l'on trouve uniquement dans la vallée du Brahmapoutre en Assam (Inde), est l'un des insectes économiquement utiles car il produit la soie "muga", d'intérêt commercial. Cet insecte est la cible d'un certain nombre de maladies qui sont connues des éleveurs depuis qu'ils se sont intéressés à son élevage. Aucune étude systématique n'a cependant été réalisée sur ces maladies, à l'exception des travaux restreints de Jameson (1922) et de certaines observations de Basu (1915). L'une des maladies affectant cet insecte est le "phutukia", qui signifie "maladie des taches" en raison des taches noires qui apparaissent sur le corps de l'insecte. Talukdar (1971) a étudié cette maladie, qui est provoquée par une microsporidie. Des spécimens ont été envoyés pour identification au Dr G.M. Thomas, Diagnostiqueur (*Division of Entomology, Agricultural Experiment Station, College of Agricultural Science, University of California, Berkeley*, Etats-Unis), qui a observé chez ces derniers des spores en abondance mais aucun autre stade du cycle de cet agent pathogène. Il a effectué de nombreuses coupes afin de rechercher des stades de formations de spores mais n'a pu découvrir de pansporoblastes, ce qui l'a conduit à conclure que cette microsporidie était probablement une espèce de *Nosema*. Cet article décrit l'influence du parasite sur la production et l'éclosion des oeufs chez l'hôte.

MATERIELS ET METHODES

A la suite de l'observation de quelques spores de microsporidies chez des chrysalides d'une ponte élevée à la *Basic Muga Research Farm* de Khanapara (Guwahati, Inde), 200 cocons filés le même jour ont été transférés en laboratoire et conservés jusqu'à la métamorphose. Le nombre maximal d'accouplements a été réalisé avec les papillons qui ont pu émerger. Après accouplement pendant 6 heures, les papillons femelles ont été confinés individuellement dans des bechers en verre fermés de 500 ml. Une tige en bambou à surface rugueuse, servant à la fois de surface de repos et de ponte pour les papillons, a été placée à l'intérieur de chaque becher. Dix jours après la ponte, les papillons mères ont été examinés individuellement au microscope afin de déterminer la présence ou l'absence de spores microsporidiennes. Le nombre d'oeufs de chaque ponte a été relevé pour les papillons

infestés et sains puis les oeufs ont été transférés dans une boîte de Pétri fermée pour permettre leur développement. Le nombre de larves écloses a également été enregistré quotidiennement. Les données ont été comparées en appliquant le test "t" afin de déterminer la différence significative éventuelle entre les groupes sains et les groupes infestés pour ce qui concerne le nombre d'oeufs pondus par chaque papillon, le nombre de larves écloses pour 100 oeufs, le nombre de jours nécessaires à l'éclosion des pontes et les périodes d'incubation des oeufs. La période d'incubation considérée est basée sur la période allant de la ponte du premier oeuf à l'éclosion du premier oeuf. Le nombre total de jours nécessaires à l'éclosion totale est basé sur la période allant du premier au dernier jour d'éclosion des oeufs. On a utilisé le test χ^2 afin de déterminer si le taux journalier d'éclosion des oeufs est indépendant de l'infestation.

RESULTATS

En étude préliminaire, avant de réaliser l'expérience décrite ci-dessus, des données portant sur des oeufs de papillons sains et infestés provenant de la même ponte ont été relevées au hasard afin d'évaluer la différence éventuelle entre les groupes sains et infestés pour ce qui concerne le nombre d'oeufs pondus par papillon. Le protocole analytique employé est le même que celui utilisé pour l'expérience décrite ici. Les résultats, présentés dans le tableau I, montrent que le nombre moyen d'oeufs par oviposition est toujours plus faible chez les lots infestés que chez les lots sains. Ce nombre est inférieur de 36,57, 18,25, 52,10 et 48,20 chez les quatre lots considérés. Cependant, ces différences ne sont pas statistiquement significatives.

Les résultats de cette étude, résumés dans le tableau II, montrent qu'en moyenne, les papillons infestés pondent 30,8 oeufs de moins que les papillons sains. Le nombre d'oeufs chez le groupe infesté varie de 91 à 252, la moyenne est de 186,63 ± 7,28. Chez le lot sain, la fourchette se situe entre 188 et 266, la moyenne est de 217,43 ± 4,28. La différence est statistiquement significative au seuil de 1 % pour 51 degrés de liberté (df). L'analyse des données en lots, en séparant les papillons en fonction des jours d'éclosion, donne des résultats différents. Plus précisément, les papillons infestés les premier, deuxième et troisième jours après l'émergence pondent en moyenne 27,66, 19,82 et 42,26 oeufs de moins que ceux des lots sains correspondants. Bien que la différence soit significative au seuil de 5 % dans le cas des oeufs pondus le troisième jour, elle n'est pas significative dans le cas des oeufs pondus le deuxième jour. L'analyse des données obtenues pour le premier jour après l'émergence n'a pas été réalisée car le nombre de spécimens chez les lots infestés et sains était seulement de 2 et 3 respectivement.

Le pourcentage moyen de larves écloses est inférieur de 5,17 % chez le groupe infesté à celui du groupe sain, avec des moyennes de 85,88 ± 2,02 pour le groupe infesté et de 91,05 ± 0,83 pour le groupe sain. Cette différence n'est cependant pas significative. L'analyse des données en fonction de la date d'émergence des papillons révèle que le pourcentage moyen d'éclosion est de 91,50, 85,22 (écart type 5,57) et 84,62 (écart type 2,64) pour les oeufs pondus respectivement le premier, le deuxième et le troisième jour d'émergence chez les lots infestés. Les chiffres correspondants sont de 92,33, 91,23 (écart type 1,10), 89,80 (écart type 1,80) dans le cas des lots sains. Les différences observées chez les lots du deuxième et du troisième jour ne sont pas statistiquement significatives. Les données pour les lots émergés le premier jour n'ont pas été analysées car la taille de l'échantillon était trop faible avec seulement 2 individus dans le lot infesté et 3 dans le lot sain.

Le taux journalier d'éclosion des oeufs, déterminé sur la base de 32 ovipositions de mères infestées et de 21 ovipositions de mères saines, est représenté graphiquement dans la figure 1. Prenant comme postulat que le taux journalier d'éclosion est indépendant de l'infestation microsporidienne, un test χ^2 a été appliqué aux données obtenues pour les groupes infestés et sains ; la valeur χ^2 calculée pour 11 degrés de liberté est de 6,567, ce qui est inférieur à la valeur de 19,68 au seuil de 5 % pour le même nombre de degrés de liberté. Cette valeur n'est donc pas significative et le taux journalier d'éclosion pour les groupes infestés et sains est égal.

La période moyenne d'incubation des oeufs pondus par les papillons infestés est de 12,50 ± 0,10 jours et varie de 12 à 14 jours. Elle est de 12,29 ± 0,24 jours et varie de 12 à 13 jours pour les oeufs pondus par les papillons sains. Cette différence de 0,21 jour n'est pas statistiquement

significative. La période nécessaire à l'éclosion des oeufs est pratiquement la même chez les groupes infestés et sains. En moyenne, elle est de 9,33 (écart type 0,29) jours dans le premier cas et de 9,06 (écart type 0,36) dans le deuxième. Cette différence n'est pas statistiquement significative (Tableau II).

DISCUSSION

Bien que des tests ponctuels sur des échantillons isolés d'oeufs (première expérience) suggèrent que l'infestation microsporidienne n'a pas d'effet sur la production d'oeufs chez *A. assamensis*, un examen plus approfondi révèle un effet modéré mais bien défini (deuxième expérience). Cet effet augmente avec l'âge des papillons mères. Talukdar (1971, 1980) a montré qu'il était possible d'obtenir jusqu'à 265 (13,66 %) larves saines sur un total de 1 939 larves issues de 12 ovipositions de papillons infestés. Si, dans l'étude présentée ici, tous les oeufs pondus par des papillons infestés avaient été infestés, les différences entre les groupes infestés et non infestés pour ce qui concerne le nombre d'oeufs pondus auraient pu être plus importantes. Ces résultats corroborent ceux d'autres auteurs (Thomson, 1958 ; Zimmack et coll., 1954 ; Kramer, 1959 ; Fox et Weiser, 1959 ; Talukdar, 1960 ; Veber et Jasic^{v}, 1961 ; Smirnoff, 1966 ; Laird, 1959 ; Drea et coll., 1969).

Pour ce qui concerne le pourcentage d'éclosion, on constate une différence entre les groupes sains et infestés. Le pourcentage d'éclosion est de 83,30 dans le premier cas et de 71,00 dans le deuxième cas. Il y a également une différence entre les groupes sains et infestés pour ce qui concerne le nombre total de jours nécessaires à l'éclosion des oeufs et la période d'incubation des oeufs. Si, pour l'éclosion des oeufs, il faut 0,27 jour de plus au groupe sain, la période d'incubation est plus longue de 0,21 jour chez le groupe infesté. Il est cependant intéressant de noter que la différence entre les deux groupes n'est pas statistiquement significative. L'ensemble de ces observations suggère que l'action du parasite est très modérée au stade embryonnaire et n'empêche pas l'hôte de se développer de façon presque normale. Ce phénomène semble être lié au comportement du parasite, qui reste à l'état végétatif à l'intérieur de l'oeuf non pondu sans développer de spores, comme l'a montré Talukdar (1971).

EFFECT OF MICRONUTRIENTS ON THE BIOCHEMICAL PARAMETERS OF MULBERRY (*MORUS ALBA* L.) LEAF

P.C. BOSE*, N.R. SINGHIVI & R.K. DUTTA

Soil Science and Chemistry Laboratory, Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore - 570 008, India.

An experiment was conducted to study the effect of foliar application of different levels of various micronutrients on the biochemical constituents of mulberry leaves, variety K_2. The experiment comprised six micronutrients with two doses each, i.e., iron (2.5 and 5.0 kg/ha/yr), manganese (2.5 and 5.0 kg/ha/yr), boron (2.5 and 5.0 kg/ha/yr), copper (2.5 and 5.0 kg/ha/yr), zinc (5.0 and 10.0 kg/ha/yr) and molybdenum (2.5 and 5.0 kg/ha/yr). Analysis of the data revealed that out of eleven biochemical parameters, five parameters, i.e., non-reducing sugar, total sugar, total carbohydrate, crude fibre and total free amino acids, were statistically significantly improved over the control. The remaining six parameters, i.e., moisture, total mineral, reducing sugar, starch, soluble protein and crude protein, were also improved over the control but the improvement was not statistically significant. The maximum increase in non-reducing sugar, total sugar, total carbohydrate, crude fibre and total free amino acid contents was observed with the application of molybdenum (2.5 kg/ha/yr), molybdenum (2.5 kg/ha/yr), molybdenum (2.5 kg/ha/yr), copper (2.5 kg/ha/yr) and manganese (5.0 kg/ha/yr), giving 26.962%, 24.585%, 15.339%, 22.519% and 24.841% increase over the control, respectively.

Keywords: Micronutrients, iron, copper, zinc, manganese, boron, molybdenum, biochemical parameters.

INTRODUCTION

Krishnaswami *et al.* (1971) observed that growth and development of silkworm larvae, *Bombyx mori* L., and the economic characters of the cocoon were greatly influenced by the nutritional content of mulberry leaves. The improvement in the yield of mulberry leaves with the application of micronutrients through foliar sprays was observed by a few workers (Ray and Gupta, 1974; Viswanath, 1979; Lokanath and Shivashankar, 1986), but the literature on the effect of micronutrients on the nutritional content of mulberry leaves is very rare and, moreover, hardly two/three parameters have been studied. Therefore, the authors thought it worthwhile to undertake the study on the influence of micronutrients on the biochemical constituents of mulberry leaves.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted at the Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, during 1987-89. Kanva-2 variety of mulberry was raised with a spacing of 60 cm × 60 cm in red loamy soil with a pH of 7.80 to 8.55, having an electrical conductivity of 0.164 to 0.291 millimhos/cm. The

* Present address and address for correspondence: Central Sericultural Research and Training Institute, 29 B/B, Extension II, Gandhinagar, Jammu - 180 004, India.

experiment was laid in a randomised block design with four replications. The plot size was 6 m × 4.5 m with seventy plants.

The experiment consisted of six treatments with two doses each, i.e., iron$_1$ (2.5 kg/ha/yr) and iron$_2$ (5.0 kg/ha/yr) in the form of ferrous sulphate, manganese$_1$ (2.5 kg/ha/yr) and manganese$_2$ (5.0 kg/ha/yr) in the form of manganous sulphate, boron$_1$ (2.5 kg/ha/yr) and boron$_2$ (5.0 kg/ha/yr) in the form of borax, copper$_1$ (2.5 kg/ha/yr) and copper$_2$ (5.0 kg/ha/yr) in the form of copper sulphate, zinc$_1$ (5.0 kg/ha/yr) and zinc$_2$ (10 kg/ha/yr) in the form of zinc sulphate, molybdenum$_1$ (2.5 kg/ha/yr) and molybdenum$_2$ (5.0 kg/ha/yr) in the form of ammonium molybdate. The treatments with a water spray as control were sprayed in five split doses at the age of 40 days of the plant, i.e., one month before each harvest. Normal fertilisation of 300 kg N, 120 kg P_2O_5 and 120 kg K_2O per ha/yr was provided in five split doses and was applied after 20 days of pruning in each crop. The irrigation schedule was once in ten days. A basal dose of farmyard manure (FYM) @ 20 MT/ha/yr was applied. Five harvests were taken in a year. The plantation was bottom-pruned every time.

Quality parameters, i.e., moisture, total mineral, reducing sugar, non-reducing sugar, total sugar, starch, carbohydrate, soluble protein, crude fibre, crude protein and total free amino acids, of ten crops were estimated adopting the standard chemical analytical methods of AOAC (1984) for total mineral, crude fibre and moisture, Lowry's (1951) method for soluble protein, Microkjeldhal method (Jackson, 1962) for crude protein. Reducing sugar, non-reducing sugar, starch, carbohydrate and total free amino acids were determined by the methods of Plummer (1971).

RESULTS AND DISCUSSION

The data revealed that all the biochemical parameters were improved over the control by the foliar application of the micronutrients (Table I), of which five quality parameters, i.e., non-reducing sugar, total sugar, carbohydrate, crude fibre and total free amino acids, were statistically significantly improved over the control (Table I).

The maximum increase in the content of non-reducing sugar was observed with the application of molybdenum (2.5 kg/ha/yr) and was 27.0% over the control, followed by 23.0% with the application of zinc (5.0 kg/ha/yr) (Table I). The maximum increase in the content of total sugar was observed with the application of molybdenum (2.5 kg/ha/yr) and was 24.5% over the control, followed by 20.5% with the application of copper (2.5 kg/ha/yr) (Table I). The maximum increase in the content of carbohydrate was observed with the application of molybdenum (2.5 kg/ha/yr) and was 13.3% over the control, followed by 13.3% with the application of zinc (5.0 kg/ha/yr) (Table I). The maximum increase in the crude fibre content was observed with the application of copper (2.5 kg/ha/yr) and was 22.5% over the control, followed by 19.7% with the application of boron (5.0 kg/ha/yr) (Table I). The maximum increase in the total free amino acid content was observed with the application of manganese (5.0 kg/ha/yr) and was 24.8% over the control, followed by 24.5% with the application of molybdenum (5.0 kg/ha/yr) (Table I).

The significant improvement in these five qualitative parameters and substantial improvement in the remaining six qualitative parameters of mulberry leaves by the foliar application of micronutrients may be attributed to the fact that each micronutrient plays a significant role in specific physiological and biochemical processes of mulberry.

The improvement in the nutrient contents of mulberry leaves by the application of boron may be due to its association with phosphogluconates and its involvement in the metabolism and transport of carbohydrate, nucleic acid synthesis and phosphate utilisation (Pendias and Pendias, 1984).

The improvement in the quality of mulberry leaves by the application of copper may be attributed to the fact that copper, being the constituent of various oxidases, is involved in the photosynthesis, protein and carbohydrate metabolism and nitrogen fixation (Pendias and Pendias, 1984).

Iron showed a significant improvement in the biochemical parameters of mulberry leaves which might be due to its association with different proteins, dehydrogenase and its involvement in the photosynthesis, nitrogen fixation and chlorophyll formation (Pendias and Pendias, 1984).

Manganese showed a significant increase in the nutrient content of mulberry leaves which might be due to its association with many enzyme systems and its involvement in production of oxygen in chloroplasts and, indirectly, in nitrate reduction (Pendias and Pendias, 1984).

Table I. Effect of micronutrients on the biochemical parameters of the mulberry leaf.

Tableau I. Effet d'oligo-éléments sur les paramètres biochimiques de la feuille de mûrier.

Treatments *Traitements*	Moisture (%) *Eau (%)*	Total mineral (%) *Minéraux totaux (%)*	Reducing sugar (%) *Sucres réducteurs (%)*	Non reducing sugar (%) *Sucres non réducteurs (%)*	Total sugar (%) *Sucres totaux (%)*	Starch (%) *Amidon (%)*	Carbohydrate (%) *Hydrates de carbone (%)*	Soluble protein (%) *Protéines solubles (%)*	Crude fibre (%) *Fibres brutes (%)*	Crude protein (%) *Protéines brutes (%)*	Total free amino acids (µg/100 mg) *Acides aminés libres totaux (µg/100 mg)*
Control *Témoin*	73.57 (58.95)	9.90	1.74	7.90	9.64	12.33	21.97	7.92	11.59	22.58	94.36
Iron$_1$ *Fer$_1$*	74.39 (59.61)	10.26	1.86	9.23	11.09	13.33	24.42	9.68	11.36	23.00	105.56
Iron$_2$ *Fer$_2$*	74.61 (59.76)	9.97	1.81	9.29	11.10	14.11	25.21	10.37	12.14	22.59	99.38
Manganese$_1$ *Manganèse$_1$*	73.63 (59.11)	9.86	2.20	9.32	11.52	12.51	24.03	9.51	13.63	23.62	96.25
Manganese$_2$ *Manganèse$_2$*	73.62 (59.10)	10.43	2.05	9.45	11.50	11.68	23.18	9.62	11.82	23.54	117.80
Boron$_1$ *Bore$_1$*	74.03 (59.38)	10.24	2.05	9.55	11.60	12.46	23.72	10.94	13.44	22.63	93.13
Boron$_2$ *Bore$_2$*	73.43 (58.98)	10.28	2.04	9.66	11.60	12.91	24.51	9.85	13.87	23.47	90.20
Copper$_1$ *Cuivre$_1$*	74.04 (59.39)	10.37	2.00	9.58	11.62	12.67	24.29	9.88	14.20	24.38	97.55

Continued / *Suite page suivante*

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

Treatments *Traitements*	Moisture (%) *Eau (%)*	Total mineral (%) *Minéraux totaux (%)*	Reducing sugar (%) *Sucres réducteurs (%)*	Non reducing sugar (%) *Sucres non réducteurs (%)*	Total sugar (%) *Sucres totaux (%)*	Starch (%) *Amidon (%)*	Carbohydrate (%) *Hydrates de carbone (%)*	Soluble protein (%) *Protéines solubles (%)*	Crude fibre (%) *Fibres brutes (%)*	Crude protein (%) *Protéines brutes (%)*	Total free amino acids (µg/100 mg) *Acides aminés libres totaux (µg/100 mg)*
Copper$_2$ *Cuivre$_2$*	73.97 (59.35)	10.46	1.85	9.58	11.43	13.35	24.78	9.59	13.81	23.19	112.63
Zinc$_1$	73.56 (59.07)	10.28	1.83	9.73	11.56	13.33	24.89	9.71	12.91	23.80	113.43
Zinc$_2$	74.00 (59.36)	10.20	1.97	9.63	11.60	11.39	22.99	9.73	13.78	21.83	106.56
Molybdenum$_1$ *Molybdène$_1$*	74.44 (59.65)	10.19	1.98	10.03	12.01	13.33	25.34	9.55	11.95	23.72	112.96
Molybdenum$_2$ *Molybdène$_2$*	73.59 (59.09)	10.60	1.92	9.52	11.44	12.82	24.26	9.30	12.63	22.60	117.46
F	NS	NS	NS	**	**	NS	*	NS	*	NS	*
SE ±	-	-	-	0.309	0.328	-	0.689	-	0.722	-	7.097
CD at 5%	-	-	-	0.918	0.974	-	2.047	-	2.147	-	21.079

SE: Standard error / *Ecart type.*
NS: Not significant / *Non significatif.*
* Significant at 5% level / *Significatif au seuil de 5 %.*
** Significant at 1% level / *Significatif au seuil de 1 %.*
Values in parentheses represent the angular transformed values.
Les chiffres entre parenthèses représentent les transformées angulaires.

The significant qualitative improvement of mulberry leaves by the application of molydbenum may be attributed to the fact that molybdenum, being a constituent of nitrate reductase, nitrogenase, oxidase, etc., is involved in nitrogen fixation and nitrate reduction (Pendias and Pendias, 1984).

The significant improvement in the nutritional status of mulberry leaves by the application of zinc may be attributed to the fact that zinc, being the constituent of anhydrases, dehydrogenases, proteinases and peptidases, is involved in carbohydrate and protein metabolism (Pendias and Pendias, 1984).

The present investigation indicates that all the six micronutrients under study, namely, iron, zinc, copper, manganese, boron and molybdenum, significantly increased the contents of five biochemical parameters, i.e., non-reducing sugar, total sugar, carbohydrate, crude fibre, and total free amino acids, the remaining six biochemical parameters, namely, moisture, total mineral, reducing sugar, starch, soluble protein and crude protein, were substantially improved, though not statistically significantly, by the foliar application of all the six micronutrients under study.

REFERENCES

AOAC (1984) Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists Inc., USA, pp. 152, 153, 160.

JACKSON M.L. (1962) Soil Chemical Analysis. Prentice Hall Inc., New York, p. 183.

KRISHNASWAMI S., KUMARAJ S., VIJAYARAGHAVAN K., KASIVISWANATHAN K. (1971) Silkworm feeding trials for evaluating the quality of mulberry leaves as influenced by variety, spacing and nitrogen fertilization. Indian J. Seric., 9(1), 79-89.

LOKANATH R., SHIVASHANKAR K. (1986) Effect of foliar application of micronutrients and magnesium on the growth, yield and quality of mulberry (*Morus alba* L.). Indian J. Seric., 25(1), 1-5.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.I., RANDALL R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265.

PENDIAS A.K., PENDIAS H. (1984) Trace Elements in Soils and Plants. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.

PLUMMER D.J. (1971) An Introduction to Practical Biochemistry. Tata MacGrow Hill Publishing Company Ltd., Bombay and New Delhi.

ROY D., GUPTA B.K. (1974) Effect of micronutrients on the yield and chemical composition of mulberry leaf. *In* Annual Report. Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, p. 81-82.

VISWANATH A.P. (1979) Effect of foliar spray of micronutrients on the yield and quality of mulberry (*Morus alba* Linn.). M.Sc. Thesis, University of Agricultural Sciences, Bangalore.

EFFETS DE CERTAINS OLIGO-ELEMENTS SUR LES PARAMETRES BIOCHIMIQUES DE LA FEUILLE DE MURIER (*MORUS ALBA* L.)

P.C. BOSE*, N.R. SINGHIVI & R.K. DUTTA

Soil Science and Chemistry Laboratory, Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore - 570 008, Inde.

Une expérience a été réalisée afin d'étudier l'effet de l'application foliaire d'oligo-éléments à différentes concentrations sur les constituants biochimiques de la feuille de mûrier, variété K_2. L'expérience porte sur six oligo-éléments de deux doses chacun : le fer (2,5 et 5,0 kg/ha/an), le manganèse (2,5 et 5,0 kg/ha/an), le bore (2,5 et 5,0 kg/ha/an), le cuivre (2,5 et 5,0 kg/ha/an), le zinc (5,0 et 10,0 kg/ha/an) et le molybdène (2,5 et 5,0 kg/ha/an). L'analyse des données révèle que, sur les onze paramètres biochimiques, cinq paramètres – à savoir : les sucres non-réducteurs, les sucres totaux, les hydrate de carbone totaux, les fibres brutes et les acides aminés libres totaux – présentent une amélioration statistiquement significative par rapport au témoin. Les six autres paramètres, c'est-à-dire l'eau, les minéraux totaux, les sucres réducteurs, l'amidon, les protéines solubles et les protéines brutes, présentent également une amélioration par rapport au témoin, mais celle-ci n'est pas significative. Les contenus en sucres non-réducteurs, en sucres totaux, en hydrates de carbone totaux, en fibres brutes et en acides aminés libres totaux présentent respectivement des augmentations maximales avec l'application de molybdène (2,5 kg/ha/an), de cuivre (2,5 kg/ha/an) et de manganèse (5,0 kg/ha/an), soit des augmentations de 26,962 %, de 24,585 %, de 22,519 % et de 24,841 % par rapport au témoin.

INTRODUCTION

Krishnaswami et coll. (1971) ont observé que la croissance et le développement des larves de vers à soie *Bombyx mori* L., et les caractères économiques du cocon sont fortement influencés par le contenu nutritif des feuilles de mûrier. L'amélioration du rendement en feuilles par vaporisation foliaire d'oligo-éléments a été observée par quelques chercheurs (Ray et Gupta, 1974 ; Viswanath, 1979 ; Lokanath et Shivashankar, 1986), mais la documentation sur l'effet des oligo-éléments sur le contenu nutritionnel des feuilles de mûrier est extrêment rare et, de plus, seuls deux ou trois paramètres ont été étudiés. Les auteurs ont donc jugé utile d'entreprendre une étude de l'influence des oligo-éléments sur les constituants biochimiques des feuilles de mûrier.

MATERIELS ET METHODES

Cette étude a été réalisée au *Central Sericultural Research and Training Institute* de Mysore de 1987 à 1989. La variété de mûrier Kanva 2 a été cultivée à intervalles de 60 cm × 60 cm en terrain argileux gras de pH 7,80 à 8,55 et de conductivité électrique de 0,164 à 0,291 millimhoms/cm. L'expérience a été configurée selon la méthode des blocs aléatoires avec quatre réplicats. La taille des parcelles est de 6 m × 4,5 m avec soixante-dix plants.

* Adresse actuelle et correspondance : Central Sericultural Research and Training Institute, 29 B/B, Extension II, Gandhinagar, Jammu - 180 004, Inde.

L'expérience comporte six traitements de deux doses chacun : fer$_1$ (2,5 kg/ha/an) et fer$_2$ (5,0 kg/ha/an) sous la forme de sulfate de fer, manganèse$_1$ (2,5 kg/ha/an) et manganèse$_2$ (5,0 kg/ha/an) sous la forme de sulfate de manganèse, bore$_1$ (2,5 kg/ha/an) et bore$_2$ (5,0 kg/ha/an) sous la forme de borax, cuivre$_1$ (2,5 kg/ha/an) et cuivre$_2$ (5,0 kg/ha/an) sous la forme de sulfate de cuivre, zinc$_1$ (5,0 kg/ha/an) et zinc$_2$ (10 kg/ha/an) sous la forme de sulfate de zinc, molybdène$_1$ (2,5 kg/ha/an) et molybdène$_2$ (5,0 kg/ha/an) sous la forme de molybdate d'ammonium. Les traitements et le témoin (traité à l'eau distillée) ont été vaporisés en cinq doses égales sur des plants âgés de 40 jours, c'est-à-dire un mois après chaque récolte. La fumure conventionnelle de 300 kg N, 120 kg P_2O_5 et 120 kg K_2O par ha/an a été appliquée 20 jours après la taille de chaque culture. L'irrigation a été réalisée une fois tous les dix jours. Une dose basale de fumier de 20 tonnes/ha/an a été appliquée. La plantation a été taillée après chaque récolte, à raison de cinq récoltes par an.

Les paramètres de qualité (contenus en eau, en minéraux totaux, en sucres réducteurs, en sucres non-réducteurs, en sucres totaux, en amidon, en hydrates de carbone, en protéines solubles, en fibres brutes, en protéines brutes et en acides aminés libres totaux) de dix récoltes ont été évalués d'après les méthodes d'analyse chimique standard de l'AOAC (1984) pour les minéraux totaux, les fibres brutes et l'eau, d'après la méthode de Lowry (1951) pour les protéines solubles et d'après la méthode de Microkjeldahl (Jackson, 1962) pour les protéines brutes. Les sucres réducteurs, les sucres non-réducteurs, l'amidon, les hydrates de carbone et les acides aminés libres ont été déterminés d'après les méthodes de Plummer (1971).

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données révèlent que tous les paramètres biochimiques présentent une amélioration par rapport au témoin après application foliaire d'oligo-éléments (Tableau I) ; pour cinq d'entre eux (sucres non-réducteurs, sucres totaux, hydrates de carbone, fibres brutes et acides aminés libres totaux), l'amélioration par rapport au témoin est statistiquement significative (Tableau I).

Pour le contenu en sucre non-réducteurs, l'application de molybdène à 2,5 kg/ha/an donne l'augmentation maximale, soit 27,0 % par rapport au témoin, devant l'application de zinc à 5,0 kg/ha/an (23,0 %) (Tableau I). Pour le contenu en sucre totaux, l'application de molybdène à 2,5 kg/ha/an donne l'augmentation maximale, soit 24,5 % par rapport au témoin, devant l'application de cuivre à 2,5 kg/ha/an (20,5 %) (Tableau I). Pour le contenu en hydrates de carbone, l'augmentation est maximale avec l'application de molybdène à 2,5 kg/ha/an, soit 15,3 % par rapport au témoin, devant l'application de zinc à 5,0 kg/ha/an (13,3 %) (Tableau I). Pour le contenu en fibres brutes, l'augmentation est maximale avec l'application de cuivre à 2,5 kg/ha/an, soit 22,5 % par rapport au témoin, devant l'application de bore à 5,0 kg/ha/an (19,7 %) (Tableau I). Pour le contenu en acides aminés libres totaux, l'augmentation est maximale avec l'application de manganèse à 5,0 kg/ha/an, soit 24,8 % par rapport au témoin devant l'application de molybdène à 5,0 kg/ha/an (24,5 %) (Tableau I).

L'amélioration significative de cinq paramètres qualitatifs et l'amélioration sensible des six autres paramètres qualitatifs de la feuille de mûrier par application foliaire d'oligo-éléments pourraient être attribuées au fait que chacun des oligo-éléments joue un rôle significatif et spécifique dans les processus physiologiques et biochimiques du mûrier.

L'amélioration des contenus nutritifs de la feuille de mûrier par l'application de bore pourrait être due à son association avec les phosphogluconates et à son implication dans le métabolisme et le transport des hydrates de carbone, dans la synthèse des acides nucléiques et dans l'utilisation des phosphates (Pendias et Pendias, 1984).

L'amélioration de la qualité des feuilles de mûrier par l'application de cuivre peut être attribuée au fait que le cuivre, constituant de diverses oxydases, est impliqué dans le métabolisme de la photosynthèse, des protéines et des hydrates de carbone et dans la fixation de l'azote (Pendias et Pendias, 1984).

Le fer donne une amélioration significative des paramètres biochimiques de la feuille de mûrier, amélioration qui pourrait être due à son association avec différentes protéines et différentes déshydrogénases et à son implication dans la photosynthèse, la fixation d'azote et la formation de chlorophylle (Pendias et Pendias, 1984).

Le manganèse entraîne une augmentation significative du contenu nutritif de la feuille de mûrier, probablement du fait de son association avec des systèmes enzymatiques et de son implication dans la production d'oxygène dans les chloroplastes et, indirectement, dans la réduction d'azote (Pendias et Pendias, 1984).

L'amélioration significative de la qualité de la feuille de mûrier par l'application de molybdène peut être attribuée au fait que le molybdène, constituant de la nitrate-réductase, de la nitrogénase, des oxydases, etc., est impliqué dans la fixation d'azote et dans la réduction des nitrates (Pendias et Pendias, 1984).

L'amélioration significative de la valeur nutritive de la feuille de mûrier par l'application de zinc peut être attribuée au fait que le zinc, constituant des anhydrases, des déshydrogénases, des protéinases et des peptidases, est impliqué dans le métabolisme des hydrates de carbone et des protéines (Pendias et Pendias, 1984).

Cette étude indique que les six oligo-éléments considérés – c'est-à-dire le fer, le zinc, le cuivre, le manganèse, le bore et le molybdène – entraînent des améliorations significatives pour cinq paramètres biochimiques, à savoir les sucres non-réducteurs, les sucres totaux, les hydrates de carbone, les fibres brutes et les acides aminés libres totaux, tandis que, pour les six autres paramètres (eau, minéraux totaux, sucres réducteurs, amidon, protéines solubles et protéines brutes), l'amélioration par l'application foliaire des six oligo-éléments étudiés reste sensible même si elle n'est pas statistiquement significative.

EFFECT OF SOME GROWTH REGULATORS ON THE BIOCHEMICAL PARAMETERS OF MULBERRY (*MORUS ALBA* L.) LEAF UNDER RAINFED CONDITIONS

P.C. BOSE*, S.K. MAJUMDER & R.K. DUTTA**

Soil Science and Chemistry Laboratory, Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.

An experiment was conducted to study the effect of foliar application of different levels of some growth regulators on the biochemical constituents of mulberry leaf, variety K2, under rainfed conditions. The experiment comprised three growth regulators with three doses each, i.e., gibberellic acid (GA) 250, 500 and 1000 ppm; indole-3-acetic acid (IAA) 100, 250 and 500 ppm and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 10, 20 and 50 ppm. Analysis of data revealed that out of the eleven biochemical parameters, three parameters, i.e., moisture, reducing sugar and crude protein have statistically been significantly improved over control. The remaining eight parameters, i.e., total mineral, non-reducing sugar, total sugar, starch, carbohydrate, water soluble protein, crude fibre and total free amino acid have also been improved over control but were not statistically significant. The maximum increase in the contents of moisture, reducing sugar and crude protein was with the application of 2,4-D with 50 ppm, GA with 500 ppm and IAA with 250 ppm, respectively, which were 1.93%, 17.24% and 12.45% increase over control.

Keywords: Growth regulators, gibberellic acid (GA), indole-3-acetic acid (IAA), 2,4 - dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D), biochemical parameters, rainfed condition.

INTRODUCTION

Krishnaswami *et al.* (1971) observed that the growth and development of silkworm larvae, *Bombyx mori* L., and the economic characters of cocoon were greatly influenced by the nutritional content of mulberry leaves. The total area under mulberry cultivation in India is approximately 250 000 hectares, of which about 50% is under rainfed conditions. The nutritional status of mulberry leaves produced under rainfed conditions is inferior to that of irrigated mulberry. To get a good cocoon crop, the quality of the mulberry leaf under rainfed conditions has to be improved.

Till today, efforts have been made to improve the quality of mulberry leaf under rainfed conditions by the use of fertilizers, better management coupled with variety development and genetic improvement, but no effort has so far been made to improve the nutritional status of mulberry leaf under rainfed conditions through the application of growth regulators, which are simple, easy to use, required in small quantities and economic. Looking into the advantageous effects of these plant growth regulators on various crop plants in improving the crop quality (Kuraishi and Hashimoto, 1957; Mehta *et al.*, 1975), the present investigation was undertaken to make qualitative improvement of mulberry leaves under rainfed conditions.

* Present address and address for correspondence: Central Sericultural Research and Training Institute, 29 B/B, Extension-II, Gandhi Nagar, Jammu - 180 004, India.

**Present address: Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore - 742 101, West Bengal, India.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted at the Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, during 1989-91. Kanva-2 variety of mulberry was raised with a spacing of 90 cm × 90 cm on red loamy soil with a pH of 7.70 to 8.10, having an electrical conductivity of 0.117 to 0.203 dSm^{-1}. The experiment was laid in randomized block design with three replications. The plot size was 6.0 m × 6.0 m.

The experiment comprised three growth regulators with three doses each, i.e., gibberellic acid (250, 500 and 1000 ppm), indole-3-acetic acid (100, 250 and 500 ppm) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (10, 20 and 50 ppm). The treatments with a water spray as control were sprayed for five times in a year on the standing crop, one month before each harvest. Normal fertilization of 100 kg N, 50 kg P_2O_5 and 50 kg K_2O/ha/yr was provided in two split doses. Fifty kg N, 50 kg P_2O_5 and 50 kg K_2O were applied after 20 days of pruning in the first crop and the remaining 50 kg N was applied after the harvest of the second crop. A basal dose of farmyard manure (FYM) @ 10 MT/ha/yr was applied. Three replications/treatment were maintained. The mean of these three replications was considered as the representative of a crop or harvest. Five harvests or crops were taken in a year. The data of two years or ten crops are considered. Therefore, the means indicated in the table correspond to the means of ten crops. The plantation was once bottom-pruned during monsoon and leaf plucking and top clipping was practiced for the rest of the crops.

Quality parameters, i.e., moisture, total mineral, reducing sugar, non-reducing sugar, total sugar, starch, carbohydrate, soluble protein, crude fibre, crude protein and total free amino acid of ten crops, were estimated adopting the standard chemical analytical methods of AOAC (1984) for total mineral, crude fibre and moisture, Lowry's (1951) method for soluble protein and Microkjeldahl method (Jackson, 1962) for crude protein. Reducing sugar, non-reducing sugar, starch, carbohydrate and total free amino acid were determined by the methods of Plummer (1971).

RESULTS AND DISCUSSION

The data revealed that out of the eleven biochemical parameters under study, three quality parameters, i.e., moisture, reducing sugar and crude protein, have statistically significantly been improved over control (Table I) by the foliar application of 2,4-D (20 and 50 ppm) and GA (250, 500 and 1000 ppm); 2,4-D (10 and 20 ppm), IAA (100 ppm) and GA (250, 500 and 1000 ppm); and 2,4-D (20 and 50 ppm), IAA (250 and 500 ppm) and GA (250 and 500 ppm) respectively.

The maximum increase in the content of moisture being with the application of 2,4-D with 50 ppm, which was 1.93% over control, followed by 1.62% with the application of GA with 1000 ppm (Table I). The maximum increase in reducing sugar content being with the application of GA with 500 ppm, which was 17.24% over control followed by 7.76% with the application of GA with 250 ppm (Table I). The maximum increase in the content of crude protein being with the application of IAA with 250 ppm which was 12.45% over control followed by 7.88% with the application of GA with 500 ppm (Table I).

The significantly increased moisture content in the mulberry leaf was due to the stimulated water uptake (Devlin and Witham, 1986b). In the presence of auxins, the reducing sugars appear to build up due to the conversion of lipids. Auxin increases the invertase activity, thus suggesting that sucrose, which initially builds up from the lipid conversions, is hydrolysed rapidly to the osmotically active sugars, glucose and fructose (Devlin and Witham, 1986b) and the findings are in accordance with the reports of Devlin and Witham (1986a) where they have shown the increase of sugar content in sugar cane after the application of GA and auxins.

Sacher (1967), Dettertogh *et al.* (1965) and Broughton and McComb (1967) showed similar results regarding the significantly promoted synthesis of protein in a variety of plant tissues. Protein content was higher in 2,4-D (20 and 50 ppm) treated mulberry plants than in the control plants, which is similar to the results of Linser *et al.* (1965) and Santosh Kumari *et al.* (1990)) where they had used other growth retardants.

Plant growth regulators not only promote the growth but also inhibit the growth, if the concentration (dose) is higher or lower than the optimum one (Devlin and Witham, 1986c). The

Table I. Effect of growth regulators on the biochemical parameters of mulberry leaf

Tableau I. Effet des régulateurs de croissance sur les paramètres biochimiques de la feuille de mûrier.

Treatments *Traitements*	Moisture (%) *Humidité (%)*	Total mineral (%) *Minéraux totaux (%)*	Reducing sugar (%) *Sucres réducteurs (%)*	Non reducing sugar (%) *Sucres non réducteurs (%)*	Total sugar (%) *Sucres totaux (%)*	Starch (%) *Amidon (%)*	Carbohydrate (%) *Hydrates de carbone (%)*	Water soluble protein (%) *Protéines solubles (%)*	Crude fibre (%) *Fibres brutes (%)*	Crude protein (%) *Protéines brutes (%)*	Total free amino acid (µg/mg) *Acides aminés libres totaux (µg/mg)*
Control *Témoin*	67.78 (0.86)	10.25 (0.72)	1.16 (0.07)	12.63 (1.19)	13.79 (1.19)	9.00 (0.95)	22.79 (1.77)	6.63 (1.20)	13.44 (0.85)	16.62 (0.54)	1.37 (0.10)
2,4-D_1	67.62 (0.83)	10.38 (0.59)	1.23 (0.04)	14.00 (1.55)	15.23 (1.58)	10.27 (1.13)	25.50 (2.38)	7.73 (1.11)	13.55 (0.75)	16.31 (0.59)	1.45 (0.16)
2,4-D_2	68.16 (0.72)	10.75 (0.67)	1.23 (0.08)	13.59 (1.53)	14.82 (1.55)	10.44 (0.98)	25.26 (2.04)	6.91 (1.36)	15.48 (1.47)	16.84 (0.76)	1.46 (0.15)
2,4-D_3	69.09 (0.82)	10.88 (0.64)	1.13 (0.06)	12.77 (1.61)	13.90 (1.62)	8.63 (0.86)	22.53 (2.18)	5.78 (1.22)	14.81 (1.31)	16.93 (0.65)	1.37 (0.11)
IAA_1	67.44 (0.86)	9.63 (0.86)	1.20 (0.07)	12.65 (1.51)	13.85 (1.51)	9.82 (0.83)	23.67 (2.08)	6.59 (1.36)	14.94 (1.45)	16.47 (0.78)	1.39 (0.10)
IAA_2	67.61 (0.98)	10.38 (0.69)	1.16 (0.07)	12.16 (1.70)	13.32 (1.72)	10.02 (0.65)	23.34 (1.87)	6.86 (1.23)	13.83 (1.03)	18.69 (0.72)	1.34 (0.09)
IAA_3	67.81 (0.89)	10.63 (0.52)	1.14 (0.06)	11.40 (1.47)	12.54 (1.51)	8.92 (0.76)	21.46 (1.98)	6.61 (1.28)	13.43 (0.82)	16.85 (0.88)	1.26 (0.08)
GA_1	67.94 (0.77)	9.75 (0.63)	1.25 (0.06)	13.07 (1.44)	14.32 (1.46)	9.88 (1.18)	24.20 (2.06)	6.57 (1.19)	12.81 (0.83)	17.31 (0.90)	1.40 (0.11)
GA_2	68.67 (0.69)	10.00 (0.67)	1.36 (0.04)	12.59 (1.60)	13.95 (1.00)	9.80 (1.00)	23.75 (1.63)	7.14 (1.00)	13.21 (0.97)	17.93 (0.76)	1.45 (0.11)
GA_3	68.88 (0.85)	10.30 (0.52)	1.18 (0.05)	12.47 (1.00)	13.65 (1.61)	9.42 (0.92)	23.07 (2.05)	7.87 (1.08)	13.89 (1.05)	16.14 (0.75)	1.39 (0.10)
F	**	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS
S.E	± 0.28	-	± 0.04	-	-	-	-	-	-	± 0.54	-
C.D at 5 %	0.79	-	0.10	-	-	-	-	-	-	1.53	-

* Significant at 5 % level / *Significatif au seuil de 5 %.*
** Significant at 1 % level / *Significatif au seuil de 1 %.*
Values in parentheses represent the standard error of each mean value.
Les chiffres entre parenthèses représentent l'écart type de chaque valeur moyenne.

SE: Standard error / *Ecart type.*
NS: Non significant / *Non significatif.*

negative effects observed in a few cases in this experiment are due to the effectiveness of the growth regulators depending on the concentrations at which these were applied. This kind of variable results were also observed by Abdel-Rahman and Thompson (1969) and Alam and Islam (1989) which substantiate the present findings.

On the basis of the above findings, it can be concluded that 2,4-D (20 ppm) and GA (250 and 500 ppm) have promotive effects on all the three significantly improved biochemical parameters, i.e., moisture, reducing sugar and crude protein, of mulberry leaf over the control under rainfed conditions.

REFERENCES

ABDEL-RAHMAN M., THOMPSON B.D. (1969) Effect of some growth regulating substances on earliness and total yield of cantaloupe and water melon. Proc. Fla. State Hort. Soc., 82, 125-128.

ALAM S.M.M., ISLAM M. T. (1989) Effect of some growth regulators on growth, yield and chemical composition of potato. Indian J. Agric. Res., 23(1), 52-58.

AOAC (1984) Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists. Inc., USA, pp. 152, 153, 160.

BROUGHTON W.J., McCOMB A.J. (1967) The relation between cell-wall and protein synthesis in dwarf pea plants treated with gibberellic acid. Anal. Bot. N.S., 31, 359-366.

DE HERTOGH A.A., McCUNE D.C., BROWN J., ANTOINE D. (1965) The effect of antagonists of RNA and protein biosynthesis on IAA and 2,4-D induced growth of green pea stem sections. Contrib. Boyce Thompson Inst., 23, 23.

DEVLIN R.M., WITHAM F.H. (1986a) Gibberellins: *In* Plant physiology (Fourth Edition), PWS Publishers, USA, p. 408.

DEVLIN R.M., WITHAM F.H. (1986b) Gibberellins: *In* Plant physiology (Fourth Edition), PWS Publishers, USA, p. 424.

DEVLIN R.M., WITHAM F.H. (1986c) Physiological effects and mechanisms of auxin action. *In* Plant physiology (Fourth Edition), PWS Publishers, USA, p. 370.

JACKSON M.L. (1962) Soil chemical Analysis. Prentice-Hall Inc., New York, p. 183.

KRISHNASWAMI S., KUMARA RAJ S., VIJAYARAGHAVAN K., KASIVISWANATHAN K. (1971) Silkworm feeding trials for evaluation the quality of mulberry leaves as influenced by variety, spacing and nitrogen fertilization. Indian J. Seric., 9(1), 79-89.

KURAISHI S., HASHIMOTO (1957) Promotion of leaf growth and acceleration of stem elongation by gibberellin. Bot. Mag., 70, 86-92.

LINSER H., NEUMAN K.H., EL-DAMATY H. (1965) Preliminary investigation of the action of cycocel on the composition of the soluble N-fraction and the protein faction of young wheat plants. Nature, 206, 893.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.I., RANDALL R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265.

MEHTA P.M., PATEL R.J., Rao B.V.N. (1975) Effects of gibberellic acid, ascorbic acid, morphaotin and their combinations on amylase activity in *Cicer arietium*. Geobios, 2, 28-29.

PALEG L.G. (1960a) Physiological effects of gibberellic acid. I. on carbohydrate metabolism and amylase activity of barley endosperm. Plant Physiol., 35, 293.

PLUMMER D.J. (1971) An Introduction to Practical Biochemistry. Tata MacGrow Hill Publishing Company Limited, Bombay and New Delhi.

SACHER J.A. (1967) Control of synthesis of RNA and protein in subcellular fractions of *Rhoeo discolor* leaf sections of auxin and kinetin during senescence. Expt. Geront., 2, 261.

SANTOSH KUMARI, BHARTI S., KHAN M.I. (1990) Effect of cycocel on growth and metabolism of sunflower (*Helianthus annus* L.). Indian J. Agric. Res., 24(2), 87-93.

VARNER J.E., HO D.T. (1976) Hormones. *In* Plant Biochemistry, edited by J. Bonner and J.E. Varner, 3rd edition, Academic Press, New York.

YADAVA R.B.P., PATEL B.D. (1980) Effect of growth retardants on plant growth, yield and seed carbohydrates of bajra. For. Res., 6, 1975.

EFFET DE CERTAINS REGULATEURS DE CROISSANCE SUR LES PARAMETRES BIOCHIMIQUES DE LA FEUILLE DE MURIER (*MORUS ALBA* L.) EN REGIME PLUVIAL

P.C. BOSE*, S.K. MAJUMDER** & R.K. DUTTA

Soil Science and Chemistry Laboratory, Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore - 570 008, Inde.

Une expérience a été réalisée afin d'étudier les effets de l'application foliaire de régulateurs de croissance à différentes concentrations sur les composants biochimiques de la feuille de mûrier, variété K2, en régime pluvial. L'expérience porte sur trois régulateurs de croissance à trois concentrations différentes chacun : acide gibberellique (GA) à 250, 500 et 1000 ppm, acide indol-3-acétique (AIA) à 100, 250 et 500 ppm et acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) à 10, 20 et 50 ppm. L'analyse des données révèle que, sur les onze paramètres biochimiques, l'amélioration par rapport au témoin est statistiquement significative pour trois paramètres (l'eau, les sucres réducteurs et les protéines brutes). Les huit paramètres restants, c'est-à-dire les minéraux totaux, les sucres non réducteurs, les sucres totaux, l'amidon, les protéines solubles, les fibres brutes et les acides aminés totaux, présentent également une amélioration par rapport au témoin, mais cette amélioration n'est pas significative. On obtient l'augmentation maximale des contenus en eau, en sucres réducteurs et en protéines brutes avec l'application de 2,4-D à 50 ppm, de GA à 500 ppm et d'AIA à 250 ppm, respectivement, correspondant à des augmentations de 1,93 %, 17,24 % et 12,45 % par rapport au témoin.

INTRODUCTION

Krishnaswami et coll. (1971) ont observé que la croissance et le développement des larves du ver à soie *Bombyx mori* L. et les caractères économiques du cocon étaient fortement influencés par le contenu nutritif des feuilles de mûrier. La surface totale de culture du mûrier en Inde est d'environ 250 000 hectares, dont 50 % ne sont pas irrigués (régime pluvial). La valeur nutritive des feuilles de mûriers produites en régime pluvial est inférieure à celle des feuilles de mûriers irrigués. Si l'on veut obtenir une bonne récolte de cocons, il est nécessaire d'améliorer la qualité des feuilles de mûrier en régime pluvial.

Jusqu'à présent, des efforts ont été faits pour améliorer la qualité des feuilles de mûriers cultivés en régime pluvial par l'utilisation d'engrais, une meilleure gestion combinée avec le développement de nouvelles variétés et l'amélioration génétique, mais aucune étude n'a été réalisée sur l'amélioration de la valeur nutritionnelle des feuilles de mûriers cultivés sans irrigation par l'application de régulateurs de croissance, bien qu'ils soient faciles à utiliser et économiques car ils peuvent être utilisés en petites quantités. Etant donné les effets bénéfiques des régulateurs de croissance des végétaux sur diverses plantes cultivées par l'amélioration de la qualité des cultures (Kuraishi et Hashimoto, 1957 ;

* Adresse actuelle etcorrespondance : Central Sericultural Research and Training Institute, 29 B/B, Extension-II, Gandhi Nagar, Jammu - 180 004, Inde.

** Adresse actuelle : Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore - 742101, West Bengal, Inde.

Mehta et coll., 1975), cette étude a été entreprise afin d'améliorer la qualité des feuilles de mûriers cultivés sans irrigation.

MATERIELS ET METHODES

L'étude a été réalisée au *Central Sericultural Research and Training Institute* de Mysore de 1989 à 1991. Des plants de la variété de mûrier Kanva-2 ont été cultivés à un espacement de 90 cm × 90 cm en terrain argileux rouge de pH 7,70 à 8,10 et ayant une conductivité électrique de 0,117 à 0,203 dSm^{-1}. L'expérience a été réalisée selon la méthode des blocs aléatoires avec trois réplicats. La taille des parcelles est de 6,0 m × 6,0 m.

L'expérience porte sur trois régulateurs de croissance à trois concentrations différentes chacun : l'acide gibberellique (250, 500 et 1000 ppm), l'acide indol-3-acétique (100, 250 et 500 ppm) et l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (10, 20 et 50 ppm). Les traitements ainsi que l'eau distillée pour le témoin ont été vaporisés cinq fois par an sur les plants, un mois avant chaque récolte. La fumure habituelle de 100 kg N, 50 kg P_2O_5 et 50 kg K_2O/ha/an a été appliquée en deux doses égales. Cinquante kg N, 50 kg P_2O_5 et 50 kg K_2O ont été appliqués 20 jours après la taille de la première culture et les 50 kg N restants ont été appliqués après la récolte de la deuxième culture. Une dose basale de fumier (FYM) de 10 tonnes/ha/an a été appliquée. Trois réplicats/traitement ont été cultivés. La moyenne de ces trois réplicats est considérée comme étant représentative d'une culture ou récolte. Cinq récoltes ou cultures ont été réalisées par an. On a retenu les données obtenues sur deux ans ou dix récoltes. Les moyennes indiquées dans le tableau correspondent donc à la moyenne de dix récoltes. La plantation a été taillée à la base une fois au cours de la mousson et les feuilles ont été ramassées et les extrémités ont été étêtées pour les autres cultures.

Les paramètres qualitatifs (eau, minéraux totaux, sucres réducteurs, sucres non réducteurs, sucres totaux, amidon, hydrates de carbone, protéines solubles, fibres brutes, protéines brutes et acides aminés libres) de dix récoltes ont été estimés d'après les méthodes d'analyse chimique standard de l'AOAC (1984) pour les minéraux totaux, les fibres brutes et l'eau, d'après la méthode de Lowry (1951) pour les protéines solubles et d'après la méthode de Microkjeldahl (Jackson, 1962) pour les protéines brutes ; les sucres réducteurs, les sucres non réducteurs, l'amidon, les hydrates de carbone totaux et les acides aminés libres ont été déterminés d'après les méthodes de Plummer (1971).

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données révèlent que, sur les onze paramètres biochimiques étudiés, trois paramètres qualitatifs présentent une amélioration significative par rapport au témoin après application foliaire de régulateurs de croissance (Tableau I), ceux-ci sont : l'eau avec le 2,4-D (20 et 50 ppm) et le GA (250, 500 et 1000 ppm), les sucres réducteurs avec le 2,4-D (10 et 20 ppm), l'AIA (100 ppm) et le GA (250, 500 et 100 ppm) et les protéines brutes avec le 2,4-D (20 et 50 ppm), l'AIA (250 et 500 ppm) et le GA (250 et 500 ppm).

L'augmentation du contenu en eau est maximale après application de 2,4-D à 50 ppm, soit 1,93 %, suivi de l'application de GA à 1000 ppm, soit 1,62 % (Tableau I). L'augmentation du contenu en sucres réducteurs est maximale après application de GA à 500 ppm, soit 17,24 % par rapport au témoin, devant l'application de GA à 250 ppm, avec 7,76 % (Tableau I). L'augmentation du contenu en protéines brutes est maximale avec l'application d'AIA à 250 ppm, soit 12,45 % par rapport au témoin, devant l'application de GA à 500 ppm (Tableau I).

L'augmentation significative du contenu en eau des feuilles de mûrier est due à une stimulation de l'ingestion de l'eau (Devlin et Witham, 1986b). En présence d'auxines, il semble que les sucres réducteurs s'accumulent du fait de la conversion des lipides. L'auxine entraîne une augmentation de l'activité invertase, ce qui suggère que le sucrose, qui s'accumule initialement à partir de la conversion des lipides, est rapidement hydrolysé vers les sucres osmotiquement actifs, le glucose et le fructose (Devlin et Witham, 1986b) ; ces résultats sont en accord avec les observations de Devlin et Witham (1986a) faisant état d'une augmentation du contenu en sucre chez la canne à sucre après application de GA et d'auxines.

Sacher (1967), Dettertogh et coll. (1965) et Broughton et McComb (1967) ont présenté des résultats similaires pour ce qui concerne la promotion significative de la synthèse des protéines chez un certain nombre de tissus végétaux. Le contenu en protéines est plus élevé chez les plants de mûrier traités avec du 2,4-D (20 et 50 ppm) que chez les plants témoins, ce résultat étant comparable à ceux de Linser et coll. (1965) et de Santosh Kumari et coll. (1990) pour d'autres ralentisseurs de croissance.

Les régulateurs de croissance des plantes ne favorisent pas seulement la croissance mais peuvent également l'inhiber si la concentration (dose) est supérieure ou inférieure à l'optimum (Devlin et Witham, 1986c). Les effets négatifs observés dans certains cas ici sont dus à l'efficacité des régulateurs de croissance selon la concentration à laquelle ils ont été appliqués. Cette variabilité des résultats a également été observée par Abdel-Rahman et Thompson (1969) et Alam et Islam (1989), ce qui étaye les résultats présentés ici.

Sur la base des résultats décrits ci-dessus, on peut conclure que le 2,4-D (20 ppm) et le GA (250 et 500 ppm) ont des effets promoteurs sur trois paramètres biochimiques foliaires, pour lesquels l'amélioration est statistiquement significative en régime pluvial, à savoir : l'eau, les sucres réducteurs et les protéines brutes.

EVALUATION OF EIGHT MULBERRY GERMPLASM VARIETIES BY LEAF BIOCHEMICAL AND BIOASSAY MOULTING STUDIES

U.D. BONGALE & CHALUVACHARI

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

Six varieties of ***Morus indica*** *L., i.e., Mysore Local, Berhampore-S_1, Kanva-2, S_{36}, DD, RFS-175, and two of* ***Morus alba*** *L., i.e., KNG and English Black, (all the eight being diploid) maintained in the germplasm bank of KSSRDI were studied for moisture content, total protein, soluble protein, sugars, and chlorophyll contents of the leaf using tender leaves harvested on the 45th day after pruning during the years 1990-1991. Bioassay studies were simultaneously conducted by moulting test. Observations revealed significant differences between varieties. The poor performance of moulting ratio and larval weight in Mysore Local variety was associated with lower leaf moisture content and moisture retention. The higher protein content of leaf favoured higher larval weight, as recorded with KNG and RFS-175. The variation with respect to sugar content was considerably narrow.*

Keywords: Mulberry, silkworm, biochemical, bioassay, leaf quality.

INTRODUCTION

Growth and development of the silkworm (*Bombyx mori* L.) and the cocoon crop yields are influenced largely by the varietal differences and nutritional quality of mulberry (*Morus* spp.) leaf used as feed (Parpiev, 1968; Krishnaswami *et al.*, 1970; Petkov and Mircheva, 1979). A number of reports are available on the varietal differences and influence of agronomical inputs on the leaf yields of mulberry both from India and elsewhere (Krishnaswami *et al.*, 1971; Petkov, 1980; Koul *et al.*, 1979). However, information on biochemical leaf quality evaluation of mulberry varieties is extremely scanty.

MATERIALS AND METHODS

Eight diploid varieties, i.e., Mysore Local (traditional variety), Kanva-2 and Berhampore-S_1 (popular improved varieties), S_{36}, DD and RFS-175 (high-yielding varieties), and KNG and English Black (temperate varieties) maintained in the germplasm bank (GPB) of the Institute under uniform cultural operations following the standard methods of GPB maintenance were selected for the present study. Among these, the first six belonged to *M. indica* L. and the latter two belonged to *M. alba* L. (Linnaeus, 1753; Hooker, 1888). The tender leaves were collected at 45 days after pruning from five randomly selected plants for each variety. The leaves thus collected were dried at 65-70 °C, powdered and preserved for biochemical analysis. Leaf samples in triplicate were used for estimation of total protein, soluble protein, total sugars, and chlorophyll content by standard biochemical methods using a UV-365 model Shimadzu spectrophotometer and an automatic nitrogen analyser (Kjeltech system) for 4 crops taken at the periodicity of 2 crops per annum during 1990-91.

The bioassay by moulting test up to the second moult was simultaneously conducted with 100 larvae each, using NB_{18} pure bivoltine race for the third and fourth crops. Tender leaves were fed

under optimal conditions of rearing (Krishnaswami, 1978), following the continuous feeding method (Takeuchi, 1961). Observations on the moulting ratio, larval weight, larval period, and moulting period were recorded separately for the first and second moult. The moulting ratio was calculated as percentage of the out-of-moult larvae from the starting to the end of the preparatory stage at an interval of two hours. The weight of 100 larvae was recorded as the cumulative weight of larvae out of moult. Observations on moisture retention were recorded with chopped leaves (1 cm^2) for all the varieties under rearing conditions at intervals of 4, 8, 12, and 24 hours. The leaf moisture content was also recorded.

Table I. Leaf biochemical evaluation of mulberry varieties.

Tableau I. Evaluation des paramètres biochimiques de la feuille chez huit variétés de mûrier.

	Moisture content (%) *Contenu en eau (%)*	Total protein (%) *Protéines totales (%)*	Soluble protein (%) *Protéines solubles (%)*	Total sugar (%) *Sucres totaux (%)*	Chl. *a* (mg/g) *Chl.* a *(mg/g)*	Chl. *b* (mg/g) *Chl.* b *(mg/g)*	Total chlorophyll (mg/g) *Chlorophylle totale (mg/g)*
Varieties / *Variétés*							
Mysore Local	73.27	30.64	23.18	13.12	1.73	0.85	2.58
Berhampore-S_1	74.01	34.25	22.87	12.22	2.01	1.14	3.15
Kanva-2	73.86	28.67	21.86	12.91	1.66	0.82	2.48
S_{36}	73.52	32.62	22.22	12.60	1.70	0.84	2.55
DD	74.20	32.95	23.25	11.31	1.82	1.08	2.90
RFS-175	73.06	31.96	23.69	11.95	1.65	0.76	2.50
KNG	74.60	34.47	24.37	12.26	1.73	1.01	2.74
English Black	74.60	31.30	23.12	9.27	1.75	0.96	2.72
CD at 5%	-	-	0.63	0.34	0.02	0.12	0.06
CD at 1%	-	-	0.83	0.44	0.03	0.15	0.08
Crops / *Récoltes*							
Crop I / *1ère récolte*	73.25	35.24	25.32	14.07	1.79	1.27	3.12
Crop II / *2e récolte*	74.48	32.45	22.94	11.26	1.38	0.82	2.21
Crop III / *3e récolte*	72.45	31.69	20.64	11.56	2.55	0.87	3.14
Crop IV / *4e récolte*	75.38	29.05	23.38	10.91	1.29	0.76	2.06
CD at 5%	1.80	2.80	0.45	0.24	0.02	0.08	0.04
CD at 1%	2.45	3.81	0.58	0.31	0.02	0.11	0.06

Moisture content is calculated based on the fresh leaf weight while all other parameters are based on a dry weight. The above data are pooled from four crops (crop I: April 1990, crop II: October 1990, crop III: April 1991 and crop IV: October 1991), during which respective samples were collected.

Le contenu en humidité est calculé sur la base du poids frais des feuilles tandis que tous les autres paramètres sont basés sur le poids sec.

Les données présentées ci-dessus ont été obtenues sur quatre récoltes (1ère récolte : avril 1990, 2e récolte : octobre 1990, 3e récolte : avril 1991, 4e récolte : octobre 1991), au cours desquelles les échantillons correspondants ont été prélevés.

The data were statistically analysed and the results presented in the form of leaf biochemical parameters (individually for the four crops and as pooled data), bioassay moulting data for the third and fourth crops and leaf moisture retention for the fourth crop.

RESULTS

I. Leaf biochemical constituents (Tables I-IV):

The pooled data of the four crops revealed that the varieties exhibited significant differences with respect to soluble protein, total sugar and chlorophyll contents. The moisture content did not differ much among the varieties (73.1% to 74.6%) while the total protein content differed considerably from 28.7% in Kanva-2 to 34.3% (Berhampore-S_1) and 34.5% (KNG). The KNG variety also recorded the highest soluble protein content which, along Berhampore-S_1, Mysore Local, DD, RFS-175 and English Black (24.37% to 22.87%) differed significantly with Kanva-2 and S_{36} varieties (21.86% and 22.2% soluble protein content, respectively).

Table II. Leaf biochemical evaluation of mulberry varieties (individual crops).

Tableau II. Evaluation des paramètres biochimiques de la feuille chez huit variétés de mûrier (récoltes individuelles).

Varieties	Soluble protein (%)				Total sugars (%)			
	Crop I	Crop II	Crop III	Crop IV	Crop I	Crop II	Crop III	Crop IV
Variétés	*Protéines solubles (%)*				*Sucres totaux (%)*			
	Récolte 1	*Récolte 2*	*Récolte 3*	*Récolte 4*	*Récolte 1*	*Récolte 2*	*Récolte 3*	*Récolte 4*
Mysore Local	25.76	26.52	18.82	21.81	14.89	12.86	11.94	12.78
Berhampore-S_1	25.94	23.83	18.98	22.73	14.00	10.70	11.51	12.68
Kanva-2	21.40	24.04	19.30	22.69	13.17	13.42	13.27	11.76
S_{36}	21.01	22.64	19.74	25.47	15.69	13.50	10.36	10.84
DD	25.59	23.20	20.18	23.92	14.09	11.00	10.08	10.05
RFS-175	24.28	22.95	21.45	26.10	14.49	11.04	13.11	9.14
KNG	27.54	22.77	24.05	22.94	14.69	11.51	12.95	9.88
English Black	31.07	17.48	22.62	21.32	11.58	6.02	9.39	10.15
CD at 1%	1.676	2.362	1.667	1.564	0.594	1.474	0.599	0.045

The English Black variety had a significantly lower total sugar content (9.27%) and differed significantly from all other varieties (11.31% in DD to 13.12% in Mysore Local variety).

The chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and total chlorophyll (2.01, 1.14 and 3.15 mg/g, respectively) were highest in Berhampore-S_1, and the varietal differences were significant.

Observations on individual crops also revealed a high level of significance in the varietal differences with respect to all the four crops studied.

Table III. Leaf biochemical evaluation of mulberry varieties (individual crops).

Tableau III. Evaluation des paramètres biochimiques de la feuille chez huit variétés de mûrier (récoltes individuelles).

Varieties	Chlorophyll *a* (mg/g)				Chlorophyll *b* (mg/g)				Total chlorophyll (mg/g)			
	Crop I	Crop II	Crop III	Crop IV	Crop I	Crop II	Crop III	Crop IV	Crop I	Crop II	Crop III	Crop IV
Variétés	*Chlorophylle* a *(mg/g)*				*Chlorophylle* b *(mg/g)*				*Chlorophylle totale (mg/g)*			
	Récolte 1	*Récolte 2*	*Récolte 3*	*Récolte 4*	*Récolte 1*	*Récolte 2*	*Récolte 3*	*Récolte 4*	*Récolte 1*	*Récolte 2*	*Récolte 3*	*Récolte 4*
Mysore Local	1.80	1.30	2.50	1.32	1.18	0.65	0.79	0.78	2.97	1.95	3.29	2.10
Berhampore-S_1	1.89	1.48	3.25	1.42	1.44	0.96	1.16	0.99	3.33	2.44	4.41	2.41
Kanva-2	1.40	1.38	2.52	1.34	0.73	0.85	0.86	0.85	2.13	2.24	3.38	2.18
S_{36}	1.79	1.37	2.47	1.17	1.16	0.81	0.80	0.59	2.94	2.18	3.26	1.78
DD	1.94	1.44	2.61	1.30	1.85	0.86	0.89	0.69	3.79	2.32	3.51	2.00
RFS-175	1.90	1.35	2.04	1.33	1.42	0.73	0.57	0.74	3.32	2.08	2.61	2.06
KNG	1.88	1.37	2.43	1.25	1.63	0.85	0.82	0.71	3.51	2.22	3.25	1.96
English Black	1.80	1.41	2.59	1.21	1.20	0.86	1.05	0.75	2.99	2.27	3.64	1.95
CD at 1%	0.0359	0.0408	0.1128	0.0567	0.1508	0.1306	0.0715	0.0413	0.1599	0.1546	0.1546	0.0826

Table IV. Leaf moisture retention of mulberry varieties for crop IV.

Tableau IV. Rétention de l'eau dans les feuilles en fonction des variétés de mûrier pour la récolte 4.

Varieties	Moisture content (%)	Moisture retention (%) at			
		4 hours	8 hours	12 hours	24 hours
Variétés	*Contenu en eau (%)*	*Rétention de l'eau (%) à*			
		4 heures	*8 heures*	*12 heures*	*24 heures*
Mysore Local	72.93	78.35	66.93	56.35	45.10
Berhampore-S_1	74.47	85.62	74.97	63.49	53.00
Kanva-2	74.53	85.85	74.31	63.40	51.20
S_{36}	71.87	85.10	74.31	63.45	49.00
DD	75.07	85.73	74.62	63.66	52.40
RFS-175	74.93	85.98	77.18	66.17	57.40
KNG	74.63	85.68	75.37	65.26	53.40
English Black	75.87	85.69	74.86	63.25	52.20
CD at 5%	1.07	1.69	1.96	2.29	1.49
CD at 1%	1.48	2.33	2.70	3.16	2.05

The moisture retention was calculated based on leaf moisture content at 24 hours of preservation, while the retention values for 4 hours, 8 hours and 12 hours are based on the fresh weight.
La rétention de l' eau a été déterminée sur la base du contenu en eau des feuilles après 24 heures de conservation, tandis que les valeurs de rétention à 4 heures, 8 heures et 12 heures sont basées sur le poids frais.

II. Observations on bioassay by moulting test (Tables V and VI):

In crop III, the Kanva-2, S_{36} and English Black varieties recorded higher moulting ratios of 64-77 and 54-72 in the first and second moults, respectively. In addition to the higher moulting ratios, the larval weight was higher in RSF-175 and KNG both in the first and second moults, while the DD variety also recorded a higher larval weight. The Mysore Local variety recorded the lowest value of larval weight and lower moulting ratios in both moults (Fig. 1A and 1B).

In crop IV (Fig. 2A and 2B), in accordance with the observations on crop III, the Mysore Local variety recorded the lowest values of moulting ratios associated with lower values of larval weight in both moults. In addition, the Kanva-2 and S_{36} varieties recorded a lower weight both at the first and second moult, which, however, was associated with a higher moulting ratio during the second moult (90-100). The English Black variety, on the other hand, recorded higher values of moulting ratio and larval weight at both moults.

DISCUSSION

The performance of the Mysore Local variety was distinctly poor with the moulting test in both crops under study. In the third crop, the highest values of larval weight recorded in KNG variety in both moults was associated with the highest values of soluble protein and total protein content. Similarly, in the fourth crop, RFS-175, which had the highest values of soluble protein, recorded a higher larval weight in the second moult.

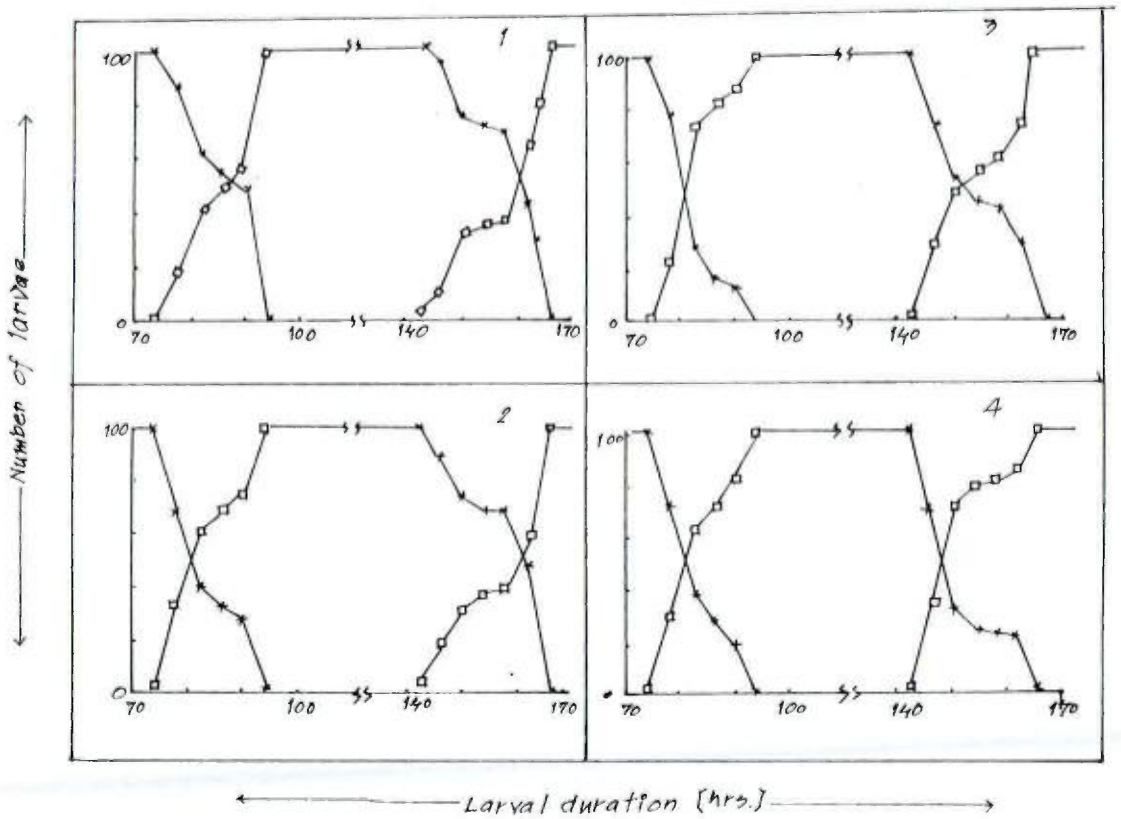

Fig. 1A: Mulberry varieties on moulting behaviour of silkworms, crop III.

Fig. 1A : Comportement de mue des vers à soie en fonction des variétés de mûrier, récolte 3.

□——□ Percentage of larvae out of moult / *Pourcentage de larves sorties de mue.*

x——x Percentage of larvae not out of moult / *Pourcentage de larves non sorties de mue.*

1: Mysore Local. **2:** Berhampore-S_1. **3:** Kanva-2. **4:** S_{36}.

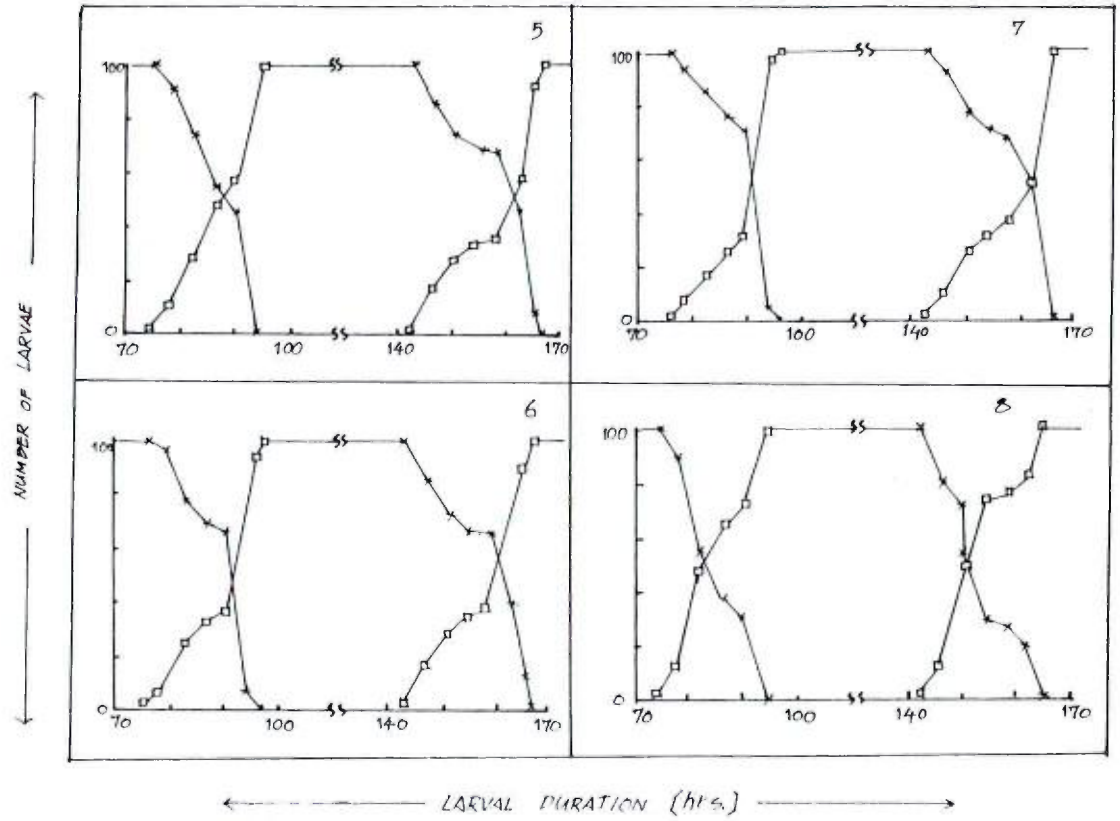

Fig. 1B: Mulberry varieties on moulting behaviour of silkworms, crop III.

Fig. 1B : Comportement de mue des vers à soie en fonction des variétés de mûrier, récolte 3.

□——□ Percentage of larvae out of moult / *Pourcentage de larves sorties de mue.*

x——x Percentage of larvae not out of moult / *Pourcentage de larves non sorties de mue.*

5: DD. 6: RFS-175. 7: KNG. 8: English Black.

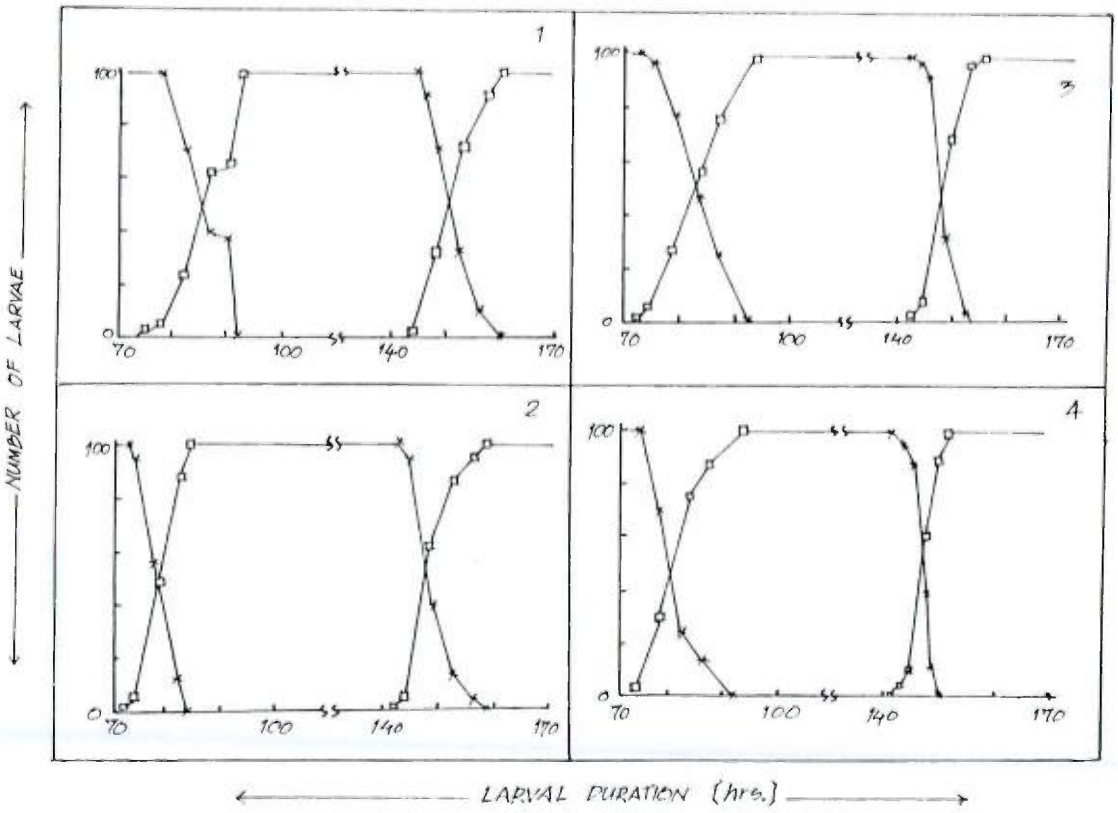

Fig. 2A: Mulberry varieties on moulting behaviour of silkworms, crop IV.

Fig. 2A : Comportement de mue des vers à soie en fonction des variétés de mûrier, récolte 4.

□——□ Percentage of larvae out of moult / *Pourcentage de larves sorties de mue.*

x——x Percentage of larvae not out of moult / *Pourcentage de larves non sorties de mue.*

1: Mysore Local. **2:** Berhampore-S_1. **3:** Kanva-2. **4:** S_{36}.

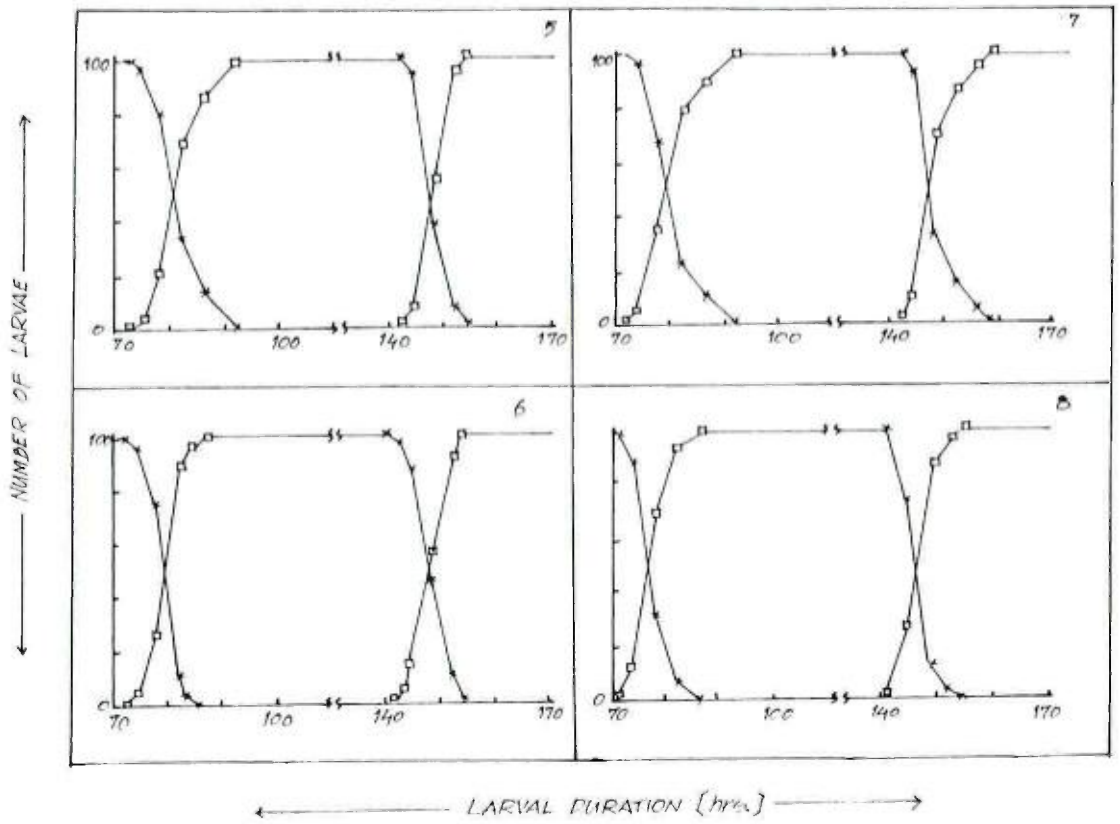

Fig. 2B: Mulberry varieties on moulting behaviour of silkworms, crop IV.

Fig. 2B : Comportement de mue des vers à soie en fonction des variétés de mûrier, récolte 4.

□———□ Percentage of larvae out of moult / *Pourcentage de larves sorties de mue.*

x———x Percentage of larvae not out of moult / *Pourcentage de larves non sorties de mue.*

5: DD. 6: RFS-175. 7: KNG. 8: English Black.

The poor moulting ratios and lower larval weight in Mysore Local variety, were not in accordance with the leaf biochemical components recorded. However, Mysore Local variety recorded lower values of leaf moisture content (72.93% compared to 74.5% to 74.6% in Berhampore-S_1, Kanva-2 and KNG to 75.9% in English Black) and was associated with the highest values of leaf moisture loss at 4, 8, 12 and 24 hours. The lowest moisture retention of 45.1% at 24 hours in the Local variety was followed by S_{36} and Kanva-2 (49.0% and 51.2%, respectively). Accordingly, the S_{36} (which also had the lowest values of 71.9% moisture in the leaves fed to silkworms) and Kanva-2 varieties recorded a lower larval weight both at first and second moults. The higher moulting ratios recorded by these two varieties were in accordance with the higher moisture retention values compared to the Local variety at different intervals of observation (Table IV). The English Black variety, which differed distinctly from the Mysore Local variety (with respect to higher values of moulting ratios and larval weight at both moults), also recorded a higher moisture content and moisture retention at all the intervals.

Table V. Bioassay moulting test for mulberry varieties (moulting test period for crop III: April 1991).

Tableau V. Test de mue par essais biologiques des variétés de mûrier (période du test de mue pour la récolte 3 : avril 1991).

Varieties	First moult			Second moult			Larval period up to 2nd moult
	Moulting ratio at 10 hr	Wt. of single larva (mg)	Moulting period (hr)	Moulting ratio at 10 hr	Wt. of single larva (mg)	Moulting period (hr)	
Variétés	*Première mue*			*Deuxième mue*			*Durée larvaire jusqu'à la 2e mue*
	Taux de mue à 10 h	*Poids d'une larve (mg)*	*Durée de mue (h)*	*Taux de mue à 10 h*	*Poids d'une larve (mg)*	*Durée de mue (h)*	
Mysore Local	43	3.38	20	31	20.33	24	166
Berhampore-S_1	63	3.95	20	33	22.72	24	166
Kanva-2	77	3.99	20	54	22.79	24	166
S_{36}	69	4.09	20	72	21.82	24	166
DD	42	4.90	20	32	24.59	24	166
RFS-175	30	4.54	22	34	26.01	24	166
KNG	19	4.67	20	30	26.50	24	166
English Black	64	4.25	20	70	23.00	22	164

The leaf chlorophyll content is indicative of the photosynthetic efficiency of a plant system. However, in the present study the significant differences with respect to chlorophyll content among the varieties were not reflected in the biochemical constituents possibly because of the optimum levels of cultivation and maintenance followed.

Studies conducted for evaluation of mulberry leaves from farmers' fields revealed greater variations of sugar contents (5%-17%) and soluble protein content (10%-26%) from among the samples collected from Kolar District, Bangalore District and the Western Ghats region of Karnataka

(Bongale *et al.*, 1993). In contrast to this, the leaf quality evaluation in the present study reveals a greater uniformity in the nutritive components; this is reflected in the larval weight recorded here. In another study carried out, it has been interestingly observed that the Kanva-2 and S_{36} varieties showed consistently higher sugar contents over a longer growth period which was reflected in a better moulting ratio compared to the S_{41} and Mysore Local varieties. The S_{41} variety with higher soluble protein content and lower sugar content gave a higher larval weight and lower moulting ratios (Chaluvachari and Bongale, 1994).

Table VI. Bioassay moulting test for mulberry varieties (moulting test period for crop IV: October 1991)

Tableau VI. Test de mue par essais biologiques en fonction des variétés de mûrier (période du test de mue pour la récolte 4 : octobre 1991).

Varieties	First moult			Second moult			Larval period up to 2nd moult
	Moulting ratio at 10 hr	Wt. of single larva (mg)	Moulting period (hr)	Moulting ratio at 10 hr (mg)	Wt. of single larva	Moulting period (hr)	
Variétés	*Première mue*			*Deuxième mue*			*Durée larvaire jusqu'à la 2e mue*
	Taux de mue à 10 h	*Poids d'une larve (mg)*	*Durée de mue (h)*	*Taux de mue à 10 h*	*Poids d'une larve (mg)*	*Durée de mue (h)*	
Mysore Local	6	5.8	20	54	38.4	16	162
Berhampore-S_1	71	6.2	12	81	40.9	16	158
Kanva-2	42	5.8	22	90	38.6	14	154
S_{36}	59	6.1	18	100	38.3	10	150
DD	43	6.5	20	87	41.5	12	154
RFS-175	60	5.9	14	79	49.4	14	154
KNG	60	5.5	22	77	41.2	16	158
English Black	86	6.9	16	94	50.0	14	152

The information available on the leaf biochemical evaluation associated with bioassay studies is very scanty. The higher values of protein and sugar in the feed are known to favour better performance of silkworm larval growth and their cocoon crop (Legay, 1958; Ito, 1960; Horie, 1980). Similarly, in the present study also, the varieties with a higher protein content (English Black, RFS-175, KNG) recorded a higher larval weight. Saratchandra *et al.* (1992) reported the superiority of S_{36}, C_{776} and RFS-135 over English Black, Sujanpur-5 and C_{799} varieties with respect to rearing performance. A number of studies have been carried out on the importance of leaf moisture content in the evaluation of its feed quality (Narayanaprakash *et al.*, 1985). Parpiev (1968) also reported that the higher moisture content of leaves favoured the palatability of the feed as also the assimilability of the nutrients in the food. He also concluded that the water content in the leaves may serve as one of the criteria in estimating their quality. Similarly, in the present study, even though wide variations in the leaf sugar content were not recorded among the varieties, the Mysore Local variety with a low leaf moisture

content and low leaf moisture retention gave an inferior performance in silkworms as compared to other varieties. The English Black variety, on the other hand, with a high leaf moisture content and high moisture retention capacity at different stages of preservation exhibited a better performance in respect of moulting ratio and larval weight.

It is concluded that the varieties under study exhibited significant differences with respect to leaf quality. Of the leaf quality parameters studied, the leaf moisture content and retention as well as protein content were found to be of greater nutritive value to silkworms.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are thankful to Dr S.B. Dandin, Director, KSSRDI, for the facilities and encouragement, and to Sri M.N. Anantharaman, Statistician, and other colleagues for their help in carrying out the work.

REFERENCES

BONGALE U.D., CHALUVACHARI, LINGAIAH, RAO B.V.N., MALLIKARJUNAPPA R.S. (1993) Leaf quality evaluation of mulberry gardens in Karnataka. Trends in Life Sciences (India), 8(1), 33-37.

CHALUVACHARI G., BONGALE U.D. (1994) Leaf quality evaluation of selected mulberry genotypes by biochemical and bioassay studies. Proc. Conf. on Cytol. and Genet., 4, 121-124.

HOOKER J.D. (1888) The Flora of British India. 5, 491-493.

HORIE Y. (1980) Recent advances in sericulture. Ann. Rev. Entomol., 25, 49-71.

ITO T. (1960) Effect of sugars on feeding of the silkworm, *Bombyx mori* L. J. Ins. Physiol., 5, 95-107.

KRISHNASWAMI S. (1978) New technology of silkworm rearing. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, Bulletin No. 2.

KRISHNASWAMI S., NOAMANI M.K.R., ASAN M. (1970) Studies on the quality of mulberry leaves and silkworm cocoon production. Part I. Quality differences due to varieties. Indian J. Seric., 9(1), 1-10.

KRISHNASWAMI S., KUMARARAJ S., VIJAYARAGHAVAN K., KASIVISWANATHAN K. (1971) Silkworm feeding trials for evaluating the quality of mulberry leaves as influenced by variety, spacing and nitrogen. Indian J. Seric., 10(1), 79-86.

KOUL O., TIKKU K., SAXENA B.P., ATAL C.K. (1979) Growth and silk production in *Bombyx mori* fed on three different varieties of mulberry (*Morus alba*). Indian J. Seric., 18(1), 1-15.

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

LINNAEUS C. (1753) Species Plantarum. London, p. 986.

NARAYANAPRAKASH R., PRESIWAMI K., RADHAKRISHNA (1985) Effect of dietary water content on food utilization and silk production in *Bombyx mori* L. (Lepidoptera, Bombycidae). Indian J. Seric., 24, 12-17.

PARPIEV B.A. (1968) Water metabolism in silkworm fed with a different mulberry strain changing diet. Shelk, 39, 15-17.

PETKOV M. (1980) Investigations on the utilization of mulberry leaves of different varieties under different feeding norms and seasons of silkworm feeding. II. Experiments of mulberry leaves per unit of production and its repayment by summer and fall silkworm feeding. Animal Sci., 17, 86-92.

PETKOV M., MIRCHEVA D. (1979) The composition and digestibility of nutrients in leaves of different mulberry varieties in silkworm trials, summer and autumn silkworm feeding. Zhivotnov D Nauki, 16(4), 113-117.

SARATCHANDRA B., RAJANNA L., PHILOMENA K.L., PARAMESHA G., RAMESH S.P., JAYAPPA T., SABITHA M.G. (1992) An evaluation of elite mulberry varieties for yield and quality through bioassay. Sericologia, 32(1), 127-134.

TAKEUCHI Y. (1961) Studies on the effect of nutrition on the moulting in the silkworm (*Bombyx mori* L.). Bull. Seric. Exp. Sta., 17(1), 83-89.

EVALUATION DE HUIT VARIETES DE MURIER ISSUES D'UNE BANQUE GENETIQUE PAR ETUDE DES PARAMETRES BIOCHIMIQUES DE LA FEUILLE ET DU COMPORTEMENT DE MUE DES VERS A SOIE

U.D. BONGALE & CHALUVACHARI

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

Six variétés de ***Morus indica*** *L. (Mysore Local, Berhampore-S_1, Kanva-2, S_{36}, DD, RFS-175) et deux variétés de* ***Morus alba*** *L. (KNG et English Black), toutes diploïdes, conservées à la banque génétique du KSSRDI ont été étudiées afin d'évaluer le contenu de la feuille en eau, en protéines totales, en protéines solubles, en sucre et en chlorophylle chez des feuilles tendres récoltées 45 jours après la taille en 1990 et 1991. Des essais biologiques ont été réalisés simultanément par test de mue chez les vers à soie. Les observations révèlent des différences significatives entre les variétés. La performance médiocre pour le taux de mue et le poids larvaire obtenue avec la variété Mysore Local s'associe avec un contenu faible en eau et en rétention d'eau. Une teneur élevée en protéines entraîne une augmentation du poids larvaire, comme cela a été observé avec KNG et RFS-175. La variation observée pour le contenu en sucre est très faible.*

INTRODUCTION

La croissance et le développement du ver à soie *Bombyx mori* L. et le rendement en cocons sont fortement influencés par les différences variétales et la qualité nutritive des feuilles de mûrier (*Morus* spp.) utilisées pour son alimentation (Parpiev, 1968 ; Krishnaswami et coll., 1970 ; Petkov et Mircheva, 1979). Il existe un certain nombre de travaux sur les différences variétales et sur l'influence des apports agronomiques sur les rendements en feuilles chez les mûriers d'Inde et d'autres pays (Krishnaswami et coll., 1971 ; Petkov, 1980 ; Koul *et al.*, 1979). Cependant, on dispose de très peu d'informations sur l'évaluation de la qualité biochimique foliaire des variétés de mûrier.

MATERIELS ET METHODES

Huit variétés diploïdes, comprenant Mysore Local (variété traditionnelle), Kanva-2 et Berhampore-S_1 (variétés communes améliorées), S_{36}, DD et RFS-175 (variétés performantes), et KNG et English Black (variétés tempérées), conservées à la banque génétique (GPB) de notre Institut et cultivées de manière identique suivant les méthodes standard d'entretien GPB, ont été sélectionnées pour cette étude. Parmi celles-ci, les six premières appartiennent à *Morus indica* L. et les deux autres à *Morus alba* L. (Linnaeus, 1753 ; Hooker, 1888). Des feuilles tendres ont été prélevées 45 jours après la taille sur cinq plants sélectionnés au hasard de chacune des variétés. Les feuilles ainsi prélevées ont été séchées à 65-70 °C, pulvérisées et conservées en vue d'une analyse biochimique. Les échantillons de feuilles, répartis en trois réplicats, ont été utilisés pour l'estimation des protéines totales, des protéines solubles, des sucres totaux et du contenu en chlorophylle, selon les méthodes biochimiques standard en utilisant un spectrophotomètre Shimadzu, modèle UV-365, et un analyseur automatique à azote (système Kjeltech) pour quatre récoltes à raison de deux récoltes par an en 1990 et 1991.

Un essai biologique par test de mue jusqu'à la deuxième mue a été réalisé simultanément sur 100 larves, avec la race bivoltine pure NB_{18} pour la troisième et la quatrième récolte. Les feuilles tendres ont été fournies en conditions optimales d'élevage (Krishnaswami, 1978), suivant la méthode de nourrissage en continu (Takeuchi, 1961). Les observations sur le taux de mue, le poids larvaire, la période larvaire et la durée de la mue ont été relevées séparément pour la première et la deuxième mue. Le taux de mue a été calculé sur la base du pourcentage de larves sorties de mue entre le début et la fin du stade préparatoire à 2 heures d'intervalle. Le poids de 100 larves a été déterminé d'après le poids cumulé des larves sorties de mue. Les observations sur la rétention d'eau ont été relevées à partir de feuilles coupées en morceaux (1 cm^2) pour toutes les variétés en conditions d'élevage à intervalles de 4, 8, 12 et 24 heures. Le contenu en eau des feuilles a également été relevé.

Les données ont été analysées statistiquement et les résultats concernent les paramètres biochimiques de la feuille (individuellement pour les quatre récoltes et en données regroupées) ; les données obtenues pour l'essai biologique portent sur la troisième et la quatrième récolte et le taux de rétention de l'eau sur la quatrième récolte.

RESULTATS

I. Constituants biochimiques de la feuille (Tableaux I à IV) :

Les données regroupées des quatre récoltes révèlent que les variétés présentent des différences significatives pour ce qui concerne les contenus en protéines solubles, en sucres totaux et en chlorophylle. Le contenu en eau diffère peu entre les variétés (73,1 % à 74,6 %), tandis que le contenu en protéines totales présente des différences importantes, allant de 28,7 % chez Kanva-2 à 34,3 % chez Berhampore-S_1 et 34,5 % chez KNG. La variété KNG présente également le contenu en protéines solubles le plus élevé, ce contenu ainsi que ceux de Berhampore-S_1, Mysore Local, DD, RFS-175 et English Black (24,37 % à 22,87 %) différant de manière significative avec ceux des variétés Kanva-2 et S_{36} (respectivement 21,86 % et 22,2 %).

La variété English Black présente un contenu en sucres totaux nettement inférieur (9,27 %), ce contenu diffère de manière significative de ceux de toutes les autres variétés (11,31 % chez DD à 13,12 % chez la variété Mysore Local).

Les teneurs en chlorophylle *a*, en chlorophylle *b* et en chlorophylle totale (respectivement 2,01, 1,14 et 3,15 mg/g) sont maximales chez Berhampore-S_1 et les différences variétales sont significatives.

Les observations sur les récoltes considérées individuellement révèlent également un seuil de signification élevé pour les différences variétales pour les quatre récoltes.

II. Observations sur l'essai biologique par test de mue (Tableaux V et VI) :

Chez la récolte III, les variétés Kanva-2, S_{36} et English Black donnent des taux de mue élevés de 64-77 et 54-72, respectivement pour la première et la deuxième mue. Outre ces taux de mue, le poids larvaire est également élevé chez RFS-175 et KNG pour la première et la deuxième mue, tandis que la variété DD donne également un poids larvaire élevé. La variété Mysore Local donne les valeurs les plus faibles pour le poids larvaire et le taux de mue pour les deux mues (Fig. 1A et 1B).

Pour la récolte IV (Fig. 2A et 2B), de même que pour la récolte III, la variété Mysore Local donne les valeurs les plus faibles pour les taux de mue associées à des valeurs faibles pour le poids larvaire aux deux mues. De plus, les variétés Kanva-2 et S_{36} donnent une valeur faible à la première et à la deuxième mue, cette valeur s'accompagne néanmoins d'un taux de mue élevé à la deuxième mue (90 à 100). La variété English Black, par ailleurs, donne des valeurs fortes pour le taux de mue et le poids larvaire aux deux mues.

DISCUSSION

La performance de la variété Mysore Local obtenue avec le test de mue est indiscutablement médiocre pour les deux récoltes considérées. Dans la troisième récolte, les valeurs maximales pour le poids larvaire enregistrées chez la variété KNG aux deux mues s'associent avec des valeurs également maximales pour les contenus en protéines solubles et en protéines totales. De même, la

quatrième récolte, RFS-175, qui donne les valeurs maximales pour le contenu en protéines solubles, donne un poids larvaire supérieur pour la deuxième mue.

Les taux de mue médiocres et le poids larvaire inférieur observés chez la variété Mysore Local ne sont pas cohérents avec les contenus biochimiques foliaires enregistrés. Cependant, cette variété présente des valeurs faibles pour le contenu en eau (72,93 % contre 74,5 % à 74,6 % chez Berhampore-S_1, Kanva-2 et KNG et 75,9 % chez English Black), valeurs qui sont associées avec les valeurs maximales pour la perte en eau des feuilles à 4, 8, 12 et 24 heures. Le taux de rétention d'eau est minimal (45,1 % à 24 heures) chez la variété locale, devant S_{36} (49,0 %) et Kanva-2 (51,2 %). De fait, les variétés S_{36} (qui donne les valeurs les plus faibles de 71,9 % pour les feuilles données en nourriture aux vers à soie) et Kanva-2 donnent un poids larvaire faible aussi bien à la première qu'à la deuxième mue. Les taux de mue élevés enregistrés pour ces deux variétés sont cohérents avec les valeurs supérieures obtenues pour le taux de rétention d'eau par rapport à celles obtenues pour la variété locale aux différents intervalles d'observation (Tableau IV). La variété English Black, qui diffère nettement de la variété Mysore Local (pour ce qui concerne les valeurs supérieures de taux de mue et de poids larvaire aux deux mues), présente également un contenu en eau et un taux de rétention d'eau plus élevés à tous les intervalles.

Le contenu en chlorophylle de la feuille est indicatif de l'efficacité photosynthétique d'un système végétal. Cependant, dans cette étude, les différences significative pour ce qui concerne le contenu en chlorophylle entre les variétés ne se reflètent pas dans les constituants biochimiques, probablement en raison des niveaux optimaux de culture et d'entretien suivis.

Les études portant sur l'évaluation des feuilles de mûrier prélevées chez les fermiers révèlent d'importantes variations de contenu en sucres (5 % à 17 %) et en protéines solubles (10 % à 26 %) entre les échantillons prélevés dans le District de Kolar, le District de Bangalore et la régions des Ghats occidentaux (Bongale et coll., 1993). Par contraste, l'évaluation de la qualité des feuilles présentée dans cette étude fait apparaître une grande uniformité des composants nutritifs ; ceci se reflète dans le poids larvaire relevé ici. Dans une autre étude, il a été observé que les variétés Kanva-2 et S_{36} présentent régulièrement des contenus en sucres plus élevés sur une longue période de croissance, se reflétant dans le taux de mue plus élevé que ceux des variétés S_{41} et Mysore Local. La variété S_{41}, avec un contenu en protéines solubles plus élevé et en sucres plus faible, donne un poids larvaire plus élevé et des taux de mue plus faibles (Chaluvachari et Bongale, 1994).

Les informations disponibles sur l'évaluation biochimique de la feuille associée à des essais biologiques sont très rares. On sait que des valeurs élevées en protéines et en sucres favorisent l'amélioration des performances de croissance larvaire et des récolte de cocons chez le ver à soie (Legay, 1958 ; Ito, 1960 ; Horie, 1980). De même, dans cette étude, les variétés avec un contenu en protéines plus élevé (English Black, RFS-175, KNG) donnent des poids larvaires supérieurs. Saratchandra et coll. (1992) ont observé que les variétés S_{36}, C_{776} et RFS-135 étaient supérieures à English Black, Sujanpur-5 et C_{799} en termes de performance d'élevage. Plusieurs études ont été réalisées sur l'importance du contenu en eau de la feuille dans l'évaluation de sa qualité nutritive (Narayanaprakash et coll., 1985). Parpiev (1968) a observé qu'une teneur en eau élevée chez les feuilles favorisait l'ingestion et l'assimilation des éléments nutritifs de la nourriture. Il en a conclu que le contenu en eau des feuilles pouvait constituer l'un des critères d'estimation de leur qualité. De même, dans cette étude, bien que l'on n'ait pas observé de variations importantes du contenu en sucres de la feuille entre les variétés, la variété Mysore Local, avec une teneur en eau et un taux de rétention d'eau plus faibles, entraîne une performance inférieure à celles obtenues pour les autres variétés. La variété English Black, qui présente un contenu en eau et une capacité de rétention d'eau élevés à différents stades de conservation, donne une meilleure performance en termes de taux de mue et de poids larvaire.

Nous en concluons que les variétés considérées présentent des différences significatives pour ce qui concerne la qualité de la feuille. Parmi les paramètres qualitatifs foliaires étudiés, le contenu en eau, le taux de rétention de l'eau et la teneur en protéines s'avèrent avoir une valeur nutritive importante pour les vers à soie.

EFFECT OF PRUNING TIME, GENOTYPES AND ENVIRONMENTAL FACTORS ON THE DEVELOPMENT OF *CERCOSPORA MORICOLA* COOKE ON MULBERRY

R.S. TEOTIA, S.K. SEN & S.S. SINHA

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

The incidence of leaf spot disease under natural infection conditions was studied during 1991-92 with ten high-yielding varieties of mulberry, i.e., S_1, S_{799}, S_{1635}, C_{763}, C_{776}, C_{1726}, C_{1729}, C_{1730}, Tr_{10} et Tr_4, evolved at the Central Sericultural Research and Training Institute (Berhampore, West Bengal, India) in relation to pruning time, genotype reaction and environmental factors. The disease incidence was found significantly lower when plants were pruned in the first week of October and June. However, pruning made during the rainy season (July to September) was not found much effective to minimise the incidence. Varieties S_{799} and C_{1729} were found to be least infected consistently throughout the study and categorised as moderately resistant, whereas the maximum incidence was observed in C_{1726} followed by S_{1635}, Tr_4 and S_1 varieties. Besides, a higher incidence of leaf spot during the rainy season was discussed in relation to the prevalence of favourable environmental conditions for the multiplication and spread of the disease.

Keywords: Cultural practices, leaf spot incidence, pruning time, genotype reaction, environmental factors.

INTRODUCTION

Production of mulberry foliage is considerably affected by a number of diseases (Teotia and Sen, 1994). The leaf spot caused by *Cercospora moricola* Cooke is well known to incur heavy losses in terms of quality and quantity of leaf production during the rainy and winter seasons (July to November) in India (Siddaramaiah *et al.*, 1978; Sikdar and Krishnaswamy, 1980; Madhav Rao *et al.*, 1981). A few chemicals are known to control the disease (Siddaramaiah *et al.*, 1978, 1980; Sikdar and Shenoi, 1980). Management of diseases through cultivation of resistant varieties and appropriate cultural practices is the best of way of disease control in terms of economy and environmental hazards of chemicals.

Identification and development of varieties resistant to leaf spot is at beginning stage (Boraiah *et al.*, 1987; Govindaiah *et al.*, 1989). Besides, little is known about its cultural control (Sukumar and Ramalingam, 1986; Govindaiah *et al.*, 1990). Therefore, the present investigation deals with the effect of pruning schedule, varieties and environmental factors on the development of leaf spot on mulberry.

MATERIALS AND METHODS

Varieties and cultural practices:

The experiment was conducted during 1991-92, with 10 two-year-old, high-yielding mulberry varieties, i.e., S_1, S_{799}, S_{1635}, C_{763}, C_{776}, C_{1726}, C_{1729}, C_{1730}, Tr_4, and Tr_{10} (evolved at the Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, W.B., India), growing in 15" earthen pots. Recommended doses of N:P:K fertilisers (300:180:120 kg/ha/yr) were supplied in the form of urea (N), single super-phosphate (P_2O_5), and muriate of potash (K_2O) after conversion into pot dosages

as basal doses after pruning. Watering of the pots was done regularly @ twice per week with tap water of agricultural source.

Pruning schedules:

Five sets comprising all the ten high-yielding varieties were kept. In each set every variety was replicated five times. Sets were pruned at ground level following the schedule presented below. Plants were left to be infected by *Cercospora moricola* in natural conditions.

Sets	Varieties	Replications (pots)	Pruning time (1st week)	Recording of observations (in 1st week)
I	10	50	June	August
II	10	50	July	September
III	10	50	August	October
IV	10	50	September	November
V	10	50	October	December

Disease scoring procedure:

The disease incidence was recorded 60 days after pruning of each set (Table I). Five vigorous branches of every potted plant (replication) were randomly selected and screened for the total number of healthy and diseased leaves to calculate the percentage disease incidence (PDI) using a 0 to 5 scale (McKinney, 1923) in the following grades.

0 = No infection
I = 1-10 per cent leaf area destroyed by spots
II = 11-25 per cent leaf area destroyed by spots
III = 26-50 per cent leaf area destroyed by spots
IV = 51-75 per cent leaf area destroyed by spots
V = 76-100 per cent leaf area destroyed by spots

$$PDI = \frac{\text{Sum of all numericals}}{\text{Total number of leaves examined} \times \text{Maximum grade (5)}} \times 100$$

RESULTS AND DISCUSSION

In general, the incidence of leaf spot was significantly higher in the sets that were pruned and grown in the rainy season (set II: 41.37%; set III: 31.66%; set IV: 29.55%) followed by winter (3.26%) (Fig. 1). Similar results were reported by Siddaramaiah *et al.* (1978) and Govindaiah *et al.* (1990).

Effect of pruning time:

It is evident from the data presented in Table I that the mean infection percentage and PDI of leaf spot were significantly lower when mulberry plants were pruned during the first week of October (set V), followed by June (set I), whereas a reverse trend was observed when pruning was made in the first week of July, August and September. These results indicate that the incidence of leaf spot cannot be minimised effectively by changing the pruning time during the rainy season (Fig. 1).

Table I. Effect of pruning time and genotypes on the development of leaf spot on mulberry.

Tableau I. Effet de l'époque de taille et des génotypes sur le développement de la maladie de la tache chez le mûrier.

Varieties / *Variétés*	Pruning time / *Epoque de taille*											
	June / *Juin*		July / *Juillet*		August / *Août*		Sept.		Oct.		Mean / *Moyenne*	
	Inf. %	PDI	Inf. %	PDI	Inf. %	PDI	Inf. %	PDI	Inf. %	PDI	Inf. %**	PDI*
S_1	36.44	6.74	82.57	46.56	75.91	36.05	76.30	30.13	13.75	3.23	56.99	24.54
S_{799}	24.34	5.61	73.62	24.63	64.50	22.67	55.67	18.32	7.61	1.50	45.61	14.54
S_{1635}	36.34	7.84	87.56	59.05	86.32	41.67	83.29	40.47	23.69	4.74	63.46	30.72
C_{763}	36.63	8.70	79.94	29.61	70.74	27.08	65.22	24.47	14.22	2.84	53.27	18.54
C_{776}	37.33	11.04	72.73	27.47	70.29	28.86	91.01	29.62	16.01	3.20	57.47	20.04
C_{1726}	44.08	14.97	98.41	82.92	81.25	44.82	81.38	34.82	23.20	4.64	65.67	36.43
C_{1729}	48.30	12.70	72.67	24.45	61.97	21.90	63.68	19.44	8.65	1.85	51.05	16.07
C_{1730}	39.22	7.84	77.04	34.30	83.38	35.35	67.34	24.55	15.95	4.71	56.59	21.35
Tr_4	30.19	6.04	89.48	47.61	90.15	44.30	61.81	29.97	14.62	2.92	57.25	26.17
Tr_{10}	18.80	3.77	94.29	44.81	81.37	30.17	62.23	19.97	14.79	2.96	54.30	20.34
Mean / *Moyenne*	35.38	8.53	82.79	42.14	76.59	33.27	70.79	27.18	15.25	3.26	-	-

* CD at 5% / *Intervalle de confiance au seuil de 5 %* :
For pruning time / *Pour l'époque de taille* : 3.99
For variety / *Pour la variété* : 2.82
For pruning time × variety / *Pour l'époque de taille* × *variété* : 8.93
Standard error / *Ecart type* : 3.19

** CD at 5% / *Intervalle de confiance au seuil de 5 %* :
For pruning time / *Pour l'époque de taille* : 6.11
For variety / *Pour la variété* : 4.32
For pruning time × variety / *Pour l'époque de taille* × *variété* : 13.69
Standard error / *Ecart type* : 4.88

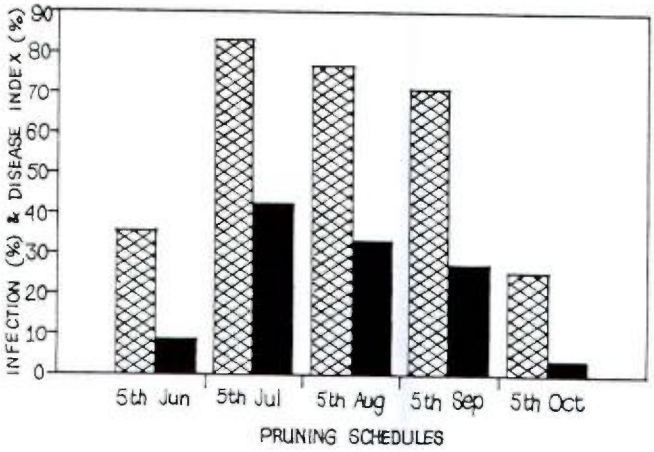

Fig. 1: Effect of pruning schedules on the mean infection percentage and PDI.

Fig. 1 : Effet de la période de taille sur le pourcentage moyen d'infestation et sur le PDI.

☒ Infection (%).
PDI.

Effect of genotypes:

Responses of genotypes to leaf spot varied significantly (Fig. 2). Of the ten high-yielding varieties, S_{799} was found to be least infected consistently throughout the study, followed by C_{1729}. Both varieties were found moderately resistant to the disease. This is in conformity with the findings of Govindaiah *et al.* (1989). On the other hand, the maximum infection percentage (65.67%) and PDI (36.43%) were recorded in C_{1726}, followed by S_{1635}, Tr_4 and S_1 varieties where the mean infection percentage and PDI were recorded to be 63.46% (30.72%), 57.25% (26.17%) and 56.99% (24.54%), respectively (Table I). All the varieties were infected maximally when pruned in the first week of July (set II), followed by pruning in August and September (sets III and IV) and least when pruned in October. Besides, the interaction of pruning time and genotypes was found to be highly significant (Table II).

Table II. Analysis of variance (mean sum of squares).

Tableau II. Analyse de variance (somme moyenne des carrés).

Source *Source*	Degree of freedom *Degré de liberté*	Infection % *Pourcentage d'infestation*	PDI *PDI*
Replication / *Réplicat*	2	.1178194 E + 03	.9281250 E + 01
Variety / *Variété*	9	.5108799 E + 03**	.6836384 E + 03**
Pruning time / *Epoque de taille*	4	.2601091 E + 05**	.7909289 E + 04**
Variety × pruning time / *Variété × époque de taille*	36	.1687276 E + 03*	.2140878 E + 03**
Error / *Ecart*	98	.7147520 E + 02	.3049378 E + 02

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

Fig. 2: Responses of mulberry varieties to *Cercospora moricola* Cooke.

Fig. 2 : Réponses des variétés de mûrier à Cercospora moricola *Cooke.*

Infection (%).
PDI.

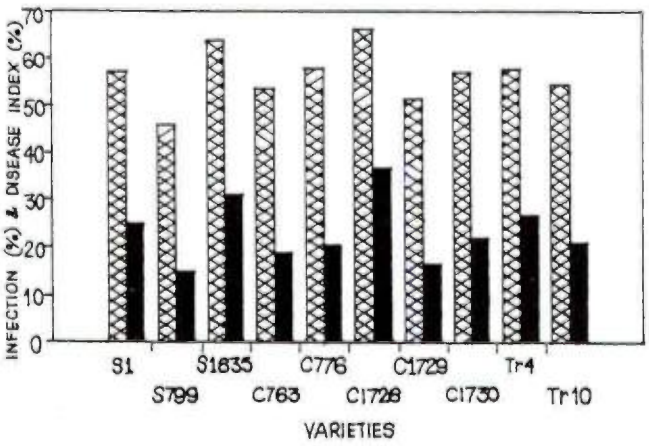

Table III. Effect of environmental factors on the development of leaf spot disease.

Tableau III. Effet des facteurs environnementaux sur le développement de la maladie de la tache.

Growing season	Disease incidence		Environmental factors					Rainy days
	Infection %	PDI	Avg. temp. (°C)		Avg. R.H. (%)		Rainfall (mm)	
			Max.	Min.	Max.	Min.		
Saison de culture	*Incidence de la maladie*		*Facteurs environnementaux*					*Jours de pluie*
	Pourcentage d'infestation	*PDI*	*Température moyenne (°C)*		*Humidité moyenne (%)*		*Précipitations (mm)*	
			Max.	*Min.*	*Max.*	*Min.*		
June to August *Juin à août*	35.18	3.78	33.2	23.4	97.3	64.0	409.1	31
July to September *Juillet à septembre*	82.79	42.14	33.1	23.6	96.0	69.0	290.0	24
August to October *Août à octobre*	76.59	33.27	33.3	22.7	96.0	71.3	278.0	26
September to November *Septembre à novembre*	70.79	27.18	32.5	22.1	98.0	69.3	279.0	21
October to December *Octobre à décembre*	15.25	3.26	29.6	18.5	86.0	61.25	91.0	5

Effect of environmental factors:

In the present study, it was observed that the incidence of leaf spot was higher when average minimum and maximum temperature of 22 °C and 33 °C, respectively, prevailed with an average

maximum and minimum relative humidity of 70% to 96% and moderately high precipitation ranging from 275 mm to 300 mm distributed over 21 to 26 days (Table III). Similar to these findings, Sukumar and Ramalingam (1989) reported the rainfall to be solely responsible for the horizontal and vertical spread of the leaf spot disease. Siddaramaiah *et al.* (1978) found a 24 °C temperature to be optimum for conidial germination of *Cercospora moricola*. Thus, the higher incidence of leaf spot in the sets grown during the rainy season (sets II, III and IV) can be explained by the prevalence of favourable environmental conditions available for multiplication and spread of the disease during this study. Conversely, the low incidence in set V pruned and grown specially in winter was presumably due to unfavourable weather conditions, i.e., low temperature, low relative humidity and sporadic rainfall.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Shri B.P. Nair, Assistant Director (Statistic), Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore (W.B.), for the analysis of data.

REFERENCES

BORAIGH G., SHREE M.P., NARAYANA GOWDA S.N. (1987) Screening of mulberry plants for foliar diseases in the germ plasm bank. Sericologia 27(2), 165-176.

GOVINDAIAH, SHARMA D.D., SENGUPTA K., GUNASEKHAR V., SURYANARAYAN N., MADHAV RAO Y.R. (1989) Screening of mulberry varieties against major fungal diseases. Indian J. Seric., 28, 207-213.

GOVINDAIAH, SHARMA D.D., CHOUDHAR P.C., MALLIKARJUNA B., MADHAV RAO Y.R. (1990) Incidence of fungal diseases of mulberry under different agronomical practices. Sericologia, 30(2), 237-242.

MADHAV RAO Y.R., KODANDARAM M.S., SRINIVASAN E.B. (1981) Effect of leaf spot disease on the composition (food content) of mulberry (*Morus alba*) leaves. J. Mysore Univ., 28, 21-23.

McKINNEY H.H. (1923) Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. J. Agric. Res., 26, 195-210.

SIDDARAMAIAH A.L., PADAGANUR G.M., KRISHNA PRASAD K.S., GOVINDAN R. (1978) Control of mulberry leaf spot caused by *Cercospora moricola* Cooke. Indian J. Seric., 17(1), 23-27.

SIDDARAMAIAH A.L., GOVINDAN R., DESAI S.A., BHAT R.P., DEVAIAH M.C. (1980) *In vitro* efficacy of certain systemic and non-systemic fungicides against *Cercospora* leaf spot of mulberry. Indian J. Seric., 19(1), 34-35.

SIKDAR A.K., KRISHNASWAMI S. (1980) Assessment of leaf yield loss of the two mulberry varieties due to leaf spot disease. Indian J. Seric., 19(1), 9-12.

SIKDAR A.K., SHENOL M.M. (1980) Control of leaf spot disease of mulberry by systemic fungicides. Indian Phytopath., 33, 38-41.

SUKUMAR J., RAMALINGAM A. (1986) Epidemiology of *Cercospora* leaf spot disease of mulberry. I: Stages of infection spots and conidial production. Sericologia, 26(4), 549-553.

TEOTIA R.S., SEN S.K. (1994) Mulberry diseases in India and their control. Sericologia, 34(1), 1-18.

EFFET DE L'EPOQUE DE LA TAILLE, DES GENOTYPES ET DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX SUR LE DEVELOPPEMENT DE *CERCOSPORA MORICOLA* COOKE CHEZ LE MURIER

R.S. TEOTIA, S.K. SEN & S.S. SINHA

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

L'incidence de la maladie de la tache a été étudiée en conditions naturelles en 1991-1992 chez dix variétés de mûrier performantes (S_1, S_{799}, S_{1635}, C_{763}, C_{776}, C_{1726}, C_{1729}, C_{1730}, Tr_{10} et Tr_4) isolées au Central Sericultural Research and Training Institute (Berhampore, Bengale occidental, Inde) en fonction de l'époque de taille, de la réponse des génotypes et des facteurs météorologiques. L'incidence de la maladie est nettement plus faible lorsque les plants sont taillés au cours de la première semaine des mois d'octobre et juin. La taille réalisée au cours de la saison pluvieuse (juillet à septembre) ne donne pas de réduction sensible de l'incidence. Pendant toute la durée de l'étude, les variétés S_{799} et C_{1729} ont présenté l'incidence la plus faible et ont été classées comme moyennement résistantes, tandis que l'incidence maximale a été observée chez les variétés C_{1726}, puis S_{1635}, Tr_4 et S_1. En outre, l'incidence plus forte de la maladie de la tache pendant la saison pluvieuse est discutée en relation avec la présence de conditions environnementales favorables à la multiplication et à la propagation de cette maladie.

INTRODUCTION

La production de feuilles de mûrier est affectée par un grand nombre de maladies (Teotia et Sen, 1992). On sait que la maladie de la tache, provoquée par *Cercospora moricola* Cooke, entraîne des pertes importantes de rendement en feuilles en termes de qualité et de quantité en hiver et à la saison pluvieuse (juillet à novembre) en Inde (Siddaramaiah et coll., 1978 ; Sikdar et Krishnaswamy, 1980 ; Madhav Rao et coll., 1981). Quelques substances chimiques permettent d'enrayer cette maladie (Siddaramaiah et coll., 1978, 1980 ; Sikdar et Shenoi, 1980). La lutte contre les maladies par la culture de variétés résistantes et l'utilisation de pratiques culturales appropriées constituent la meilleure approche sur le plan économique et du point de vue des risques liés à l'utilisation de substances chimiques.

L'identification et la mise au point de variétés résistantes à la maladie de la tache sont des techniques utilisées depuis peu (Boraiah et coll., 1987 ; Govindaiah et coll., 1989). On dispose de peu d'informations sur la lutte culturale contre cette maladie (Sukumar et Ramalingam, 1986 ; Govindaiah et coll., 1990). Cette étude traite donc de l'effet du planning de taille, des variétés et des facteurs météorologiques sur le développement de la maladie de la tache chez le mûrier.

MATERIELS ET METHODES

Variétés et pratiques culturales :

L'expérience a été réalisée en 1991-92 avec des plants âgés de 2 ans des dix variétés performantes S_1, S_{799}, S_{1635}, C_{763}, C_{776}, C_{1726}, C_{1729}, C_{1730}, Tr_4 et Tr_{10} (isolées au *Central Sericultural Research and Training Institute* de Berhampore, Bengale occidental, Inde) cultivées dans des pots en terre de 15″. Les doses recommandées d'engrais N:P:K ont été utilisées (300:180:120 kg/ha/an) ont été

appliquées sous la forme d'urée (N), de superphosphate simple (P_2O_5) et de muriate de potasse (K_2O) après conversion en doses pour pots sous forme de dose de base après la taille. L'arrosage des pots a été réalisé deux fois par semaine avec de l'eau du robinet de source agricole.

Planning des tailles :

Cinq lots pour les dix variétés performantes ont été utilisés. Chaque lot correspond à cinq répétitions. Les lots ont été taillés à la base suivant le planning présenté ci-dessous. Les plants ont été infestés par *C. moricola* dans des conditions naturelles.

Lots	Variétés	Réplicats (pots)	Epoque de taille (1ère semaine)	Enregistrement des observations (1ère semaine)
I	10	50	Juin	Août
II	10	50	Juin	Septembre
III	10	50	Août	Octobre
IV	10	50	Septembre	Novembre
V	10	50	Octobre	Décembre

Protocole de gradation de la maladie :

L'incidence de la maladie a été enregistrée 60 jours après la taille de chaque lot (Tableau I). Cinq branches vigoureuses de chaque pot (réplicat) ont été sélectionnées au hasard afin de déterminer le nombre total de feuilles saines et malades servant à calculer le pourcentage d'incidence de la maladie (PDI) sur la base d'une échelle de 0 à 5 (McKinney, 1923) :

0 = pas d'infestation.
I = 1 à 10 % de la surface foliaire détruite par les taches.
II = 11 à 25 % de la surface foliaire détruite par les taches.
III = 26 à 50 % de la surface foliaire détruite par les taches.
IV = 51 à 75 % de la surface foliaire détruite par les taches.
V = 76 à 100 % de la surface foliaire détruite par les taches.

$$PDI = \frac{\text{Somme de toutes les valeurs numériques}}{\text{Nombre total de feuilles examinées} \times \text{Degré maximal (5)}} \times 100$$

RESULTATS ET DISCUSSION

En général, l'incidence de la maladie de la tache est nettement supérieure chez les lots taillés et cultivés à la saison pluvieuse (lot II : 41,37 %, lot III : 31,66 %, lot IV : 29, 55 %), devant ceux taillés en hiver (3,26 %) (Fig. 1). Des résultats similaires ont été obtenus par Siddaramaiah et coll. (1978) et Govindaiah et coll. (1990).

Effet de l'époque de taille :

Les données présentées dans le tableau I montrent clairement que le pourcentage d'infestation et le PDI de la maladie de la tache sont faibles lorsque les plants sont taillés au cours de la première semaine d'octobre (lot V), suivi de juin (lot I), la tendance est inverse lorsque la taille est réalisée pendant la première semaine des mois de juillet, août et septembre. Ces résultats indiquent qu'il n'est

pas possible de réduire l'incidence de la tache foliaire en modifiant le moment de la taille au cours de la saison pluvieuse (Fig. 1).

Effet des génotypes :

Les réponses des génotypes à la tache foliaire varient de manière significative (Fig. 2). Sur les dix variétés performantes, S_{799} est la moins infestée pendant toute la durée de l'étude, devant C_{1729}. Ces deux variétés sont classées comme moyennement résistantes à la maladie. Ceci est conforme aux résultats de Govindaiah et coll. (1989). Les valeurs maximales pour le pourcentage d'infestation (65,67 %) et le PDI (36,43 %) ont été obtenues chez la variété C_{1726}, devant S_{1635}, Tr_4 et S_1 chez lesquelles le pourcentage moyen d'infestation et le PDI sont respectivement de 63,46 % et 30,72 %, 57,25 % et 26,17 et 56,99 % et 24,54 % (Tableau I). L'infestation est maximale chez toutes les variétés lorsque la taille est réalisée durant la première semaine de juillet (lot II), devant la première semaine d'août et de septembre (lots III et IV) et minimale pour octobre. En outre, l'interaction entre l'époque de taille et les génotypes est fortement significative (Tableau II).

Effet des facteurs environnementaux :

Dans cette étude, l'incidence de la tache foliaire est plus élevée lorsque les températures minimale et maximale sont de 22 °C et 33 °C avec une humidité relative moyenne minimale et maximale de 96 % et 70 % et des précipitations modérément élevées se situant entre 275 mm et 300 sur 21 à 26 jours (Tableau III). Ceci est conforme aux résultats de Sukumar et Ramalingam (1989), selon lesquels le taux de précipitations est seul responsable de la propagation horizontale et verticale de la maladie de la tache. Siddaramaiah et coll. (1978) ont observé qu'une température de 24 °C est optimale pour la germination des conidies de *Cercospora moricola*. Ainsi l'incidence plus forte de la tache foliaire chez les lots cultivés à la saison pluvieuse (lots II, III et IV) peut-elle s'expliquer dans cette étude par la présence de conditions météorologiques favorables à la multiplication et à la propagation de la maladie. A l'inverse, la faible incidence obtenue chez le lot V, taillé et cultivé en hiver, est probablement due à des conditions météorologiques défavorables, c'est-à-dire une température et une humidité relative faibles et des précipitations sporadiques.

Brief note

THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L., ON ORBIT IN AN EARTH ARTIFICIAL SATELLITE

Sh. R. MADYAROV[1], E. A. ILYIN[2] & V.A. JANIBEKOV[3]

1. Uzbek Research Institute of Sericulture, R & D Corporation "Silk", Djar-Aryc, Tashkent 700055, Republic of Uzbekistan.
2. Institute of Medico-Biological Problems of the Health Ministry of the Russian Federation, Khoroshovskoe shosse, 76 a, Moscow 123007, Russian Federation.
3. Centre of Cosmonauts Training of the Military Ministry of Russian Federation, Shyolkovo - 3, Moscow Region 141160, Russian Federation.

*Space experiments with the silkworm, **Bombyx mori** L., have been carried out on board a manless artificial satellite of Earth "Cosmos-2229" (Bion-10). Silkworm eggs, young and old larvae have been exposed to a unique complex of physical effects like those of launching, flying and landing of an artificial satellite. Possible modifications in different phases of the silkworm's development ranging from hatching up to the beginning of cocoon spinning have been investigated in the first experiment. The rearing of young and adult larvae has been carried out on an artificial diet which satisfied their normal development. The percentage of larvae hatching from eggs and the development of young and adult larvae as well as the beginning of cocoon spinning in conditions of space experiment are a little different from those found on earth. The possibility of the use of the silkworm as a perspective board test organism as well as for obtaining genetic modifications under conditions of long-term space experiments are discussed.*

Keywords: Silkworm *Bombyx mori* L., eggs, larvae, hatching, rearing, development, artificial diet, space, overload, weightlessness, radiation, silk production (silk secretion, formation of thread), adaptation.

INTRODUCTION

Being an economically useful insect, the silkworm has recently become an extremely convenient test animal which is often irreplaceable in screening studies (Madyarov, 1988). Its properties, the ability to grow and develop under almost any conditions, the ability to rapidly increase its biomass and dimensions in the process (about 10000-fold in 24-27 days), a high sensitivity to physical, physiochemical and biotechnical factors, well-defined responses, and especially all-year-round reproduction by the use of various artificial feeds created for the purpose: this makes this insect a promising test organism to conduct fundamental and applied research (Madyarov *et al.*, 1989). Another reason for considering this insect as a highly efficient test animal is that, owing to its being ubiquitously cultivated all the year round using artificial feeds, the silkworm has become an object of biotechnological and gene engineering efforts(Maeda *et al.*, 1985). Since the middle of the 1980s Japanese researchers have come to use the silkworm as a genetically engineered animal, i.e., as an efficient producer of human alpha-interferon, animal growth hormone, some enzymes and other recombinant peptides (Maeda *et al.*, 1985).

In 1991, after duly discussing the possibility of using the silkworm in space experiments with workers of a number of research institutes of the USSR and Uzbek SSR, all this enabled us to make a proposition to the Gagarin Centre for Cosmonaut Training (CCT) and then to the Institute of Medico-Biological Problems (IMBP) to adopt a programme of research named 'Ipaq Yuli Qoinotda'

(Silk Road in Space), whose first stage was to investigate the adaptation and behaviour of the silkworm in outer space. After discussing the proposed programme, financial matters came up and it was decided to conduct the first experiment on board of the pilotless satellite "Cosmos-2229" ("Bion-10") which was to be launched in December 1992. This decision somewhat reduced the original extent of research, making it a test conducted without constant monitoring and maintenance of the insects, and conclusion could be drawn only after it was over. Nevertheless, the rigorous conditions of the experiment made it possible to test the properties of the artificial feed 'Bombyvit', designed by us under severe conditions as well.

However, the main objective of the experiment was to investigate the adaptation of the silkworm and the extent to which it retained instincts and reflexes formed on earth over a long time when subjected to g-load, weightlessness, radioactivity, and so on, during launching time and while being on orbit. The following studies were proposed: (1) to investigate the ability of larvae to hatch and their subsequent development when fed on an artificial feed; (2) to study whether and to what extent the reflexes of the insect food-procuring, moulting, cocoon-forming, metamorphosis into a pupa and then, possibly, into a moth were retained in the silkworm of various strains and in various stages of development; (3) to compare the results obtained with those of an experiment conducted under earth conditions at the same time.

MATERIALS AND METHODS

The tests were conducted in sterile Petri dishes (90 mm in diameter, 18 mm high). Two Petri dishes were used to put a quantity of eggs with a feed. Eggs of tetrahybrid 3 (obtained from the Bostanlik Egg Plant) were placed in a refrigerator on 27.10.92 to hibernate. On 18.12.92 they were treated with hydrochloric acid and placed in perforated paper bags. There were 100 eggs per bag and the bags had an open side touching a nutrient that had been sterilized in an autoclave and put in a Petri dish under sterile conditions. The eggs with nutrient in one of the dishes were covered with a thin polyethylene mesh to keep larvae in contact with the feed, which is essential in weightlessness. Another Petri dish was left uncovered. Two other dishes were dedicated to larvae of the same hybrid, 3 days of the fourth age, that had been grown on 2 different artificial feeds (variants 12 and 16), with the weight of each larva , 0.85 g and 0.77g respectively. Other two dishes were occupied by 2 larvae of 5th age, of the Tashkentskaya-8 breed (3.10 g in weight each), and of the Saniish-8 breed (3.2 g and 3.33 g in weight). Similar variants in six dishes were duplicated for two control tests conducted on earth at IMBP and at the Uzbek Research Institute of Sericulture (URIS). In the former, the telemetry made it possible to maintain the temperature and moisture at the same level as those on board the satellite "Bion-10" and, in the latter, they were kept at the levels recommended by the guidelines (T: 27-28 °C, external moisture: 60-70 %, moisture inside the dish: 90-95 %). It should be pointed out that the test used silkworms grown on the standard artificial feed and on innovative ones in a universal bacteriologic cell, UNBK-1, which does not ensure complete sterility. The larvae, prior to putting in the sterile dishes, were wiped with a cloth soaked in 70 % alcohol. The Petri dishes containing the biomaterial and artificial feeds, that had been prepared under sterile conditions, were placed in cardboard boxes lined with foamed plastics and reinforced with strong fabric, for both the space experiment and the one conducted on earth.

RESULTS AND DISCUSSION

"Bion-10" was launched at the Pad in Plisetsk on December 29, 1992, and it landed on January 9, 1993. Thus, the space experiment lasted 12 days. Naturally, the test biomaterial was put in conditions which were extremely adverse to life. Nevertheless, the earth controls enabled us to make the following conclusion, based on the results of the first space experiment: (1) the average viability of the tetrahybrid-3, judged by the final output, was 78%, which roughly corresponds to the earth controls (71% and 74% at the IMBP and URIS, respectively). It should be pointed out that the lower yield in the IMBP controls was presumably caused by the fact that, for some unidentified reasons, the temperature had not been kept at the same level as on board the satellite, but had been 4-5 °C lower (see Fig 1). The dynamics of egg hatching day by day remains unknown. However, judging by the

size of larvae returned from the orbit (6 to 15 mm) as compared with that of the earth controls (7 to 14 mm at the URIS), one can deduce that the daily hatching of larvae did not differ considerably either. Hatching under earth conditions began on the 2nd day of flight and after 3 days it was virtually over. The wider distribution in size of the test larvae can be attributed to weightlessness; however, this is at this stage only a supposition, supported, nonetheless, by comparison of the results of growing larvae using a retaining mesh and without one (silkworm size distribution of 7 to 15 mm and of 6 to 14 mm, respectively), which means that the larvae had been in contact with the feed nearly all the time. One is even tempted to suppose that weightlessness had contributed to a better contact of the larvae with the feed.

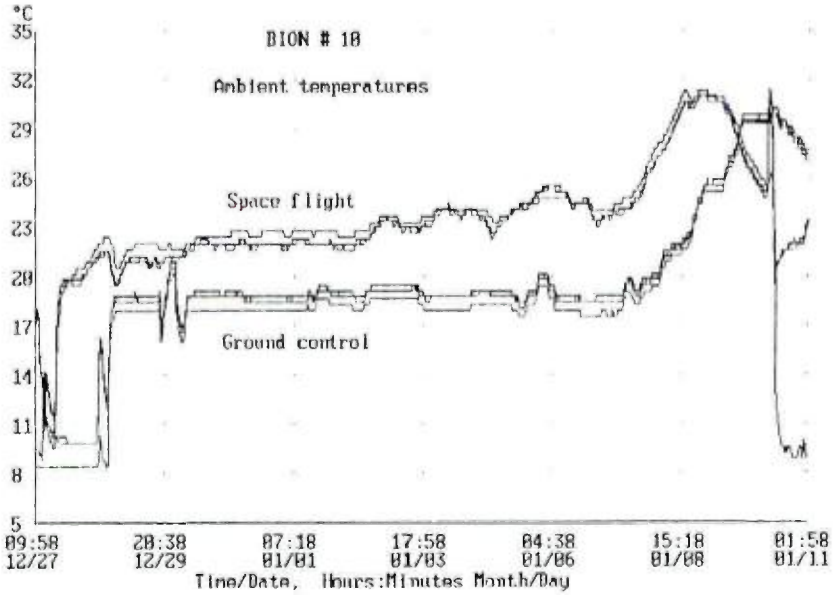

Fig. 1: Data on change of the temperature of air in the cabin of biosatellite "Cosmos-2229" (Bion 10) in the flight experiment and in the land control experiment.

These data have been obtained by several autonomous sensors of temperatures.

Fig. 1 : Données sur les variations de températures de l'air dans la cabine du biosatellite "Cosmos-2229" (Bion 10) au cours de l'expérience en vol et de l'expérience conduite à terre.

Ces données ont été obtenues par plusieurs détecteurs autonomes de température.

In the test with larvae of the fourth instar, tetrahybrid-3, one of the larvae (variant 16) died having reached a length of 5.7 cm; the other died at a stage near pupation with a length of 3.9 cm, having produced a silk thread in a form which looked like the initial stage of the formation of a cocoon. The tetrahybrid larvae of variant 12 both died, having not reached the stage of spinning a cocoon. In these variants, the bulk of the feed had been consumed. An abundance of excreta also leads to the conclusion that the silkworms had eaten well and gone through the main stages of development (4th stage larva, the stage of forming a cocoon, the beginning of pupation). The earth controls made it possible to

somewhat clarify the cause of death of the silkworms. In the URIS control where conditions had been close to those on board, there was a similar outcome to that of the space experiment, i.e., the silkworms had died prior to the stage of forming a cocoon or at the stage they had begun spinning a cocoon. Both in the space experiment and in the controls, there had been (from the 3rd-4th day of flight) some mould forming and developing. In the control, the centres where the mould had started were excreta. One has every reason to believe that it was the mould that had caused the death of the larvae, since, in the IMBP controls, where temperature had been lower and where there had been no mould, the cocoons were formed and there were even moth which laid eggs, though by that time, the experiments were over.

In the experiments with the pure breeds Saniish-8 and Tashkentskaya-8, the results were similar to those obtained previously. The larvae having reached the stage immediately preceding that of forming a cocoon and nearly used up all the feed, had also died. Among the causes of death hypoxia and discomfort can be included besides those listed above, since larvae had already grown to a large size, consuming more oxygen and producing more carbon dioxide and excreta.

Thus, it follows from the information that has been said above (which is by no means exhaustive), that the attendant conditions on putting a satellite on earth orbit and returning it to the earth, namely g-load, weightlessness, radioactivity, and so on, do not cause any noticeable changes in the instincts, reflexes, and genetically transmitted features of development and behaviour of the organism. The data obtained in the experiment also allow us to conclude that the problem of providing the normal hatching, growth and development of the silkworm at the larval and subsequent stages of its life cycle using artificial feeds, as well as creating the necessary life-support and sanitary control systems will be resolved in future experiments on board manned satellites. Further experiments will be concerned with the possibilities of improving the desired properties of this insect, with building special equipment for reproducing the silkworm in space experiments for biotesting and fundamental research in the framework of the programme "Ipaq Yuli Qoinotda". It is to be hoped that the programme finds support from the newly created National Committee for Cosmic Explorations of the Republic Uzbekistan.

ACKNOWLEDGEMENTS

In conclusion, we deem it our duty to acknowledge our profound indebtedness to Titov V.C., Vasil'yev V.I., Ivakin O.V. (from CCT), Alpatov A.M., Tairbekov M.G. (from IMBP), Yanov V.Ya., Khalmirsaev M.M., Pozilova R.A., Juraeva M., Kobilova M. (from URIS), Latipov N.L. ("Unitech International"), Zainutdinov Sh. Sh.("Izvestiya"), Babaev B.R. ("Business Partner of Uzbekistan") and personnel of Uzbek Department of Academy of Culture and Human Value without whom the first space experiment on the silkworm, which has opened up a Great Silk Road in outer space, would have been impossible.

REFERENCES

MADYAROV Sh. R. (1988) Artificial nutritious mediums for sericulture and scientific researches. Reports UZSSR Acad. Sci., N7, H, 54-56.

MADYAROV Sh. R., MUMINOV A., NASIRILLAEV U.N., KIYOSOV A.A. (1989) Nutritious medium for silkworm breeding. Soviet Patent, N, 1546032.

MAEDA S., IAWAI T., OBINATA M. (1985) Production of human α-interferon in silkworms using a baculovirus vector. Nature, V, 315, N 6020, 592-594.

Note brève

LE VER A SOIE *BOMBYX MORI* EN ORBITE DANS UN SATELLITE ARTIFICIEL DE LA TERRE

Sh. R. MADYAROV[1], E.A. ILYIN[2] & V.A. JANIBEKOV[3]

1. Uzbek Research Institute of Sericulture, R & D Corporation "Silk", Djar-Aryc, Tashkent 700055, République d'Ouzbékistan.
2. Institute of Medico-Biological Problems of the Health Ministry of the Russian Federation, Khoroshkoskoe shosse, 76a, Moscow 123007, Fédération de Russie.
3. Centre of Cosmonaut Training of the Military Ministry of the Russian Federation, Shyolkovo-3, Moscow Region 141160, Fédération de Russie.

Des expériences dans l'espace utilisant le ver à soie ***Bombyx mori*** *ont été réalisées à bord d'un satellite artificiel de la terre inhabité "Cosmos-2229" (Bion-10). Des oeufs et des larves jeunes et âgées de vers à soie ont été exposés à un complexe unique d'effets physiques comme le lancement, le vol et l'atterrissage d'un satellite artificiel. Les modifications éventuelles intervenues à différents stades du développement du ver à soie, de l'éclosion jusqu'au début du filage, ont été étudiées lors d'une première expérience. Les larves jeunes et adultes ont été élevées sur un milieu artificiel permettant leur développement normal. Le pourcentage de larves écloses, le développement des larves jeunes et adultes ainsi que le début du filage des cocons en milieu spatial diffèrent légèrement de ceux observés sur terre. La possibilité d'utiliser le ver à soie comme organisme d'expérimentation et l'obtention éventuelle de modifications génétiques par des expériences dans l'espace à long terme sont discutées.*

INTRODUCTION

Le ver à soie, insecte d'intérêt économique, est récemment devenu un animal expérimental extrêmement pratique et souvent irremplaçable dans les études de sélection (Madyarov, 1988). Sa capacité à se développer quelles que soient les conditions, à accroître rapidement sa biomasse et sa taille au cours de ce processus (environ 10 000 fois en 24 à 27 jours), sa sensibilité élevée aux facteurs physiques, physico-chimiques et biotechniques, ses réactions bien connues et, en particulier, sa reproduction tout au long de l'année par l'utilisation de différents aliments artificiels mis au point à cette fin, toutes ces propriétés font de cet insecte un organisme expérimental prometteur en recherche fondamentale et appliquée (Madyarov et coll., 1989). Une autre raison qui permet de considérer cet insecte comme un animal de laboratoire tout à fait efficace est le fait qu'étant élevé toute l'année par l'utilisation d'aliments artificiels, le ver à soie est devenu l'objet de recherches en génie génétique et en biotechnologie (Maeda et coll., 1985). Depuis le début des années 1980, des chercheurs japonais ont été amenés à utilisé le ver à soie comme animal de manipulation génétique, c'est-à-dire producteur d'alpha-interféron humain, d'hormones de croissance animales, de certaines enzymes et d'autres peptides recombinants (Maeda et coll., 1985).

En 1991, des discussions avec des chercheurs d'un certain nombre d'instituts de recherches d'URSS et de la RSS d'Ouzbékistan sur la possibilité d'utilisation du ver à soie dans des expériences spatiales nous ont conduits à présenter un projet au Centre Gagarine pour la Formation des Cosmonautes (CCT) et à l'Institut des problèmes médico-biologiques (IMBP). Ce projet vise à adopter un programme de recherches dénommé "Ipaq Yuli Qoinotda" (Route de la Soie dans l'Espace), dont la première étape consiste à étudier l'adaptation et le comportement du ver à soie dans l'espace. Après discussion du programme proposé, les questions financières sont apparues et il a été décidé de conduire

la première expérience à bord du satellite inhabité "Cosmos-2229" (Bion-10) qui devait être lancé en décembre 1992. Cette décision réduisit quelque peu la portée originale de nos recherches, car elle impliquait que cette expérience serait réalisée sans contrôle régulier et sans entretien des insectes et les conclusions pourraient être tirées seulement une fois l'expérience terminée. Néanmoins, les conditions rigoureuses de l'expérience ont permis de tester les propriétés de l'aliment artificiel "Bombyvit" que nous avons élaboré dans des conditions également rigoureuses.

Cependant, le principal objectif de l'expérience restait d'étudier l'adaptation du ver à soie et son degré de conservation des instincts et des réflexes conditionnés sur terre depuis des millénaires lorsqu'il est soumis à des pressions de gravité, à l'apesanteur, à la radioactivité, etc., au cours du lancement et en orbite. Les études suivantes ont été proposées : (1) étude de la capacité des larves à éclore et à se développer sur aliment artificiel, (2) étude du niveau de conservation des réflexes du ver à soie chez différentes souches et à différents stades du développement pour ce qui concerne l'alimentation, la mue, la formation des cocons, la métamorphose en chrysalide puis en papillon, (3) comparaison des résultats obtenus avec ceux d'une expérience conduite parallèlement sur terre.

MATERIELS ET METHODES

Les tests ont été réalisés dans des boîtes de Pétri stériles (90 mm de diamètre, 18 mm de hauteur). Deux boîtes de Pétri ont été utilisées pour mettre une certaine quantité d'oeufs avec un aliment. Des oeufs du tétrahybride 3 (fournis par le centre de grainage "Bostanlik") ont été placés en hibernation au réfrigérateur le 27.10.92. Ils ont été traités à l'acide chlorhydrique le 18.12.92 et placés dans des sacs en papier perforés. Chaque sac contient 100 oeufs et comporte un côté ouvert en contact avec un élément nutritif préalablement stérilisé dans un autoclave et placé dans une boîte de Pétri en milieu stérile. Les oeufs et l'élément nutritif de l'une des boîtes ont été recouverts avec un filet en polyéthylène afin de maintenir les larves en contact avec la nourriture, condition essentielle en apesanteur, et l'autre boîte n'a pas été recouverte. Deux autres boîtes ont été réservées aux larves d'un même hybride, au 3e jour du 4 âge, élevées sur deux aliments artificiels différents (variantes 12 et 16), les larves pesant respectivement 0,85 g et 0,77 g. Deux autres boîtes ont été utilisées par deux larves du 5e âge de la souche Tashkentskaya 8 (pesant chacune 3,10 g) et de la souche Saniish 8 (3,2 g et 3,33 g). Des variantes identiques ont été répétées pour deux expériences témoins conduites sur terre à l'IMBP et à l'Institut de recherche séricicole d'Ouzbékistan (URIS). Pour le premier témoin, la télémétrie a permis de maintenir la température et l'humidité au même niveau que celles régnant à bord du satellite "Bion-10" et, pour le deuxième témoin, la température et l'humidité ont été maintenues au niveau recommandé habituellement (T : 27 à 28 °C, humidité extérieure 60 à 70 %, humidité à l'intérieur des boîtes : 90 à 95 %°. Il faut noter que le test utilise des larves élevées sur un aliment artificiel et sur de nouveaux aliments dans une cellule bactériologique universelle "UNKB-1" qui n'assure pas une stérilité totale. Avant d'être placées dans les boîtes stériles, les larves ont été essuyées avec un tissu imbibé d'alcool à 70 %. Les boîtes de Pétri contenant le matériel biologique et les aliments artificiels préparés en milieu stérile ont été placés dans des boîtes en carton tapissées de mousse plastique et renforcées avec du tissu épais aussi bien pour les expériences dans l'espace que pour les expériences conduites sur terre.

RESULTATS ET DISCUSSION

"Bion-10" a été lancé de l'aire de décollage de Plisetsk le 29 décembre 1992 et a atterrit le 9 janvier 1993. L'expérience dans l'espace a donc duré 12 jours. Il est évident que le matériel biologique expérimental a été placé dans des conditions extrêmement défavorables à la vie. Néanmoins, les témoins maintenus à terre nous ont permis de tirer les conclusions suivantes, sur la base des résultats de la première expérience dans l'espace : (1) le taux de survie moyen du tétrahybride 3, d'après le résultat final, est de 78 %, ce qui correspond à peu près à celui observé chez les témoins (71 % et 74 % respectivement à l'IMBP et à l'URIS). Il convient de souligner que le rendement inférieur chez les témoins maintenus à l'IMBP est probablement dû au fait que la température, pour des raisons non déterminées, n'a pas été maintenue au même niveau que celle régnant à bord du satellite et était inférieure de 4 à 5 °C (voir Fig. 1). La dynamique d'éclosion journalière des oeufs

reste inconnue. Cependant, étant donné la taille des larves rapatriées (6 à 15 mm) et celle des larves témoins (7 à 14 mm à l'URIS), on peut en déduire que l'éclosion journalière des larves ne diffère pas de manière importante. L'éclosion en milieu terrestre a débuté au 2e jour de vol et était pratiquement terminée après 3 jours. La fourchette de taille plus importante chez les larves expérimentales pourrait être due à l'apesanteur ; cependant, à ce stade, ce n'est qu'une supposition, étayée néanmoins par la comparaison des résultats obtenus chez les larves recouvertes d'un filet et non recouvertes (fourchettes respectives des tailles : de 7 à 15 mm et de 6 à 14 mm), ceci implique que les larves sont restées en contact avec l'aliment pendant la quasi-totalité de l'expérience, voire que l'apesanteur a contribué à favoriser le contact des larves avec la nourriture.

Dans le test utilisant des larves du tétrahybride 3 au 4e âge, l'une des larves (variante 16) est morte après avoir atteint une taille de 5,7 cm tandis que l'autre est morte après avoir atteint le stade prénymphal et une taille de 3,9 cm ; on a également constaté chez cette dernière la production d'un fil de soie ressemblant au stade initial du filage du cocon. Les larves tétrahybrides de la variante 12 sont mortes toutes les deux sans avoir atteint le stade du filage. Dans ces variantes, la totalité de l'aliment a été consommée. L'abondance des excréments observée permet de conclure que les vers à soie se sont bien alimentés et sont passés par les divers stades du développement (4e stade, formation du cocon, début de la nymphose). Les résultats obtenus pour les témoins maintenus à terre permettent de clarifier quelque peu la cause de la mortalité des vers à soie. Chez le témoin maintenu à l'URIS et pour lequel les conditions étaient proches de celles régnant sur le satellite, le résultat obtenu est similaire à celui du groupe en milieu spatial : les vers à soie sont morts avant d'atteindre le stade de formation du cocon ou au début du filage. On observe un début de formation et de développement de moisissure (après 3 à 4 jours de vol) aussi bien dans les tests réalisés dans l'espace que dans les tests réalisés sur terre. Chez les témoins, les sites d'apparition des moisissures sont les excréments. On a toutes les raisons de croire que c'est la moisissure qui est responsable de la mortalité des larves étant donné que, chez les témoins IMBP pour lesquels la température était plus faible et chez lesquels aucune moisissure n'a été observée, les cocons ont été filés et un papillon est même parvenu à pondre des oeufs, bien que l'expérience ait été finie à ce moment-là.

Les résultats obtenus pour les expériences utilisant les races pures Saniish 8 et Tashkentskaya 8 sont similaires à ceux obtenus précédemment. Les larves sont mortes après avoir atteint le stade précédant la formation du cocon et utilisé pratiquement la totalité de la nourriture. Parmi les causes de mortalité, l'hypoxémie et l'inconfort peuvent être inclus dans la liste des causes énumérées plus haut car les larves ont pu se développer et atteindre une taille importante, consommant ainsi davantage d'oxygène et produisant donc davantage de dioxyde de carbone et d'excréments.

Il découle donc des informations obtenues et décrites ci-dessus (qui ne sont nullement exhaustives) que les conditions qui accompagnent la mise en orbite et le retour sur terre, à savoir : la force de gravité, l'apesanteur, la radioactivité, etc., n'entraînent pas de modification notable des instincts, des réflexes et des caractères génétiquement transmis du développement et du comportement de l'organisme. Les données obtenues lors de cette expérience nous permettent également de conclure que les problèmes liés à l'éclosion, la croissance et le développement du ver à soie au stade larvaire et post-larvaires de son cycle lors de l'utilisation d'aliments artificiels ainsi que ceux liés à la création de matériels indispensables au maintien de la vie et de systèmes sanitaires seront résolus lors de prochaines expériences réalisées à bord de satellites habités. Des expériences complémentaires sont prévues sur la possibilité d'améliorer les propriétés recherchées de cet insecte et comprennent la construction d'un équipement spécial pour permettre la reproduction du ver à soie dans des expériences dans l'espace à des fins de recherches biotechnologiques et fondamentales dans le cadre du programme "Ipaq Yuli Qoinotda". Nous espérons que ce programme trouvera le soutien nécessaire auprès du Comité national pour les explorations spatiales de la République d'Ouzbékistan, qui vient d'être mis en place.

Brief note

DOCOSAPLOID *MORUS NIGRA* L., A HIGH POLYPLOID MULBERRY

S.B. DANDIN & BASAVAIAH

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

Keywords : *Morus nigra*, docosaploidy, polyploidy.

Morus nigra L., commonly called 'black mulberry', is named after the colour of its fruit. This species is stated to be a native of Persia and hence is also called 'Persian mulberry' (Feltwell, 1990). It is cultivated in Kashmir and other parts of the world for its delicious fruits. Its fruit juice and bark have medicinal importance (Anonymous, 1962). It is a natural polyploid and occupies a unique position amongst flowering plants having high polyploidy level of docosaploidy (22-ploid) with a chromosome number of 22x = 308 (Thomas, 1942; Janaki Ammal, 1948). In addition, chromosome numbers 2n = 28 (Katsumata, 1979) and 2n = 30 (Kundu and Sharma, 1976) are also reported in this species.

Fig. 1: *M. nigra*, a tree in Kashmir.
Fig. 1 : Arbre de M. nigra *dans le Cachemire.*

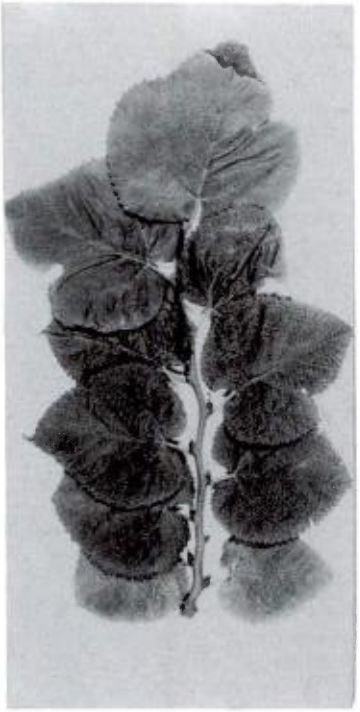

Fig. 2: A twig of *M. nigra*.
Fig. 2 : Ramille de M. nigra.

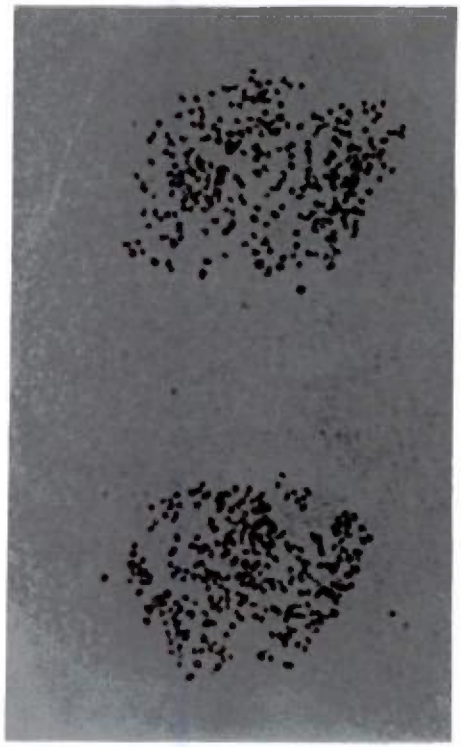

Fig. 3: Meiotic chromosomes at anaphase II (× 1500).
Fig. 3: Chromosomes méiotiques à l'anaphase II (× 1500).

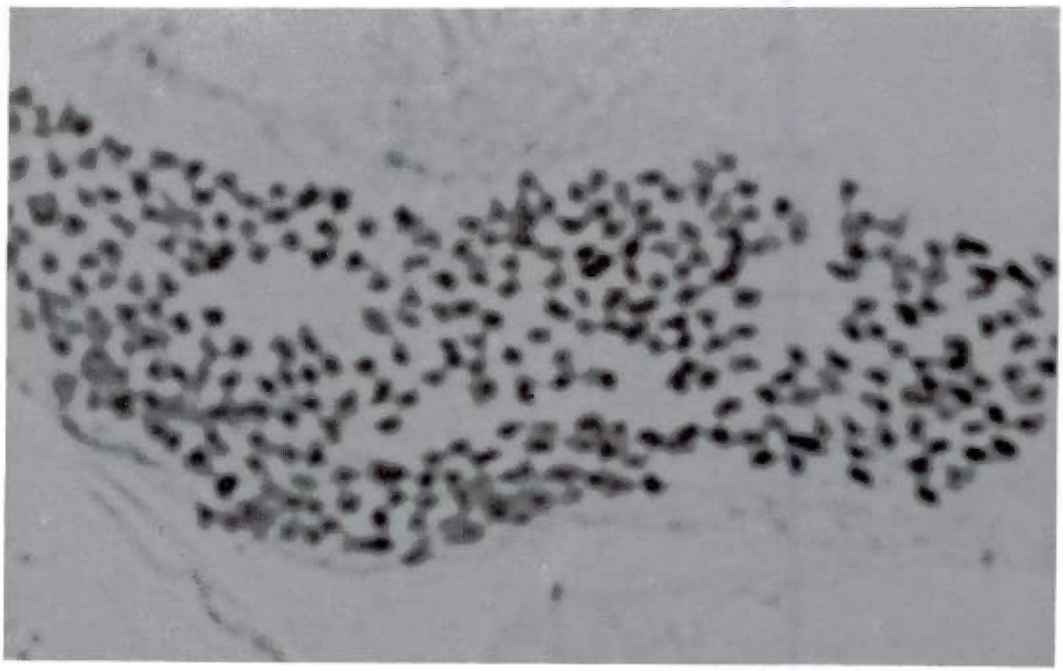

Fig. 4: Somatic chromosomes (× 4500)
Fig. 4 : Chromosomes somatiques (× 4500)

During a survey of different species of mulberry from Himalaya, this polyploid was collected from different places of Kashmir Valley. They are maintained as grafts in the mulberry germ plasm collections of the Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, and Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Bangalore. The polyploid is grown as trees and attain the height of 8-10 metres with thick broad leaves and large-sized fruits in Kashmir, (Fig 1 and 2). But its growth was found restricted to only 3-4 cooler months of the year under Karnataka conditions.

Cytological studies were made to understand the nature of chromosomal stability in this polyploid by following routine cytological techniques. Somatic chromosome counts were made in shoot tips and young leaves. Meiosis was studied in pollen mother cells. The somatic chromosome number 2n = 308 was confirmed (Fig. 3) and found constant in all the cells studied. The gametic chromosome number of n = 154 was confirmed at anaphase separations during microsporogenesis (Fig. 4). Meiosis was found regular as already reported by the authors (Basavaiah *et al.* 1990). These features clearly indicate the chromosomal stability of this high polyploid species.

The leaves of *Morus nigra* are inferior to those of *M. alba* for feeding silkworms. But its disease resistant and cold-tolerant nature is of immense value and is exploited in mulberry breeding programmes (Aliev, 1979; Tojyo, 1985). Understanding the evolutionary aspect of this high polyploid is also an interesting topic in breeding and evolution of different polyploid taxa. Since the taxonomic delimitations between different species of the genus *Morus* are not clear, it is difficult to ascertain the true diploid forms of this polyploid. Janaki Ammal (1948), based on stray polyploid races of *M. alba* and *M. cathyana*, has drawn a hypothetical scheme of interspecific hybrid origin of docosaploid *M. nigra*. However, it may be possible to understand the origin of this polyploid only when all its available chromosomal races and allied species are completely studied cytologically. Such studies are under progress at this Institute.

REFERENCES

ALIEV M.O. (1979) Use of crossing combinations of the genus *Morus* with different chromosome numbers. Genet. Sel. Az., 3, 119 - 124 (Ru).

ANONYMOUS (1962) The wealth of India. VI, 438 - 439.

BASAVAIAH, DANDIN S.B., ANIL DHAR AND SENGUPTA K. (1990) Meiosis in natural docosaploid (22x) *Morus nigra L.* Cytologia 55, 505 - 509.

FELTWELL J. (1990) The story of silk. Alan Sutton Publ. Ltd., Great Britain, p. 73.

KATSUMATA F. (1979) Chromosomes of *Morus nigra* from Java and hybridization affinity between this species and some mulberry species in Japan. J. Sericult. Sci. Japan, 48, 418 - 422.

KUNDU D. & SHARMA A. (1976) Chromosome studies in some Indian Moraceae. In recent advances in Botany. P. Kachroo ed., Bishen Singh, Mahendrapal Singh, Dehradun, p. 348 - 365.

JANAKI AMMAL E.K. (1948) The origin of black mulberry. J. Roy. Hort. Soc., 73, 117 - 120.

THOMAS P.T. (1942) Quoted by Darlington C.D and La Cour L.F. *In* The handling of chromosomes. George Allen and Unwin Ltd., London.

TOJYO I. (1985) Research of polyploidy and its application in *Morus*. JARQ, 18, 222 - 228.

Note brève

UN MURIER A POLYPLOIDIE ELEVEE, UN *MORUS NIGRA* L. DOCOSAPLOIDE

S.B. DANDIN & BASAVAIAH

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

Morus nigra L., communément appelé "mûrier noir", doit son nom à la couleur de son fruit. Il a été établi que cette espèce était originaire de Perse et est donc également appelée "mûrier perse" (Feltwell, 1990). Le mûrier noir est cultivé dans le Cachemire et dans d'autres régions du globe pour son fruit, dont le goût est excellent. Le jus de son fruit et son écorce ont un intérêt médicinal (Anonyme, 1962). C'est un polyploïde naturel qui occupe une position unique parmi les végétaux florifères en raison de son taux élevé de polyploïdie, une docosaploïdie (22-ploïde) dont le nombre de chromosomes est de 22x = 308 (Thomas, 1942 ; Janaki Ammal, 1948). On a également observé chez cette espèce les nombres de chromosomes 2n =28 (Katsumata, 1979) et 2n = 30 (Kundu et Sharma, 1976).

Dans le cadre d'une étude de différentes espèces de mûriers dans l'Himalaya, ce polyploïde a été prélevé dans différentes régions de la vallée du Cachemire. Les échantillons prélevés sont conservés sous forme de greffes dans les banques génétiques de mûriers du *Central Sericultural Research and Training Institute* de Mysore et du *Karnataka State Sericulture Research and Development Institute* de Bangalore. Ce polyploïde est cultivé dans le Cachemire sous forme d'arbres pouvant atteindre de 8 à 10 mètres de hauteur et donnant des feuilles épaisses et larges et des fruits de taille importante (Fig. 1 et 2). Néanmoins, sa croissance se limite aux 3 ou 4 mois frais de l'année dans les conditions du Karnataka.

Des études cytologiques ont été réalisées afin de comprendre la nature de la stabilité chromosomique chez ce polyploïde suivant les techniques cytologiques conventionnelles. Des numérations des chromosomes somatiques ont été faites sur les extrémités des pousses et les jeunes feuilles. La méiose a été étudiée sur les cellules mères du pollen. Il a été confirmé que le nombre de chromosomes somatiques était de 2n = 308 (Fig. 3) et était stable chez toutes les cellules étudiées. Le nombre de chromosomes gamétiques de n = 154 a été confirmé par séparations en anaphase au cours d'une microsporogenèse (Fig. 4). La méiose est régulière, comme l'ont déjà observé les auteurs (Basavaiah et coll., 1990). Ces caractéristiques indiquent que les chromosomes sont stables chez cette espèce à forte polyploïdie.

Les feuilles de *Morus nigra* sont moins appropriées à la nutrition des vers à soie que celles de *M. alba* mais sa forte résistance aux maladies et sa tolérance au froid sont d'intérêt capital et sont exploitées dans les programmes de sélection du mûrier (Aliev, 1979 ; Tojyo, 1985). La compréhension de l'aspect de l'évolution de ce polyploïde constitue également un sujet de recherche intéressant dans la sélection et l'isolement de différents taxons polyploïdes. Les délimitations taxonomiques entre différentes espèces du genre *Morus* n'étant pas bien connues, il est difficile de déterminer les formes diploïdes vraies de ce polyploïde. Janaki Ammal (1948) a établi, sur la base de races polyploïdes sauvages de *M. alba* et de *M. cathyana*, un schéma hypothétique de l'origine de la docosaploïdie chez *M. nigra* par hybridation interspécifique. Cependant, il sera possible de comprendre l'origine de cette polyploïdie seulement lorsque toutes ses races chromosomiques existantes et toutes les espèces voisines auront été soumises à des études cytologiques approfondies. Des études de ce type sont actuellement en cours dans notre Institut.

Brief note

OBSERVATIONS ON THE SURFACE ULTRASTRUCTURE OF CONIDIAL STAGE OF *CERCOSPORA MORICOLA* AND ITS INFECTION PROCESS IN MULBERRY

V.P. GUPTA[1]*, S.K. TEWARI[2], GOVINDAIAH[1], A.K. BAJPAI[1] & R.K. DATTA

1. Mulberry Pathology Laboratory. 2. Electron Microscopy Unit. Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.

The surface ultrastructure of conidial stage and infection process of ***Cercospora moricola*** *Cooke has been studied under a scanning electron microscope. The conidial morphology of* ***C. moricola*** *is found to be similar to other* ***Cercospora*** *species, however, ball-and-socket type attachment of conidia and conidiophores is also observed. The conidia of* ***C. moricola*** *germinate within 6 h after inoculation, however, 50% of the conidia are found germinating at 12 h and 80% at 18 h post-inoculation. After 48 h of inoculation, germ tubes are observed entering the leaf through stomata. The conidia show tropic response to the stomata, therefore, the germ tubes are attracted towards stomata and penetrate the leaf directly through open stomata only. No specialized penetration structures (appressoria and infection pegs) are observed in* ***C. moricola****. The conidial germ tube directly enters the stomata, but does not penetrate the epidermal cells. It is the first report on the surface ultrastructure of conidial stage of* ***C. moricola*** *and different phases of its process of infection on mulberry leaves.*

Keywords: *Cercospora moricola*, leaf spot, mulberry, SEM.

INTRODUCTION

Cercospora moricola Cooke, belonging to the class Hyphomycetes of Fungi Imperfecti, causes leaf spot disease in mulberry (*Morus* spp.; family Moraceae). It is one of the most destructive pathogens for mulberry gardens in India causing 20-25% loss by destruction of the leaf area, in addition to 5% direct leaf yield loss due to defoliation (Rangaswamy *et al.*, 1976; Sukumar and Ramalingam, 1989). Although *C. moricola* is specific to mulberry, it also causes leaf spot disease in *Ervatamia coronaria* Stapf., an ornamental shrub belonging to the family Apocyanaceae, which may play a role as a collateral host for the pathogen and help in spreading of leaf spot disease to mulberry as this shrub remains infected throughout the year (Rao and Shivanna, 1988). *C. moricola* produces brownish necrotic spots of 1-5 mm dia. surrounded by chlorotic haloes on both leaf surfaces. The infected portion becomes brittle and separated from the leaf, resulting in shot-hole formation. In severe infection, spots coalesce, resulting in yellowing and defoliation, and it badly affects the nutritive quality of mulberry leaves by reducing moisture, protein, chlorophyll and sugar contents (Rao *et al.*, 1981; Siddaramaiah and Hegde, 1990). The spot-infected leaves adversely affect the larval growth and commercial characters of cocoons when fed to the silkworms (Sikdar *et al.*, 1979).

Scant information is available on the stage of infection and penetration process of *C. moricola* in mulberry (Sukumar and Ramalingam, 1986, 1990), however, this pathogen has not yet been studied at ultrastructure level. Therefore, in the present paper an attempt has been made to understand the surface morphology of conidial stage and the infection process of *C. moricola* on mulberry leaves under the scanning electron microscope.

* Corresponding author.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials and inoculation:

Mulberry (*Morus alba* L.) var. Kanva 2 plants, susceptible to *C. moricola*, were raised from healthy cuttings, and grown in earthen pots (filled with autoclaved field soil) in a glasshouse at 26 ± 2 °C with 75% relative humidity. *C. moricola*, isolated from infected leaves, was grown on V-8 juice agar medium. The conidial suspension (1×10^6 conidia/ml) was prepared in sterile distilled water from an 8-day-old pathogen culture. Three-month-old mulberry plants of var. Kanva 2 were inoculated by atomizing with sterile distilled water alone (control) and freshly prepared conidial suspension until runoff, and each kept under a moist polyethene cover for 12 h. Leaf samples were taken at 6, 12, 18, 24, 36, 48 and 72 h post-inoculation to study the process of infection of *C. moricola* in mulberry, and then at 15 days post-inoculation to study the surface ultrastructure of sporodochia and conidia. The experiment was repeated three times in order to confirm the results.

Scanning electron microscopy:

Leaf samples were cut into 3 mm^2 pieces, fixed for 4 h in 2.5% glutaraldehyde in 0.2M sodium cacodylate buffer and dehydrated in a graded alcohol series at room temperature. The dehydrated material was dried in a critical-point drier (EMS 850) and then mounted over copper stubs with a double-side sticking tape. The mounted specimens were coated with gold (200 nm thickness) in a sputter coater (EMS 550) and examined under an electron microscope (JEOL 100CX-II ASID-4D) at 20 kv.

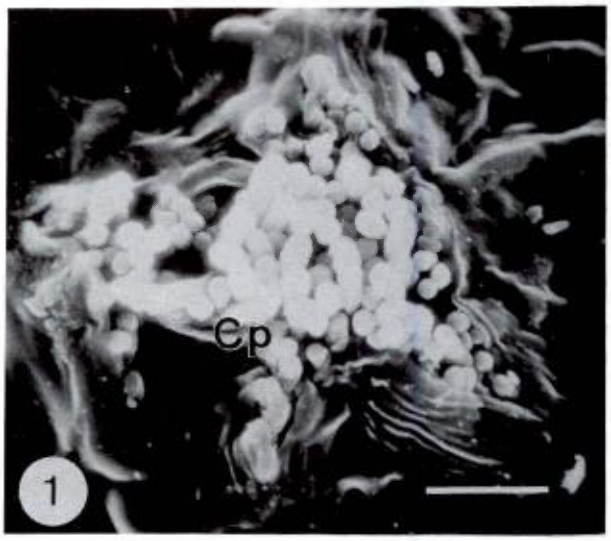

Fig. 1: Conidiophores (Cp) growing out through stomata (St).

[Bar = 5 μm].

Fig. 1 : Conidiophores (Cp) se développant par les stomates (St).

[Trait = 5 μm].

RESULTS

Symptoms started appearing after a week of inoculation in the form of very minute brownish points on the leaf surface, which later turned into discrete circular spots, having a necrotic gray centre, surrounded by chlorotic haloes. Three days after appearance of symptoms the production of conidia started on both leaf surfaces and gradually increased. The conidiophores were borne in clusters which continued to grow out mostly through stomata (Fig. 1), and sometimes by directly rupturing the epidermal layer at the base of trichomes (Fig. 2). Each conidiophore produced one conidium which was borne at its tip. The conidia were hyaline, elongate, filiform, multiseptate, and bulbous at the

point of attachment to the conidiophore, tapering slightly towards the opposite end (Fig. 3). The conidial attachment with conidiophore appeared like a ball-and-socket joint where the bulbous end of conidia (foot cell) was fitted in the cup-shaped tip of conidiophores. At maturation, foot cells of conidia came out from the socket and disperse (Fig. 4). The symptoms and conidial formation were not observed on the leaves of control mulberry plants, sprayed with sterile distilled water.

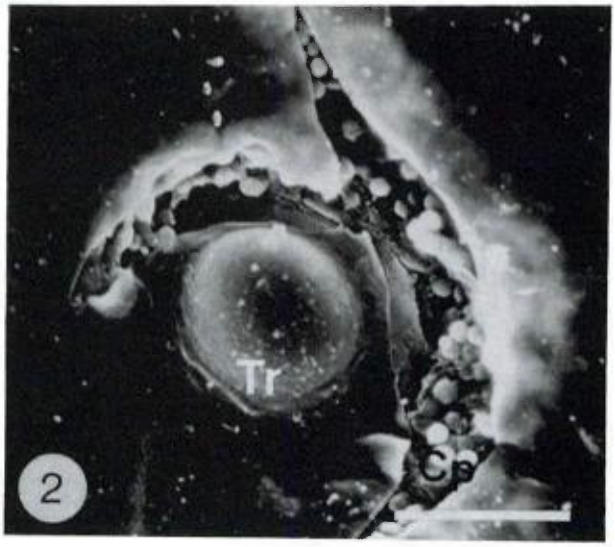

Fig. 2: Conidiophores growing out by rupturing the epidermal layer at the base of the trichome (Tr).

[Bar = 10 µm].

Fig. 2 : Conidiophores se développant en cassant la couche épidermique à la base du trichome (Tr).

[Trait = 10 µm].

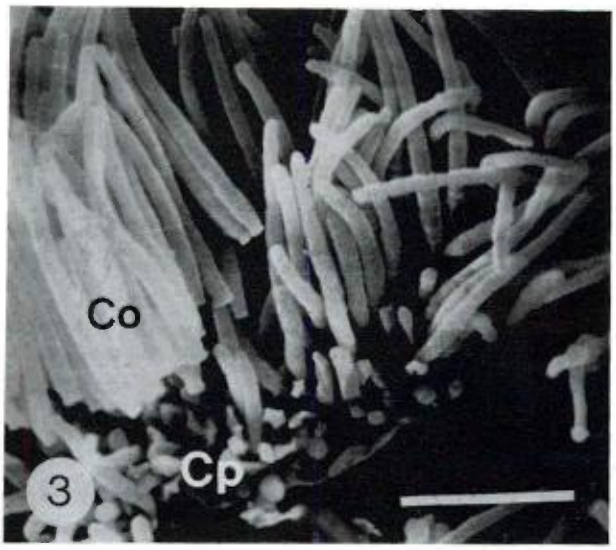

Fig. 3: Mature sporodochium on mulberry leaf showing several conidia (Co) detached from conidiophores.

[Bar = 10 µm].

Fig. 3 : Sporodochium mature sur la feuille de mûrier présentant plusieurs conidies (Co) détachées des conidiophores.

[Trait = 10 µm].

The conidia started germinating within 6 h after inoculation. However, 50% of the conidia were found germinating at 12 h and 80% at 18 h post-inoculation. Each conidium gave rise to one to several

germ tubes which grew on the leaf surface. Similar observations were recorded at 24 and 36 h post-inoculation, except an increase in the growth of germ tubes attracted towards the stomata. After 48 h of inoculation, the germ tubes were observed entering the leaf directly through open stomata without developing appressoria or any other specialized penetration structures. Only a single germ tube entered the stomata, however, it entered more than one stomates by giving rise to secondary branches (Fig. 5). The multicelled conidia of *C. moricola* quite often showed an unusual response to stomata by germinating only from those cells close to the stomatal opening and entering the stomata directly without producing the secondary branches (Fig. 6). The germ tubes did not penetrate the epidermal cells directly. Similar observations were recorded at 72 h post-inoculation, except an increase in the penetration percentage.

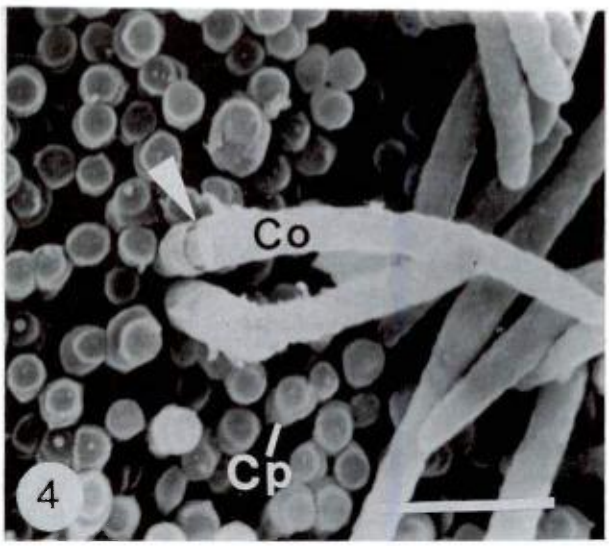

Fig. 4: Ball-and-socket attachment of conidia and conidiophores.

A conidium coming out from the conidiophore socket (arrow). Several conidiophores after shed out their conidia are seen.
[Bar = 5 μm].

Fig. 4 : Fixation par bouton-pression des conidies aux conidiophores.

Une conidie sortant de l'alvéole du conidiophore (flèche). On peut voir plusieurs conidiophores ayant perdu leurs conidies.
[Trait = 5 μm].

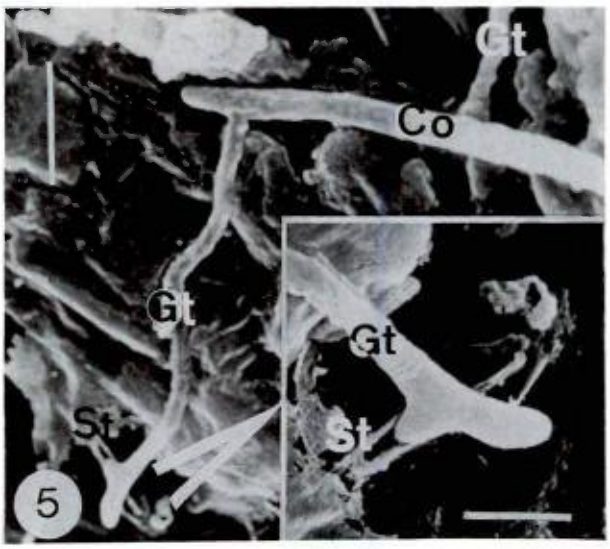

Fig. 5: Germinating conidium on mulberry leaf surface giving rise to two germ tubes (Gt). [Bar = 5 μm].

Inset: Secondary branch of germ tube entering the stomata. [Bar = 2 μm].

Fig. 5 : Conidie germant sur la surface de la feuille et produisant deux tubes germinaux (Gt). [Trait = 5 μm].

Encart : Ramification secondaire d'un tube germinal pénétrant dans le stomate. [Trait = 2 μm].

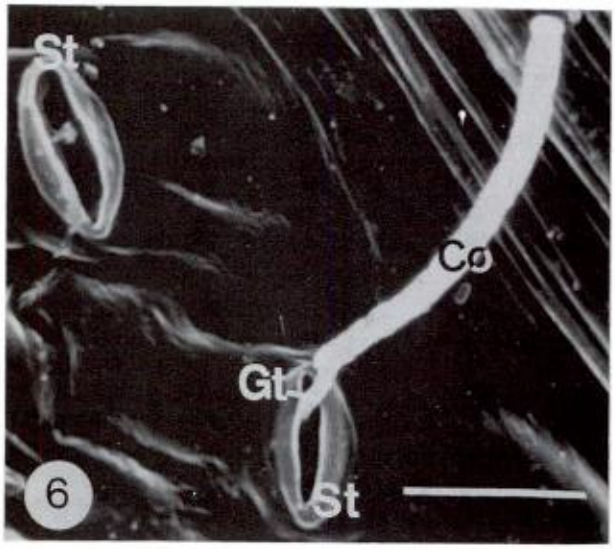

Fig. 6: Germ tube entering the open stomata without giving rise to secondary branches.

[Bar = 5 μm].

Fig. 6 : Tube germinal pénétrant dans le stomate ouvert sans produire de ramifications secondaires.

[Trait = 5 μm].

DISCUSSION

The present study reveals that the conidial morphology of *C. moricola* resembles that of other *Cercospora* species. The literature survey indicates that it is the first report on the understanding of the mechanism of conidial attachment with conidiophores in *Cercospora*. It is observed that the infection process of *C. moricola* on mulberry leaves differs from that of *C. arachidicola* and *C. beticola* causing leaf spot disease in peanut and sugar beet, respectively. *C. moricola* penetrates the mulberry leaves only through stomata, but it does not penetrate the epidermal cells directly; while *C. arachidicola* penetrates peanut leaves directly through epidermal cells as well as through stomata (Smith *et al.*, 1992). It also differs from *C. beticola* in the mode of penetration as the conidia of *C. beticola* produce appressoria over stomata for penetration (Solel and Minz, 1971), which is not observed in *C. moricola*. However, it is often observed that the germ tube grows on the leaf surface for a longer distance as it is attracted towards the stomata (Fig. 5). Further, it is also observed that the conidial cells closer to stomatal opening germinate first and the germ tubes enter the stomata without forming secondary branches (Fig. 6), which shows the tropic response of *C. moricola* conidia to the stomata. Similar observations have also been reported in *C. beticola* on sugar beet (Rathaiah, 1977). Contrary to the light microscopic observations of Sukumar and Ramalingam (1990), in the present study it was also observed that only a single germ tube entered the stomata rather than entering several germ tubes into one stomata.

REFERENCES

RANGASWAMY G., NARASIMHANA M.N., KASIVISWANATHAN K., SASTRY C.R., JOLLY M.S. (1976) Manual of Sericulture. Vol. I. Mulberry Cultivation. FAO Agric. Services Bull., FAO, UN, Rome, p. 150.

RAO B.M., SHIVANNA M.B. (1988) Cercospora leaf spot of *Ervatamia coronaria*. Curr. Sci., 57, 505.

RAO Y.R.M., KODANDARAM M.S., SRINIVASAN E.B. (1981) Effect of leaf spot disease on the composition (food contents) of mulberry (*Morus alba* L.) leaves. J. Mysore Univ., 28, 21-23.

RATHAIAH Y. (1977) Stomatal tropism of *Cercospora beticola* in sugar beet. Phytopathol., 67, 358-362.

SIDDARAMAIAH A.L., HEGDE R.K. (1990) Studies on changes in biochemical constituents of *Cercospora* infected leaves of mulberry. Mysore J. Agric. Sci., 24, 353-357.
SIKDAR A.K., SAMSON M.V., RAO Y.R.M., BAIG M., NATARAJU B. (1979) Effect of feeding leaf spot affected and fungicide sprayed leaves of mulberry (*Morus indica* L.) on silkworms (*Bombyx mori* L.). Indian J. Seric., 18, 73-77.
SMITH D.H., PAUER G.D.C., SHOKES F.M. (1992) Cercosporidium and Cercospora leaf spots of peanut. pp. 285-304. *In* Plant Diseases of International Importance. Vol. II. Chaube H.S., Singh U.S., Mukhopadhyay A.N., Kumar J. (Eds), Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
SOLEL Z., MINZ G. (1971) Infection process of *Cercospora beticola* in sugar beet in relation to susceptibility. Phytopathol., 61, 463.
SUKUMAR J., RAMALINGAM A. (1986) Epidemiology of *Cercospora* leaf spot disease of mulberry. I. Stage of infection, spots and conidial production. Sericologia, 26, 549-553.
SUKUMAR J., RAMALINGAM A. (1989) Epidemiology of *Cercospora* leaf spot disease of mulberry. III. Conidial dispersal and disease incidence. Sericologia, 29, 533-539.
SUKUMAR J., RAMALINGAM A. (1990) Epidemiology of *Cercospora* leaf spot disease of mulberry. IV. Process of penetration. Sericologia, 30, 41-45.

Note brève

OBSERVATIONS DE L'ULTRASTRUCTURE DE LA SURFACE DES CONIDIES DE *CERCOSPORA MORICOLA* ET DE SON PROCESSUS D'INFESTATION CHEZ LE MURIER

V.P. GUPTA[1]*, S.K. TEWARI[2], GOVINDAIAH[1], A.K. BAJPAI[1] & R.K. DATTA

1. Mulberry Pathology Laboratory. 2. Electron Microscopy Unit. Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, Inde.

L'ultrastructure de la surface du stade conidie et le processus d'infestation de **Cercospora moricola** *Cooke ont été étudiés au microscope électronique à balayage. La morphologie des conidies de* **C. moricola** *est similaire à celle des autres espèces de* **Cercospora** *; cependant, on observe également une fixation par bouton-pression des conidies aux conidiophores. Les conidies de* **C. moricola** *germent dans les 6 heures après l'inoculation ; cependant, 50 % des conidies germent à 12 heures et 80 % à 18 heures post-inoculation. Quarante-huit heures après l'inoculation, les tubes germinaux entrent dans la feuille par les stomates. Les conidies présentent une réaction tropique aux stomates, les tubes germinaux sont donc attirés vers les stomates et pénètrent directement dans la feuille uniquement par ces organes. Aucune structure de pénétration spécialisée (appressoriums) n'a été observée chez* **C. moricola**. *Le tube germinal de la conidie entre directement dans les stomates mais ne pénètre pas dans les cellules épidermiques. Ceci est la première observation de l'ultrastructure de la surface des conidies de* **C. moricola** *et des différentes phases de son processus d'infestation sur les feuilles de mûrier.*

INTRODUCTION

Cercospora moricola Cooke, qui appartient à la classe des Hyphomycètes des champignons Imperfecti, est responsable de la maladie de la tache chez le mûrier (*Morus* spp., famille des moracés). C'est l'un des agents pathogènes les plus destructifs des plantations de mûrier en Inde, occasionnant, outre une perte directe du rendement en feuilles de 5 % due à la défoliation, des pertes de 20 à 25 % par destruction de la surface foliaire (Rangaswamy et coll., 1976 ; Sukumar et Ramalingam, 1989). Bien que *C. moricola* soit spécifique du mûrier, il provoque également la maladie de la tache chez *Ervatamia coronaria* Stapf., arbuste ornemental appartenant à la famille des apocynacés, qui pourrait jouer un rôle comme hôte collatéral pour l'agent pathogène et aider à la propagation de la maladie de la tache sur le mûrier car cet arbuste est infesté tout au long de l'année (Rao et Shivanna, 1988). *C. moricola* produit des taches nécrotiques brunâtres de 1 à 5 mm de diamètres entourées d'auréoles chlorotiques sur les deux surfaces de la feuilles. La partie infestée devient friable et se sépare de la feuille, entraînant la formation de trous. En cas d'infestation forte, les taches fusionnent, provoquant un jaunissement et une défoliation. Outre la défoliation, ce champignon affecte gravement la qualité nutritive des feuilles de mûrier en diminuant les contenus en eau, en protéines, en chlorophylle et sucres (Rao et coll., 1981 ; Siddaramaiah et Hegde, 1990). Les feuilles infestées ont un effet négatif sur la croissance larvaire et les caractères commerciaux du cocon lorsqu'elles sont données comme aliment aux vers à soie (Sikdar et coll., 1979).

On dispose de peu d'informations sur la phase d'infestation et sur le processus de pénétration de *C. moricola* chez le mûrier (Sukumar et Ramalingam, 1986, 1990) et cet agent pathogène n'a pas

* Auteur auquel doit être adressée la correspondance.

encore été étudié au niveau ultrastructural. Dans cette étude, nous avons donc tenté de comprendre la morphologie de la surface du stade conidie et le processus d'infestation de *C. moricola* sur les feuilles de mûrier au microscope électronique à balayage.

MATERIELS ET METHODES

Plantes utilisées et inoculation :

Des plants de mûrier *Morus alba* L. var. Kanva 2, variété sensible à *C. moricola*, ont été cultivés à partir de boutures saines dans des pots en terre (remplis de terre autoclavée provenant de la plantation) dans une serre à 26 ± 2 °C et 75 % d'humidité relative. *C. moricola*, isolé à partir de feuilles infestées, a été cultivé sur un milieu V-8 agar liquide. La suspension de conidies (1 ± 10^6 conidies/ml) a été préparée dans de l'eau distillée stérile à partir d'une culture d'agents pathogènes de 8 jours. Des plants de mûriers âgés de trois mois de la variété Kanva 2 ont été inoculés par vaporisation d'eau distillée stérile seule (témoin) et de suspension fraîche de conidies jusqu'à écoulement, les plants ont été recouverts individuellement d'un tissu en polyéthylène humide et conservés pendant 12 heures. Les échantillons de feuilles ont été prélevés à 6, 12, 18, 24, 36, 48 et 72 heures post-inoculation pour étudier le processus d'infestation de *C. moricola* sur le mûrier, puis à 15 jours post-inoculation pour étudier l'ultrastructure de surface des sporodochies et des conidies. L'expérience a été répétée trois fois afin de confirmer les résultats.

Examen au microscope électronique à balayage :

Les échantillons foliaires ont été coupés en morceaux de 3 mm^2, fixés pendant 4 h dans de la glutaraldéhyde à 2,5 % dans un tampon cacodylate de sodium 0,2 M (pH 7,2), lavés à deux reprises dans un tampon cacodylate et déshydratés dans une série d'alcool à température ambiante. Le matériel déshydraté a été séché dans un séchoir à point critique (EMS 850) puis monté sur des plaques en cuivre avec une bande adhésive double-face. Les spécimens montés ont été enduits d'or (200 nm d'épaisseur) dans un appareil d'enduction à projections (EMS 550) et examinés au microscope électronique (JEOL 100 CS-II ASID-4D) à 20 kv.

RESULTATS

Les symptômes commencent à apparaître une semaine après l'inoculation sous la forme de minuscules points brunâtres sur la surface foliaire, ces points se transforment par la suite en taches circulaires discontinues avec un centre nécrotique gris et entourées par une auréole chlorotique. Trois jours après l'apparition des symptômes, la production de conidies commence sur les deux surfaces foliaires et augmente progressivement. Les conidiophores sont portés en grappes qui continuent à se développer principalement par les stomates (Fig. 1) et parfois en rompant directement la couche épidermique à la base des trichomes (Fig. 2). Chaque conidiophore produit une seule conidie située à son extrémité. Les conidies sont transparentes, allongées, filiformes, multi-cloisonnées, s'effilant légèrement à l'extrémité opposée (Fig. 3). L'attache des conidies aux conidiophores ressemble à une fixation par bouton-pression par laquelle l'extrémité bulbeuse de la conidie (cellule de base) est attachée à l'extrémité cupulaire du conidiophore. A maturité, les cellules de base des conidies se dégagent de l'emboîtement et se dispersent (Fig. 4). Les symptômes et la formation des conidies n'ont pas été observés sur les feuilles des plants de mûrier témoins, traités avec de l'eau distillée stérile.

Les conidies commencent à germer dans les 6 heures qui suivent l'inoculation. Cependant, 50 % des conidies germent à 12 heures et 80 % à 18 heures post-inoculation. Chaque conidie donne naissance à un ou plusieurs tubes germinaux qui se développe(nt) sur la surface foliaire. Des observations similaires sont enregistrées à 24 et 36 heures post-inoculation, hormis une augmentation de la croissance des tubes germinaux attirés vers les stomates. Quarante-huit heures après l'inoculation, les tubes germinaux entrent dans la feuille directement par les stomates ouverts sans développer d'appressoriums ou autres structures de pénétration spécialisées. Un seul tube germinal pénètre dans le stomate mais entre dans plusieurs stomates en développant des ramifications secondaires (Fig. 5). Les conidies de *C. moricola* présentent souvent une réaction inhabituelle aux

stomates en germant uniquement à partir des cellules situées près des orifices stomatiques et en entrant dans les stomates directement sans produire ces ramifications secondaires (Fig. 6). Les tubes germinaux ne pénètrent pas directement dans les cellules épidermiques. Les observations sont similaires à 72 heures post-inoculation, à l'exception d'une augmentation du pourcentage de pénétration.

DISCUSSION

Cette étude révèle que la morphologie des conidies de *C. moricola* ressemble à celle des autres espèces de *Cercospora*. La lecture de la documentation indique qu'il s'agit de la première étude de la compréhension du mécanisme de l'attache des conidies aux conidiophores chez *Cercospora*. Le processus d'infestation par *C. moricola* chez le mûrier diffère de ceux de *C. arachidicola* et de *C. beticola*, responsables respectivement de la maladie de la tache foliaire chez l'arachide et la betterave à sucre. *C. moricola* pénètre dans les feuilles de mûrier uniquement par les stomates et n'entre pas directement par les cellules épidermiques, tandis que *C. arachidicola* infeste les feuilles d'arachide en pénétrant directement par les cellules épidermiques et par les stomates (Smith et coll., 1992). Son mode de pénétration diffère également de celui de *C. beticola* dont les conidies produisent des appressoriums au-dessus des stomates pour permettre la pénétration (Solel et Minz, 1971), phénomène qui n'a pas été relevé chez *C. moricola*. Cependant, on observe souvent que le tube germinal se développe sur la surface foliaire sur une distance plus longue et est attiré par les stomates (Fig. 5). Les cellules des conidies voisines des orifices des stomates germent en premier et les tubes germinaux entrent dans les stomates sans former de ramifications secondaires (Fig. 6), ce qui montre la réaction tropique des conidies de *C. moricola* aux stomates. Des observations similaires ont été faites chez *C. beticola* pour la betterave à sucre (Rathaiah, 1977). Contrairement aux observations au microscope électronique léger de Sukumar et Ramalingam (1990), cette étude montre qu'un seul tube germinal entre dans le stomate et non que plusieurs tubes germinaux entrent dans un seul stomate.

Brief note

SEX DIFFERENTIATION IN THE ADULTS OF *SPHENOPTERA CUPRIVENTRIS* KERR. (COLEOPTERA : BUPRESTIDAE), A PEST OF TASAR FOOD PLANTS

K. JAIPAL REDDY[1] & G. MARUTHI RAM[2]

1. Basic Seed Multiplication and Training Centre, Vikarabad, Ranga Reddy District - 501 101, India.
2. Department of Zoology, Osmania University, Hyderabad - 500 007, India.

*Sexing the adults of **Sphenoptera cupriventris** Kerr. (Buprestidae), a stem borer of tasar food plants, **Terminalia arjuna** and **T. tomentosa**, was done on the basis of the shape of the last abdominal sternite. In females, the tip of the abdomen was narrow, whereas in males it was broad. In females, the tip of the last abdominal sternite had a deep groove, whereas in males there was no deep groove. However, there are some variations in both sexes.*

Keywords: *Sphenoptera cupriventris*, sex differentiation, last abdominal sternite.

INTRODUCTION

Sexing insects in the adult stage is essential in reproductive biology studies, behavioural studies, etc. In general, sex differentiation in insects is made on the basis of the size of the insects, shape of the antennae, wings, external genitalia or last abdominal segments (Richards and Davies, 1977). In coleopterous insects, the size of insects, as found in *Lasioderma serricorne* F. (family: Anobiidae) (Bhalodia and Chari, 1976), shape of antennae, *Cylas formicarius* F. (family: Curculionidae) (Ram *et al.*, 1980), size of antennae, *Enaphalodes rufulus* (family: Cerambycidae) (Galford, 1985), number of abdominal segments, *Cicindela* spp. (family: Cicinidellidae) (Richards and Davies, 1977), and shape of the last abdominal segment, *Hesperophanes campestris* (Faldermann) (family: Cerambycidae) (Iwata and Yamada, 1990) are taken into consideration for separating sexes.

In Buprestidae, males and females are similar in appearance as well as in size (Lefroy, 1909). In *Sphenoptera cupriventris* Kerr., both the male and the female insects are of the same size. For studying the reproductive biology of this serious pest of Asan, *Terminalia tomentosa*, and Arjun, *T. arjuna*, which are tasar silkworm primary food plants, the differentiation of sexes is required. In the present communication, one clear-cut difference in male and female adult beetles is observed and reported.

MATERIALS AND METHODS

The adult beetles were collected from a tasar silkworm rearing field, located at Mudmiyal Village of the Basic Seed and Multiplication Centre, Vikarabad, from the primary tasar food plants and brought to the laboratory. They were maintained in meshed cages measuring 24″ × 14″ × 12″ and were provided with *T. arjuna* twigs as food material daily. The adult beetles were carefully examined under a stereo binocular microscope to study differences between males and females. Later, dissections of the reproductive organs were carried out for confirmation of the studies.

RESULTS AND DISCUSSION

Male and female insects are of similar sizes (about 12-16 mm in length and 4-6 mm in width). Antennae are of serrate type and 11 segmented and they are also alike in the male and female insects. On examination of the wings, no clear-cut differences could be observed. In both sexes, the external genitalia are not visible externally and get exposed only on pressing. This procedure damages the insect. Ultimately, the last abdominal sternite was carefully observed to study any differentiation.

On close observation, in a typical condition, it was found that the last abdominal sternite in the male is broad with a slight concavity at the posterior extremity (Fig. 1 and 3b). In the female, the last abdominal sternite is narrow with a deep, small concavity at the posterior extremity (Fig. 2 and 3a). However, there are some variations within the same sex. In some females, this concavity was not so deep (Fig. 4b), while in certain cases there were two very small grooves (Fig. 4a) and in a few more cases the concavity was almost absent (Fig. 4c). Whatever the condition of the posterior extremity of the last sternite, the last abdominal sternite was always found to be narrow in female insects.

Fig. 1:

The last abdominal sternite of the male showing a broad end (arrow) (20 ×).
Dernier sternite abdominal chez le mâle présentant une extrémité élargie (flèche) (20 ×).

Fig. 2:

The last abdominal sternite of the female showing a narrow end (arrow) (20 ×).
Dernier sternite abdominal chez la femelle présentant une extrémité étroite (flèche) (20 ×).

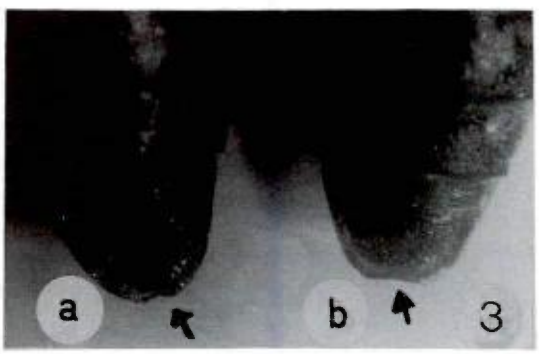

Fig. 3:

a: Last abdominal sternite of a female showing a deep grove (arrow) (13 ×).
b: Last abdominal sternite of a male showing a broad end (arrow) (13 ×).
a *: Dernier sternite abdominal d'une femelle présentant une rainure profonde (flèche) (13 ×).*
b *: Dernier sternite abdominal d'un mâle présentant une extrémité élargie (flèche) (13 ×).*

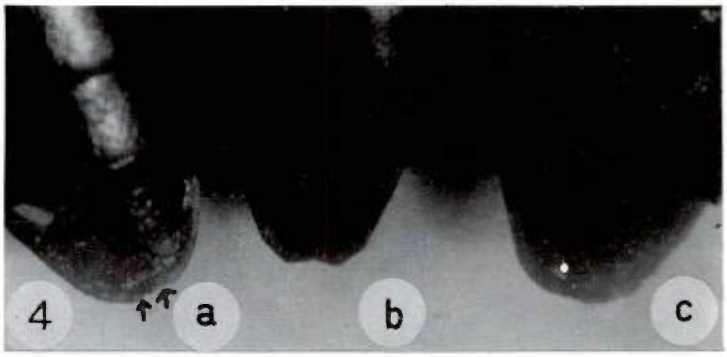

Fig. 4:

a: The posterior extremity of the last abdominal sternite with 2 small grooves (arrows) (13 ×) of the female insect.
b: The concavity (groove) is not as deep as that found in the typical condition (13 ×) of the female insect.
c: Concavity is almost absent in the female insect (13 ×).
a *: Extrémité postérieure du dernier sternite abdominal d' un insecte femelle présentant deux petites rainures (flèches) (13 ×).*
b : La concavité (rainure) n' est pas aussi profonde que celle observée en condition normale chez l' insecte femelle (13 ×).
c : La concavité est pratiquement absente chez l' insecte femelle (13 ×).

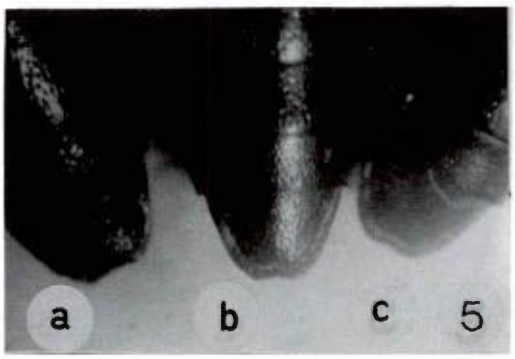

Fig. 5: Figure showing slight variations in the concavity of the male insect (13 ×).
Fig. 5 : La concavité présente de légères variations chez l'insecte mâle (13 ×).

Similarly, male insects also had some variations. In these insects, the degree of concavity varied (Fig. 5a, 5b and 5c) in the last abdominal sternite. Yet, male insects always had a broad last abdominal sternite.

A similar observation was reported by Iwata and Yamada (1990) in the cerambycid beetle, *Hesperophanes campestri*. In this insect also, the last abdominal sternite is broad in males and narrow in females.

After separation of sexes based on the above criterion, dissections were carried out for reproductive organs and the sexes were confirmed.

The separation of sexes requires some careful examination and practice.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to acknowledge Prof. (Mrs) Devamma Ramnivas, Head, Department of Zoology, for providing laboratory facilities and encouragement. They are also thankful to Dr R.K. Anand, IARI, New Delhi, for identifying the study insect and one of the authors (K.J. REDDY) is thankful to the Member Secretary, Central Silk Board, Bangalore, for sanctioning study leave for Ph.D. degree.

REFERENCES

BHALODIA N.K., CHARI M.S. (1976) Bionomics of cigarette beetle, *Lasioderma serricorne* F. (Anobiidae: Coleoptera). GAU Res. J., 2(1), 5-14.

GALFORD J.R. (1985) *Enaphalodes rufulus*. *In* Handbook of Insect Rearing. Ed. Pritam Singh and R.F. Moore, Elsevier, Publication, Amsterdam, Vol. 2, pp. 255-268.

IWATA R., YAMADA F. (1990) Notes on the biology of *Hesperophanes campestris* (Faldermann) (Col., Cerambycidae), drywood borer in Japan. J. Materials and Organisms, 25(4), 305-313.

LEFROY H.M. (1909) Indian Insect Life. Thacker, Spink and Co., Calcultta and Simla, 786 pp.

RAM G.M., KRISHNAN RAO B., THAKUR S.S., JUDSON P., RAJ N.S. (1980) Sexing the pupae of sweet potato weevil, *Cylas formicarius* F. (Coleoptera: Curculionidae). J. Anim. Morphol. Physiol., 27(1 & 2), 312-314.

RICHARDS O.W., DAVIES R.G. (1977) Imm's General Textbook of Entomology. Chapman and Hall Ltd., London and New York, 1354 pp.

Note brève

DIFFERENCIATION DES SEXES CHEZ LES ADULTES DE *SPHENOPTERA CUPRIVENTRIS* KERR. (COLEOPTERA : BUPRESTIDAE), PARASITE DES PLANTES NOURRICIERES TASAR

K. JAIPAL REDDY[1] & G. MARUTHI RAM[2]

1. Basic Seed Multiplication and Training Centre, Vikarabad, Ranga Reddy District - 501 101, Inde.
2. Department of Zoology, Oamania University, Hyderabad - 500 007, Inde.

*Le sexage des adultes de **Sphenoptera cupriventris** Kerr. (Buprestidae), térébrant de la tige des plantes nourricières tasar **Terminalia arjuna** et **T. tomentosa**, a été réalisé sur la base de la forme du dernier sternite abdominal. Chez les femelles, l'extrémité de l'abdomen est étroit tandis que, chez les mâles, il est large. Chez les femelles, l'extrémité du dernier sternite abdominal présente une rainure profonde, qui est absente chez les mâles. Cependant, il y a des variations à l'intérieur d'un même sexe.*

INTRODUCTION

Le sexage des insectes au stade adulte est essentiel dans l'étude de la biologie de la reproduction, l'étude du comportement, etc. En général, la différenciation des sexes chez les insectes est faite sur la base de la taille des insectes, la forme des antennes, des ailes, des parties génitales externes ou des derniers segments abdominaux (Richards et Davies, 1977). Chez les coléoptères, le sexage des insectes est réalisé en fonction de la taille des insectes, comme chez *Lasioderma serricorne* F. (famille des anobiidés) (Bhalodia et Chari, 1976), la forme des antennes, comme chez *Cylas formicarius* F. (famille des curculionidés) (Ram et coll., 1980), la taille des antennes, comme chez *Enaphalodes rufulus* (famille des cérambycidés) (Galford, 1985), le nombre de segments abdominaux, comme chez *Cicindela* spp. (famille des cicinidellidés) (Richards et Davies, 1977) et la forme du dernier segment abdominal, comme chez *Hesperophanes campestris* (Faldermann) (famille des cérambycidés) (Iwata et Yamada, 1990).

Chez les buprestidés, les mâles et les femelles sont d'apparence et de taille identiques (Lefroy, 1909). Chez *Sphenoptera cupriventris* Kerr., les insectes mâles et femelles sont également de même taille. Pour étudier la biologie de reproduction de ce parasite, qui provoque des dommages importants sur Asan (*Terminalia tomentosa*) et Arjun (*T. arjuna*), qui sont les plantes nourricières primaires du ver à soie tasar, il est nécessaire de différencier les sexes. Dans cette étude, une différence distinctive entre les coléoptères adultes mâles et femelle est identifiée et décrite.

MATERIELS ET METHODES

Les coléoptères adultes ont été prélevés dans la plantation d'élevage tasar située au village de Mudmiyal du *Basic Seed Multiplication and Training Centre* de Vikarabad sur des plantes nourricières primaires tasar et transférés en laboratoire. Ils ont été conservés dans des cages à mailles mesurant 24″ × 14″ × 12″ et ont été nourris avec des brindilles de *T. arjuna* quotidiennement. Les coléoptères adultes ont été soumis à un examen approfondi au microscope binoculaire afin d'étudier

les différences entre les mâles et les femelles. Les organes de reproduction ont ensuite été disséqués pour confirmer les observations.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les insectes mâles et femelles sont de taille identique (environ 12 à 16 mm de long et 4 à 6 mm de large). Les antennes sont dentées en scie, présentent 11 segments et sont également identiques chez les mâles et chez les femelles. L'examen des ailes ne révèle pas non plus de différence distincte. Chez les deux sexes, les parties génitales externes ne sont pas visibles de l'extérieur et sont exposées uniquement par pression, action qui endommage l'insecte. Finalement, nous avons examiné le dernier sternite abdominal de manière approfondie afin d'observer la présence éventuelle d'une différenciation.

L'observation minutieuse en conditions typiques révèle que le dernier sternite abdominal du mâle est plus large et légèrement concave à l'extrémité postérieure (Fig. 1 et 3b). Chez la femelle, le dernier sternite abdominal est étroit, avec une concavité profonde et étroite à l'extrémité postérieure (Fig. 2 et 3a). Cependant, on observe des variations à l'intérieur d'un même sexe. Chez certaines femelles, cette concavité est moins profonde (Fig. 4b), tandis que, dans certains cas, on observe deux petites rainures (Fig. 4a) et, dans d'autres cas, la concavité est pratiquement absente. Quelle que soit la forme de l'extrémité postérieure du dernier sternite, il est toujours étroit chez les insectes femelles.

De même, les insectes mâles présentent des variations. Chez ces insectes, le degré de concavité du dernier sternite abdominal varie (Fig. 5a, 5b et 5c). Cependant, leur dernier sternite abdominal est toujours large.

Des observations similaires ont été décrites par Iwata et Yamada (1990) chez le coléoptère cérambycidé *Hesperophanes campestris*. Chez cet insecte, le dernier sternite abdominal est large chez le mâle et étroit chez la femelle.

Après séparation des sexes sur la base de ce critère, des dissections, réalisées afin de vérifier les organes de reproduction, ont permis de confirmer la nature des sexes.

La séparation des sexes nécessite un examen approfondi et de la pratique.

Brief note

MEGACHALCIS FUMIPENNIS CAMERON (HYMENOPTERA: CHALCIDIDAE), A LARVAL PARASITE OF THE STEM BORER, *SPHENOPTERA CUPRIVENTRIS* KERR. (COLEOPTERA : BUPRESTIDAE)

K. JAIPAL REDDY[1], G. MARUTHI RAM[2] & M.K. SINGH[1]

1. Basic Seed Multiplication and Training Centre, Vikarabad, Ranga Reddy District - 501 101, India.
2. Department of Zoology, Osmania University, Hyderabad - 500 007, India.

*Different larval stages of the parasite, **Megachalcis**, are found in the pupal stages of the stem borer, **Sphenoptera cupriventris**, which is a serious pest of tasar food plants, **Terminalia arjuna** and **T. tomentosa**. Pupal and adult stages of the parasite were found in the vicinity of the remains of the **Sphenoptera** pupae near the exit holes on the stem. Thus, **Megachalcis** could be an effective biological control agent of the stem borer, **Sphenoptera cupriventris**.*

Keywords: Tasar food plants, stem borer, *Sphenoptera*, chalcid parasite, *Megachalcis*.

In the Mudmiyal tasar silkworm rearing field of the Basic Seed Multiplication and Training Centre, Vikarabad, Andhra Pradesh, the tasar primary food plants, *Terminalia arjuna* W. & A. and *T. tomentosa* W. & A., were heavily infested with stem borers, *Sphenoptera cupriventris* Kerr. (Coleoptera: Buprestidae). While removing the larval and pupal stages of this buprestid beetle from the tunnels and exit holes made in the food plants in the months of May and June, 1992, some infested pupae were observed. Microscopic examination of these infested pupae revealed about 30-40 larvae of different sizes of this parasite present inside the pupae. Furthermore, some pupae and adults of the parasite were also detected in the tunnels in close proximity to the remains of their hosts. The pupae of the parasite moulted into adults within 10-15 days on observation in the laboratory. These parasites were found in the pupae of the stem borers which were present only in completely dried plants.

The eggs of the parasite could not be seen. However, larvae of different age groups, prepupae, pupae and freshly moulted adults were found inside the pupae or at the close proximity of the remains of host pupae.

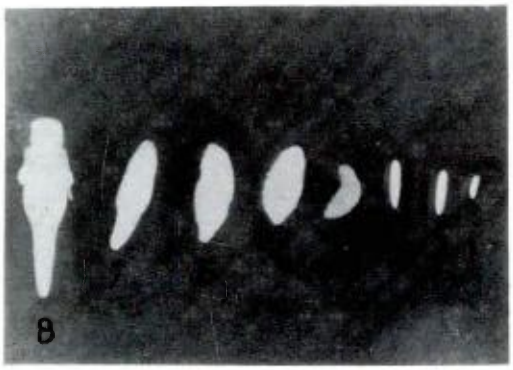

Fig. 1: Different stages of larvae (1-4), prepupae (5 and 6) and pupae (7 and 8) (1×).

Fig. 1 : Larves (1 à 4), prépupes (5 et 6) et pupes (7 et 8) à différents stades (1×).

Larvae of the parasite are cylindrical with a small head and 13 trunk segments, while the prepupae are stumpy and blunt at both ends (Fig. 1). Pupae are tapering at the posterior end and blunt and broader at the anterior end (Fig. 2). The adult females have a long ovipositor and males have a very short pointed last abdominal segment (Fig. 3). Wings are transparent, hind femora swollen, antennae elbow-shaped and 13 segmented and the colour of the insects is black. The different sizes of larvae, prepupae, pupae and adults are given in Table I.

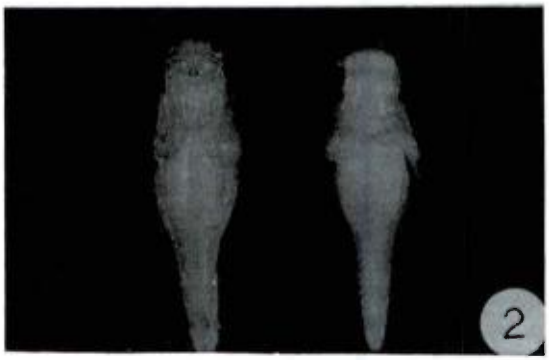

Fig. 2: Pupae (enlarged 2×).

Fig. 2 : Pupes (agrandissement × 2).

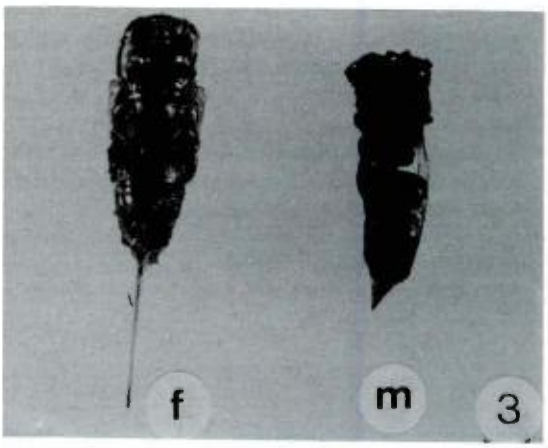

Fig. 3: Adults: male (m) without the sting and female (f) with the ovipositor or sting (2.5 ×).

Fig. 3 : Adultes: mâle (m) sans dard et femelle (f) avec ovipositeur ou dard (2,5 ×).

The chalcids are known to attack lepidopterous, coleopterous and hymenopterous insects and, since these orders contain most of the crop pests, it can be seen that the chalcids are a very beneficial group in that they aid in keeping the pests in check (Borror and DeLong, 1964; Essig, 1974; Jonathan, 1986).

Megachalcis is a primary parasite since it attacks the phytophagous pest (stem borer), endoparasite since it lives inside the body of the host. Superparasitism is exhibited by this parasite as 30-40 larvae of different sizes and age groups are seen inside the body of a single host. However, only

This shows that after a certain period of time they eat away one another and finally very few (2-5) are able to pupate in the tunnels near the exit holes.

Table I. Average sizes of larvae, pupae and adults of *Megachalcis fumipennis*.

***Tableau I. Taille moyenne des larves, des pupes et des adultes de* Megachalcis fumipennis.**

Stage *Stade*	Size/Sex *Taille/Sexe*	Length (mm) *Longueur (mm)*	Breadth (mm) *Largeur (mm)*
Larva / *Larve*	Small / *Petite*	7.73 (± 0.35)	0.625 (± 0.1)
Larva / *Larve*	Medium / *Moyenne*	4.02 (± 0.5)	0.98 (± 0.3)
Larva / *Larve*	Big / *Grande*	8.75 (± 0.95)	3.90 (± 0.6)
Prepupa / *Pré-chrysalide*	-	10.30 (± 0.1)	3.06 (± 0.1)
Pupa / *Chrysalide*	-	15.0 (± 3.45)	4.2 (± 0.9)
Adult / *Adulte*	Male / *Mâle*	9.5 (± 0.5)	3.30 (± 0.05)
Adult / *Adulte*	Female* / *Femelle**	14.0	3.0
Ovipositor only / *Ovipositeur seul*	-	4.2	0.4

* With ovipositor / *Avec ovipositeur*.
Figures given in parentheses indicate the minimum and maximum range of sizes in each category.
Les chiffres entre parenthèses indiquent les tailles minimales et maximales de chaque catégorie.

This parasite, if mass-reared successfully, could be effectively used as a biological control agent against the stem borer, *Sphenoptera cupriventris*, and possibly other borers like *Psiloptera orientalis* and *Psiloptera fastuosa* (Buprestidae) which were also found in small numbers in the field.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are highly thankful to Dr S.I. Farooqui, Taxonomist, IARI, New Delhi, for identification of the parasite. One of the authors (K. Jaipal Reddy) is thankful to the Member Secretary, Central Silk Board, for granting study leave.

REFERENCES

BORROR D.J., DELONG D.M. (1964) An introduction to the study of insects. Rinehart and Winston Inc., New York, 819 pp.
ESSIG E.O. (1947) College Entomology. The Macmillan Company, 900 pp.
JONATHAN J.K. (1986) Role of parasites and predators in biological control of insect pest and their collection and identification. *In* Collection, preservation and identification of insects and mites of economic importance. Tikader B.K. (ed.), Z.S.I., Calcutta, pp. 161-178.

Note brève

MEGACHALCIS FUMIPENNIS CAMERON (HYMENOPTERA : CHALCIDIDAE), PARASITE LARVAIRE DU TEREBRANT DE LA TIGE *SPHENOPTERA CUPRIVENTRIS* KERR. (COLEOPTERA : BUPRESTIDAE)

K. JAIPAL REDDY[1], G. MARUTHI RAM[2] & M.K. SINGH[1]

1. Basic Seed Multiplication and Training Centre, Vikarabad, Ranga Reddy District - 501 101, Inde.
2. Department of Zoology, Osmania University, Hyderabad - 500 007, Inde.

On observe différents âges larvaires du parasite ***Megachalcis*** *infestant les pupes du térébrant de la tige* ***Sphenoptera cupriventris****, parasite qui provoque des dommages importants chez les plantes nourricières tasar* ***Terminalia arjuna*** *et* ***T. tomentosa****. Ce parasite est présent aux stades nymphal et adulte à proximité des dépouilles des pupes de* ***Sphenoptera*** *près des orifices de sortie de la tige.* ***Megachalcis*** *pourrait donc constituer un agent de lutte biologique efficace contre le térébrant de la tige* ***Sphenoptera cupriventris****.*

Les plantes nourricières tasar *Terminalia arjuna* W. & A. et *T. tomentosa* de la plantation tasar de Mudmiyal du *Basic Seed Multiplication and Training Centre* de Vikarabad (Andhra Pradesh) sont fortement infestées par le térébrant de la tige *Sphenoptera cupriventris* Kerr. (Coleoptera : Buprestidae). Lorsque les larves et les pupes de ce coléoptère buprestidé ont été dégagées des tunnels et des orifices de sortie faits dans les plantes hôtes en mai et juin 1992, on a observé que certaines pupes étaient infestées. L'examen au microscope de ces pupes infestées révèle environ 30 à 40 larves de différentes tailles à l'intérieur des pupes. De plus, certaines pupes et certains adultes de ce parasite ont également été détectés dans les tunnels proches des dépouilles de leurs hôtes. Les observations en laboratoire montrent que les pupes de ce parasite se muent en adultes dans les 10 à 15 jours. Ces parasites n'infestent que les pupes des térébrants de la tige présents sur les plants complètement séchés.

Les oeufs de ce parasite n'ont pas été détectés. Cependant, des larves de différents groupes d'âges, des prépupes, des pupes et des adultes sortis de mue ont été observés à l'intérieur des pupes ou à proximité des dépouilles des pupes hôtes.

Les larves de ce parasite sont cylindriques, avec une tête de petite taille et 13 segments abdominaux, tandis que les prépupes sont de forme ramassée et arrondies aux deux extrémités (Fig. 1). La partie postérieure des pupes est de forme conique, tandis que la partie antérieure est arrondie et plus large (Fig. 2). Les femelles adultes ont un ovipositeur long et le dernier segment abdominal des mâles est très court et de forme pointue (Fig. 3). Les ailes sont translucides, le fémur postérieur est intumescent, les antennes sont de forme coudée avec 13 segments et les insectes sont de couleur noire.

Les différentes tailles des larves, des prépupes, des pupes et des adultes sont présentées dans le tableau I.

On sait que les chalcidites infestent les lépidoptères, les coléoptères et les hyménoptères. Etant donné que ces ordres comprennent la plupart des parasites de cultures, il est évident que les chalcidites constituent un groupe très intéressant dans la mesure où ils permettent de freiner ces parasites (Borror et DeLong, 1964 ; Essig, 1947 ; Jonathan, 1986).

Megachalcis est un parasite primaire, puisqu'il infeste les parasites phytophages (térébrant de la tige), endoparasite, puisqu'il vit à l'intérieur de son hôte. C'est un superparasite, puisqu'il est présent sous la forme de 30 à 40 larves de différentes tailles et différents groupes d'âge dans le corps d'un

même hôte. Cependant, seulement 2 à 3 larves ont pu être observées près des dépouilles des pupes hôtes dans le tunnel creusé par les larves de térébrant de la tige. Ceci montre que, après une certaine période, ils se mangent entre eux et seulement quelques uns d'entre eux (2 à 5) sont capable de se nymhoser dans les tunnels près des orifices de sortie.

Elevé en masse, ce parasite pourrait constituer un outil efficace dans la lutte biologique contre le térébrant de la tige *Sphenoptera cupriventris* et peut-être contre d'autres térébrants comme *Psiloptera orientalis* et *Psiloptera fastuosa* (Buprestidae), dont on a également observé la présence en plus petits nombres sur la plantation.

Brief note

FIRST REPORT ON *MYLLOCERUS VIRIDANUS* FABRICIUS (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) AS A PEST OF *TERMINALIA ARJUNA* BEDD. AND *TERMINALIA TOMENTOSA* W. & A.

P.K. MISHRA, R.N. SINGH, J. JAYSWAL & K. THANGAVELU

Central Tasar Research & Training Institute, Piskanagri, Ranchi - 835303, Bihar, India.

Keywords: New pest, weevil, arjun, asan.

The tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Drury, primarily feeds on *Terminalia arjuna* Bedd. (arjun) and *Terminalia tomentosa* W. & A. (asan). During the studies on the pest population of *T. arjuna* and *T. tomentosa* at the Central Tasar Research & Training Institute's Field Laboratory, Nagri, Ranchi, Bihar, *Myllocerus viridanus* Fabricius was observed causing extensive damage to the leaves of arjun and asan. Extent of the damage to the foliage was recorded at about 15 to 20%.

The adult weevils feed on the leaves of arjun and asan throughout the day. They feed on the petioles from the margins. In case of severe attack, the weevils consumed the whole petiole leaving small patches of petiole, median vein and side veins. The weevils usually appeared during June. Weevils appeared soon after pre-monsoonic showers and fed continuously till middle of October. Peak period of infestation was recorded to be July to September with an average presence of 25 to 30 weevils per twig. Larvae and pupae remained in soil and fed on secondary and tertiary rootlets of tasar food plants.

The weevils were 3.25 to 4.5 mm in length and 1,5 to 2,25 mm in breadth. The derm of the weevil was black with dense uniform light green scaling, varying pale greenish and white. The head was usually tinged with yellow and metallic green scales at the apex of the rostrum. Antennae were black or piceous. Legs were black with green scaling. The weevil has been reported to be distributed throughout tropical India (Marshall, 1916).

It has been recorded as a pest of *Tectona grandis* (Stebbing, 1914), on groundnut, plumago, hibiscus, jute (Marshall, 1916), cashewnut (Basheer and Jayraj, 1964; Browne, 1968; Babu *et al.*, 1983), *Tamarindus indica* (Karim, 1960), moringa or drumstick plant, *Moringa oliefera* (Subramanian, 1965), and pearl millet (Jotwani and Butani, 1978).

This is the first report on *M. viridanus* as a pest of *T. arjuna* and *T. tomentosa.*

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Dr M.L. Thakur, Head, Division of Entomology, Forest Research Institute, Dehradun, for taxonomic identification of the specimen.

REFERENCES

BABU R.S.H., RATH S., RAJPUT C.B.S. (1983) Insect pests of cashew in India and their control. Pesticides, 17(4), 8-16.

BASHEER M., JAYRAJ S. (1964) Cashewnut pests. *In* Entomology in India, 1938-63 Silver Jubilee Number of Ind. J. Entomology, 261-266.

BROWNE F.G. (1968) Pests and diseases of forest plantation trees. An annotated list of the principal species occurring in British Commonwealth. Carendon Press, Oxford.
JOTWANI M.G., BUTANI D.K. (1978) Crop pests and their control: Pearl Millet. Pesticides, 12(2), 20-23.
MARSHALL G.A.K. (1916) The fauna of British India including Ceylon and Burma, Coleoptera, Rhynchophora, Curculionidae. Taylor and Francis, London, 301-303.
KARIM A.A. (1965) A note on the record of a few rare insects on Tamarind in South India. Sci. Cult., 31, 386-387.
STEBBING E.P. (1914) Indian forest insects of economic importance (Coleoptera). Eyre and Spottiswoods Ltd., London.
SUBRAMANIAN T.R. (1965) A note on weevils damaging Moringa. Indian J. Entomol., 27(4), 485-486.

Note brève

PREMIERE OBSERVATION DE *MYLLOCERUS VIRIDANUS* FABRICIUS (COLEOPTERA : CURCULIONIDAE) PARASITANT *TERMINALIA ARJUNA* BEDD. ET *TERMINALIA TOMENTOSA* W. & A.

P.K. MISHRA, R.N. SINGH, J. JAYSWAL & K. THANGAVELU

Central Tasar Research & Training Institute, Piskanagri, Ranchi - 835303, Bihar, Inde.

Les plantes nourricières primaires du ver à soie tasar *Antheraea mylitta* Drury sont *Terminalia arjuna* Bedd. (arjun) et *Terminalia tomentosa* W. & A. (asan). Au cours d'une étude sur la population des parasites de *T. arjuna* et *T. tomentosa* à la plantation expérimentale du *Central Tasar Research and Training Institute* de Nagri (Ranchi, Bihar), on a observé que *Myllocerus viridanus* Fabricius provoquait des dommages importants sur les feuilles d'arjun et d'asan. L'étendue des dommages s'élève à environ 15 à 20 % de la surface foliaire.

Les charançons adultes se nourrissent des feuilles d'arjun et d'asan toute la journée. Ils mangent les pétioles des marges foliaires. En cas d'infestation forte, les charançons consomment la totalité du pétiole, ne laissant que de petites plaques de pétiole, la nervure centrale et les nervures latérales. Les charançons apparaissent généralement en juin, peu après les averses précédant la mousson et se nourrissent de manière continue jusqu'à la mi-octobre. La période pic d'infestation se situe entre juin et septembre, avec une présence moyenne de 30 charançons par brindille. Les larves et les pupes restent dans le sol et se nourrissent des radicelles secondaires et tertiaires des plantes nourricières tasar.

Les charançons mesurent entre 3,25 et 4,5 mm de long et 1,5 à 2,25 mm de large. Le derme du charançon est noir et présente des écailles vert clair, uniformes et denses, allant du vert pâle au blanc. La tête présente généralement des écailles de couleur jaune et vert métallique à la pointe du rostre. Les antennes sont noires ou de couleur poix. Ce charançon est réparti sur la totalité de la zone tropicale indienne (Marshall, 1916).

Il a été observé comme parasite de *Tectona grandis* (Stebbing, 1914), de l'arachide, du plumago, de l'hibiscus, du jute (Marshall, 1916), de la noix d'acajou (Basheer et Jayraj, 1964 ; Browne, 1968 ; Babu et coll., 1983), de *Tamarindus indicus* (Karim, 1960), du moringa ou "plante baguette" *Moringa oliefera* (Subramanian, 1965) et du millet perlé (Jotwani et Butani, 1978).

Ceci est la première observation de l'infestation par *M. viridanus* de *T. arjuna* et *T. tomentosa.*

BIBLIOGRAPHIE - BIBLIOGRAPHY

Sériciculture générale 150
General sericulture

Mûrier 156
Mulberry

***Bombyx mori* : élevage, nutrition, pathologie** 164
Bombyx mori: rearing, feeding, pathology

Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie 171
Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology

Vers à soie : génétique 173
Silkworms: genetics

Vers à soie : physiologie, biochimie 179
Silkworms: physiology, biochemistry

Vers à soie : oeufs, embryologie 189
Silkworms: eggs, embryology

Vers à soie : glandes séricigènes 193
Silkworms: silkglands

Soie 194
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 abstract.

Sériciculture générale

General sericulture

Global issues in sericulture development and their relation to India.
Résultats mondiaux du développement de la sériciculture et leur liaison avec l'Inde.
BALU V.
Central Silk Board, United Mansions, 2nd Floor, 39 Mahatma Gandhi Road, Bangalore 560 001, India.
1994 International Conference on Sericulture: "Global Silk Scenario 2001", 25-29 Oct. 1994, CSR&TI, Mysore, India. 15-17. (E)

Mulberry sericulture in Tripura.
Sériciculture mûrier au Tripura.
BASUMATARY R.R., SAHAY A.
Central Tasar Research and Training Institute, PO Piska Nagri, Ranchi 835 303, Bihar, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(10), 17-19. (E)

Training of women in sericulture.
Formation des femmes en sériciculture.
BENCHAMIN K.V.
Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(9), 29-32. (E)

ICTRETS - The International Centre for Training and Research in Tropical Sericulture.
ICTRETS : le Centre internationale de Formation et de Recherche en Sériciculture tropicale.
BENCHAMIN K.V.
Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1994 International Conference on Sericulture: "Global Silk Scenario 2001", 25-29 Oct. 1994, CSR&TI, Mysore, India, 93-97. (E)

Sericulture in Andhra Pradesh by 2001.
Sériciculture en Andhra Pradesh jusqu'en 2001.
BHIDE S.
Commissioner of Sericulture, Hyderabad, Andhra Pradesh, India.
1994 International Conference on Sericulture:"Global Silk Scenario 2001", 25-29 Oct. 1994, CSR&TI Mysore, India, 125-129. (E)

The future of silk depends on the development of scientific research and the quality of international co-operation.
L'avenir de la soie repose sur le développement de la recherche scientifique et la qualité de la coopération internationale.
CHAVANCY G.
Commission séricicole internationale, 25 quai Jean-Jacques Rousseau, 69350 La Mulatière, France.
1994 International Conference on Sericulture : "Global Silk Scenario 2001", 25-29 Oct. 1994, CSR&TI, Mysore, India, 1-3. (E)

Constraint analysis of high quality cocoon and raw silk production in India.
Analyse des contraintes pour la production de cocons et de soie grège de haute qualité en Inde.
DANDIN S.B.
Karnataka State Sericulture Research Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore 560 062, India.
1994 International Conference on Sericulture:"Global Silk Scenario 2001", 25-29 Oct. 1994, CSR&TI Mysore, India, 113-119. (E)

Vocationalization of education in sericulture.
Enseignement professionnel de la sériciculture.
DANDIN S.B.
Karnataka State Sericulture Research Development Inst., Thalagattapura, Bangalore 560 062, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(11), 19-23, 33. (E)

Biotechnology signals new phase.
La biotechnologie annonce une nouvelle phase.
DATTA R.K.
Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1994 International Conference on Sericulture: "Global Silk Scenario 2001", 25-29 Oct. 1994, CSR&TI, Mysore, India, 71-78. (E)

A survey on the comprehensive management of cocoon, silk and fabric production.
Une étude de la gestion d'ensemble de la production de cocons, de soie et de tissus.
DIAO X.T.
1995 Canye Kexue, Vol. 21(1), 47-49. (C)

Demonstrations in sericulture - why and how ?
Démonstrations en sériciculture : pourquoi et comment ?
DOLLI S.S., MATTIGATTI R., IYENGAR M.N.S.
Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(12), 5-8. (E)

Sericulture extension management : vital issues.
Gestion de la vulgarisation de la sériciculture : problèmes vitaux.
DWARAKINATH R.
CADET, Bangalore, India.
1994 International Conference on Sericulture:"Global Silk Scenario 2001", 25-29 Oct. 1994, CSR&TI, Mysore, India, 99-103. (E)

Exploring wasteland for sericulture.
Exploration des terres en friches pour la sériciculture.
GANGWAR S.K., SINGH B.D.
Regional Sericultural Research Station, Vinod Villa, West End Park, Hehal, Ranchi 834 005, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(9), 33-36, 44. (E)

An analysis on economic benefit of intercropping in mulberry field in Tongxian, Zhejiang Province, China.
Une analyse sur le bénéfice économique de la culture alternée dans les mûraies à Tongxian, province de Zhejiang, Chine.
GONG L., WANG Y., TU T.S., XU J.S.
Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212 018, China.
1994 Indian J. Seric., Vol. 33(2), 195-197. (E)

Scope for large scale farming in sericulture in India.
Les fermes séricicoles de grande taille en Inde.
GOPINATH G.R.
Hemavathi Farms, Javagal, Hassan, Karnataka, India.
1994 International Conference on Sericulture: "Global Silk Scenario 2001", 25-29 Oct. 1994, CSR&TI, Mysore, India, 89-92. (E)

Districts exporting Chinese raw silk during the late Ch'ing dynasty (1868-1911).
Les districts ayant exporté de la soie grège chinoise au cours de la dernière dynastie Ch'ing (1868-1911).
GU G., UYAMA M., HAMAZAKI M.
Department of Sericulture, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029, China.
1994 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 63(5), 392-398. (J,e)

La route de la Soie en Chine.
Silk road in China.
GUEGUENIAT J.Y., QUEMENER H.
1995 Horizon Aventure Association, 22 rue Amiral Linois, 29200 Brest, France. 198 p. (F)

Sericulture in Karnataka by 2001.
La séricicultur au Karnataka jusqu'en 2001.
GUPTA A.D.
Bangalore, India.
1994 International Conference on Sericulture:"Global Silk Scenario 2001", 25-29 Oct. 1994, CSR&TI Mysore, India, 121-124. (E)

Role of NGOs in sericulture development.
Rôle des organisations non gouvernementales dans le développement de la séricicultur.
HEGDE N.G., SOHANI G.G.
BAIF Development Research Foundation, Pune, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(9), 4-6. (E)

International co-operation for sericulture development.
Coopération internationale pour le développement de la séricicultur.
HEIERLI U.
1994 International Conference on Sericulture : "Global Silk Scenario 2001", 25-29 Oct. 1994, CSR&TI, Mysore, India, 5-8. (E)

International co-operation among silk producing, processing and consuming countries.
Coopération internationale parmi les pays producteurs, transformateurs et consommateurs de soie.
HYVARINEN A.
International Trade Centre, Palais de Nations, 1211 Geneva 10, Switzerland.
1995 Indian Silk, Vol. 33(9), 7-10. (E)

Indian silk exports - growth prospects - 2001.
Exportations de soie indienne - perspectives de croissance - 2001.
JAGANNATHA RAO C.B.
Khoday Group of Industries, Bangalore, India.
1994 International Conference on Sericulture: "Global Silk Scenario 2001", 25-29 Oct. 1994, CSR&TI, Mysore, India, 61-69. (E)

Impact of sericulture on income and employment generation.
Impact de la sériciculture sur les revenus et la création d'emploi.
JAGANNATHAN N.
CMB College, Coimbatore, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(9), 11-16. (E)

Sericulture in Thailand by 2001.
Sériciculture en Thaïlande juqu'en 2001.
KANTARATANAKUL S.
Industrial Entomology Research and Development Center, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand.
1994 International Conference on Sericulture: "Global Silk Scenario 2001", 25-29 Oct. 1994, CSR&TI, Mysore, India, 51-56. (E)

Bivoltine development in India - Problems and prospects.
Le développement des bivoltins en Inde : problèmes et perspectives.
KRISHNASWAMY S.
Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1994 International Conference on Sericulture: "Global Silk Scenario 2001", 25-29 Oct. 1994, CSR&TI, Mysore, India, 23-26. (E)

Role of different agricultural enterprises in agri-business with special reference to sericulture.
Rôle des différentes entreprises agricoles dans les affaires agricoles avec une référence spéciale à la sériciculture.
MATTIGATTI R., IYENGAR M.N.S.
Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1994 Indian J. Seric., Vol. 33(2), 163-165. (E)

Prospects of sericulture industry in Tamil Nadu by 2001.
Perspectives de l'industrie sériciole au Tamil Nadu pour 2001.
MOHANTY A.R., DHAS R.A.C.
Government of Tamil Nadu, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(11), 5-10. (E)

Challenges to sericulture industry of Japan in 21st century.
Les défis à l'industrie sériciole du Japon au 21è siècle.
MURAKAMI T.
National Institute of Sericulture and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1994 International Conference on Sericulture : "Global Silk Scenario 2001", 25-29 Oct. 1994, CSR&TI, Mysore, India, 9-12. (E)

Silk exports - Indian experience.
Exportations de soie : l'expérience indienne.
NAGARAJAN L.V.
Mysore Minerals Ltd., Bangalore, India.
1994 International Conference on Sericulture: "Global Silk Scenario 2001", 25-29 Oct. 1994, CSR&TI, Mysore, India, 57-59. (E)

JICA and Indian sericulture.
L'Agence de Coopération internationale japonaise (JICA) et la sériciculture indienne.
OBITSU J.
Bivoltine Sericulture Technology Development Project in India, C/O. CSR&TI, Mysore, India.
1994 International Conference on Sericulture: "Global Silk Scenario 2001", 25-29 Oct. 1994, CSR&TI, Mysore, India, 19-21. (E)

Role of silkworm race evaluation centres.
Rôle des centres d'évaluation des races.
RAJU P.J., RAGHURAMAN R., DANDIN S.B.
KSSRDI, Sub-Station, B. R. Hills, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(10), 25-26. (E)

Bivoltine sericulture - a complimentary activity.
Sériciculture bivoltine : une activité complémentaire.
RAMAKRISHNAN S.R.
Corporate Southern Petrochemical Industries Corporation, Madras, India.
1994 International Conference on Sericulture: "Global Silk Scenario 2001", 25-29 Oct. 1994, CSR&TI, Mysore, India, 29-33. (E)

Corporate sericulture : a perspective.
Sériciculture corporative : une perspective.
RAMAKRISHNAN T.R., GUPTE S.M., KATHAVATE A.Y.
Kirloskar Brothers Limited, Pune, India.
1994 International Conference on Sericulture: "Global Silk Scenario 2001", 25-29 Oct. 1994, CSR&TI, Mysore, India, 37-42. (E)

Chemical composition and nutritional evaluation of spent silkworm pupae.
Composition chimique et évaluation nutritionnelle des chrysalides de vers à soie après dévidage.
RAO P.U.
1994 J. Agric. Food Chem., Vol. 42(10), 2201-2203. (E)

Funds management of sericulture farms.
Gestion des fonds des fermes séricicoles.
RAVEENDRA MATTIGATTI, ARUN KUMAR K.S., SRINIVASA G., MUTHYAM K.V., IYENGAR M.N.S.
Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1995 Indian Silk, Vol. 34(I), 33-35. (E)

Silk: a touch of luxury.
La soie : une touche de luxe.
RYDER M.L.
1995 Biologist, Vol. 42(2), 52-55. (E)

Sericulture in North-east.
La sériciculture dans le nord-est.
SARKAR A.N.
North-eastern Council, Shilong, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(9), 37-44. (E)

Care your silk.
Prenez soin de votre soie.
SENGUPTA T.
Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1995 Indian Silk, Vol. 34(1), 23. (E)

Meeting of new challenges in silk exports.
Nouveaux défis pour les exportations de soie.
SHARMA D.
The Indian Silk Export Promotion Council, Bombay, India.
1994 International Conference on Sericulture: "Global Silk Scenario 2001", 25-29 Oct. 1994, CSR&TI, Mysore, India, 47-50. (E)

Thai silk.
La soie thaïlandaise.
SHARPLES J.
1993 Post Books, Post Publishing Public Co. Ltd, 163 Na Ranon Road, Off Sunthorn Kosa Road, Klong Toey, Bangkok 10110, Thailand. 160 p. (E)

Post cocoon processing scenario in India.
Les traitements post-cocon en Inde.
SOMASHEKAR T.H.
Central Silk Technology Research Institute, CSB Complex, BTM Layout, Madivala, Bangalore 560 068, India.
1994 International Conference on Sericulture: "Global Silk Scenario 2001", 25-29 Oct. 1994, CSR&TI, Mysore, India, 83-87. (E)

Crop loss pattern in traditional belt of Karnataka.
Schéma de perte des récoltes dans la zone traditionelle du Karnataka.
SUBBASWAMY M.R., MUNIRATHNAM REDDY M., SINHA A.K.
Regional Sericultural Research Station, Ananthapur, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(10), 11-12. (E)

Silkworm seed production in private sectors - merits and demerits.
Production de graines de vers à soie dans le secteur privé : le pour et le contre.
THANGAVELU K.
National Silkworm Project, IV Floor, CSB Complex, BTM Layout, Hosur Road, Bangalore 560 068, India.
1994 International Conference on Sericulture: "Global Silk Scenario 2001", 25-29 Oct. 1994, CSR&TI, Mysore, India, 79-82. (E)

An outlook on sericulture.
Une perspective de la sériciculture.
TRUDEL B.
Trudel Limited, P. Box CH-8022, Zurich, Switerland.
1994 International Conference on Sericulture: "Global Silk Scenario 2001", 25-29 Oct. 1994, CSR&TI, Mysore, India, 35-36. (E)

Sericulture in Vietnam.
Sericiculture au Vietnam.
VAN N.
Union of Sericulture Enterprises of Vietnam, Lamdong, Vietnam.
1994 International Conference on Sericulture: "Global Silk Scenario 2001", 25-29 Oct. 1994, CSR&TI, Mysore, India, 45-46. (E)

Mûrier

Mulberry

Chemical composition of mulbery (*Morus alba* L.) leaves as influenced by foliar spray of urea and tricon.
Composition chimique des feuilles de mûriers (*Morus alba* L.) sous l'influence de vaporisations foliaires d'urée et de tricon.
ALI F., CHAKRABARTY B.K., NEOG M.
Assam Agricultural University, Jorhat 785 013, India.
1994 Indian J. Seric., Vol. 33(2), 149-151. (E)

Mealy bug infestation in mulberry.
Infestation de l'aleurode chez le mûrier.
ALI S.M.A.
Shaanshi Farm Care ltd., Ramasamudram, Andhra Pradesh, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(10), 15-16. (E)

The influence of vesicular arbuscular mycorrhizal association on growth, yield and nutrent uptake in some mulberry genotypes (*Morus* spp.).
L'influence de l'association mycorhize arbusculaire vésiculaire sur la croissance, le rendement et l'absorption des éléments nutritifs chez quelques génotypes de mûriers (*Morus* spp.).
AMBIKA P.K., DAS P.K., KATIYAR R.S., CHOUDHURY P.C.
Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1994 Indian J. Seric., Vol. 33(2), 166-169. (E)

Assessment of weed species in an established mulberry plantation in Terengganu, Malaysia.
Répartition des espèces de mauvaises herbes dans une mûraie établie du Terengganu, Malaysie.
ANWAR A.I.
Malaysian Agricultural Research Institute, Basic Research Division, Kuala Lumpur, Malaysia.
1994 in Proceedings of Fourth International Conference on Plant Protection in the Tropics, Kuala Lumpur, Malaysia.

Tape irrigation for mulberry garden.
Irrigation goutte à goutte dans les mûraies.
BHAT D.V.
P4 Basic Seed Farm, Hassan, India.
1995 Indian Silk, Vol. 34(1), 9-12. (E)

Evaluation of four mulberry varieties by leaf biochemical analysis and bioassay with *Bombyx mori*.
Evaluation de quatre variétés de mûrier par analyse biochimique des feuilles et dosage biologique avec *Bombyx mori*.
BONGALE U.D., CHALUVACHARI G.
1993 J. Indian Bot. Soc., Vol. 72(1/2), 59-62. (E)

A study on mulberry mosaic disease.
Une étude sur la maladie de la mosaïque chez le mûrier.
CHEN J.Y.
South China Agricultural University, Guangzhou 510 642, China.
1995 Canye Kexue, Vol. 21(1), 9-14. (C,e)

Studies on the effect of bacterial biofertilizers in irrigated mulberry (*Morus alba* L.).
Etudes de l'effet des engrais biologiques bactériens sur des mûriers irrigués (*Morus alba* L.).
DAS P.K. *et al.*
Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1994 Indian J. Seric., Vol. 33(2), 170-173. (E)

Auxin: gibberellin balance - its role in the determination of sex expression in mulberry (*Morus* spp.).
Equilibre auxine-gibbérelline : son rôle dans la détermination de l'expression du sexe chez le mûrier (*Morus* spp.).
DAS R.K., DAS C., MUKHERJEE S.K.
Regional Sericultural Research Station, Kalimpong 734 301, India.
1994 Indian J. Seric., Vol. 33(2), 188-190. (E)

Effect of mulberry leaves on lipid metabolism in rabbit fed a cholesterol diet.
Effet des feuilles de mûriers sur le métabolisme des lipides chez un lapin ayant un régime au cholestérol.
DOI K., KOJIMA T., HARADA M., HORIGUCHI Y.
1994 Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi, Vol. 47(1), 15-22. (J)

Mulberry diseases in Assam.
Les maladies du mûriers dans l'Assam.
GARGI, KUMAR R.
Regional Sericultural Research Station, Jorhat 785 006, Assam.
1995 Indian Silk, Vol. 34(1), 25-26. (E)

Role of Mg, Zn and Mo salts on *in vivo* nitrate reductase activity in leaves of *Quercus serrata* Thun.
Rôle des sels de Mg, Zn et Mo sur l'activité des nitrate-réductases *in vivo* chez les feuilles de *Quercus serrata* Thun.
GHOSH M.K., NOAMANI M.K.R., DAS P.K., BABU C.M., SRIVASTAVA R.C.
Regional Tasar Research Station, Imphal 795 002, India.
1994 Indian J. Seric., Vol. 33(2), 118-121. (E)

Role of GA3 on carbon metabolism in leaves of *Quercus serrata*, a silkmoth host.
Rôle de GA3 sur le métabolisme du carbone dans les feuilles de *Quercus serrata*, un hôte du papillon séricigène.
GHOSH M.K., SRIVASTAVA R.C.
Regional Tasar Research Station, Imphal 795 002, India.
1994 Natl Acad. Sci. Lett. (India), Vol. 17(5-6), 87-90. (E)

Field evaluation of fungicides against *Phyllactinia corylea* causing powdery mildew in mulberry (*Morus alba* L.).
Evaluation sur le terrain des fongicides utilisés contre *Phyllactinia corylea* causant le mildiou poudreux chez le mûrier (*Morus alba* L.).
GOVINDAIAH, GUNASEKHAR V., GOWDA P., THIAGARAJAN V.
Central Seric. Res. and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1994 Indian J. Seric., Vol. 33(2), 160-162. (E)

Root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* infesting mulberry - a review.
La nématode de la galle des racines *Meloidogyne incognita* infestant le mûrier : une revue.
GOVINDAIAH, SHARMA D.D.
Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1994 Indian J. Seric., Vol. 33(2), 110-113. (E)

Disease assessment keys for three major diseases of mulberry.
Clefs d'évaluation des maladies pour trois principales maladies du mûrier.
GUNASEKHAR V., GOVINDAIAH.
Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1994 Indian J. Seric., Vol. 33(2), 122-125. (e)

***Elyctranthe parasitica* (L.) Dans., an epiphyte of mulberry - a new report.**
Elyctranthe parasitica (L.) Dans., un épiphyte du mûrier : un nouveau rapport.
GUNASEKHAR V., GOVINDAIAH, BAJPAI A.K.
Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1994 Indian J. Seric., Vol. 33(2), 182. (E)

Direct NMR evidence for the equivalent participation of L phenylalanine and L tyrosine in the biosynthesis of the intermolecular Diels-Alder type adducts of prenylchacolne and prenylated 2-aryl benzofuran in *Morus alba* cell cultures.
Preuve directe par RMN de la participation équivalente de la L-phénylalanine et de la L-tyrosine dans la biosynthèse des adduits de type Diels-Alder intermoléculaires dans des cultures cellulaires de *Morus alba*.
HANI Y., NOMURA T., UEDA S.
1994 Can. J. Chem., Vol. 72(I), 12-14. (E)

A chimeric hemiterpene biosynthesis in *Morus alba* cell cultures.
Une biosynthèse d'hémiterpène chimérique dans des cultures de cellules de *Morus alba*.
HANO Y., AYUKAWA A., NOMURA T.
1994 Naturwissenschaften, Vol. 81(6), 260-262. (E)

Origin of the acetate units composing the hemiterpene moieties of chalcomoracin in *Morus alba* cell cultures.
Origine des unités d'acétate composant les parties hémiterpènes de la chalcomoracine dans des cultures de cellules de *Morus alba*.
HANO Y., AYUKAWA A., NOMURA T., UEDA S.
1994 J. of the American Chemical Society, Vol. 116, 4189-4193. (E)

The hydroxylation process on the prenylchalcones in *Morus alba* callus cultures.
Le processus d'hydroxylation sur les prenylchalcones dans des cultures de cals de *Morus alba*.
HANO Y., NOMURA T., UEDA S.
1993 Tennen Yuki Kagobutsu Tornkai Koen Yoshishu, Vol. 35, 345-352. (J)

Paralell contribution of L-phenylalanine and L-tyrosine to the biosynthesis of prenylchalcones in *Morus alba* cell cultures.
Contribution parallèle de la L-phénylalanine et de la L-tyrosine à la biosynthèse des prénylchalcones dans des cultures de cellules de *Morus alba*.
HANO Y., NOMURA T., UEDA S.
1994 Naturwissenschaften, Vol. 81(11), 507-509. (E)

Proper preservation - a must for leaf quality.
Une conservation appropriée : une nécessité pour la qualité des feuilles.
HIMANTHARAJ M.T., PHILIP T., MINEENAL A., RAJAN R.K.
Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(12), 9-11. (E)

New mulberry diseases.
Nouvelles maladies du mûrier.
JANARDHAN L., BAJAPI A.K., DATTA R.K.
Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(11), 29-30. (E)

Phenotypic and genetic characteristics of mulberry plants collected in Mexico.
Caractéristiques phénotypiques et génétiques des mûriers récoltés au Mexique.
KATAGIRI K., KUNITOMO Y.
1994 Acta Seric. Entomol., Vol. 8, 37-43. (J)

Hexaploids found in mulberry strains collected in Mexico.
Hexaploïdes trouvés dans des souches de mûriers récoltés au Mexique.
KATAGIRI K., KUNITOMO Y., ROMO DAVALOS R., IWATA E.
National Institute of Sericultural and Entomological Science, Ohwashi 1-2, Tsukaba, Ibaraki 305, Japan.
1994 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 63(5), 425-426. (E)

***In vitro* rooting and acclimatization of mulberry shoots using a membrane filter disc.**
Racinement *in vitro* et acclimatation des pousses de mûriers par utilisation d'un filtre membranaire.
KATASE M.
Chiba Sericulture Center, Togane, Chiba 283, Japan.
1994 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 63(5), 367-375. (J,e)

Protoplast culture of mulberry. 1/ Isolation of protoplasts from *in vitro* grown mulberry explant and their purification by Percoll density gradient.
Culture de protoplastes de mûrier. 1/ Isolement de protoplastes d'explants de mûriers cultivés *in vitro* et leur purification par gradient de densité Percoll.
KAWAMURA S., EBI T.
1993 Gifu-ken Sanshi Kenkyusho Yoho, Vol. 3, 47-53. (J)

Effects of high phosphorus supply on Zn and Cu uptake by mulberry (*Morus alba* L.).
Effets d'une grande quantité de phosphore sur le captage du Zn et du Cu par le mûrier (*Morus alba* L.).
LEE W.C., CHOI Y.C.
Sericultural Experiment Station, Rural Development Administration, Suwon, Korea Republic.
1993 Journal of Korean Society of Soil Science and Fertilizer, Vol. 26(4), 249-252. (K,e)

Effects of high phosphorus supply on Zn and Cu uptake by mulberry (*Morus alba* L.).
Effets d'un apport important de phosphore sur l'absorption du Zn et du Cu chez le mûrier (*Morus alba* L.).
LEE W.C., CHOI Y.C.
1993 Han'guk T'oyang Piryo Hakhoechi, Vol. 26(4), 249-252. (C)

Studies on space-planting cultivation technology in mulberry garden.
Etudes sur la technologie de la culture espacée dans les mûraies.
LIN C.B., ZHANG T.M., JIANG G.Y., ZHANG Z.P., ZHU Y.
Changzhou Diversified Economy Administration Bureau, Changzhou 213 000, China.
1995 Canye Kexue, Vol. 21(1), 1-8. (C,e)

Effect of nickel application on nutrient uptake in mulberry cuttings.
Effet de l'application du nickel sur l'absorption de nutriments par des boutures de mûriers.
LOU C.F., HOMMA S., KUNO K.
Zhenjiang Agricultural University, Hangzhou 310029, China.
1994 Canye Kexue, Vol. 20(4), 195-200. (C,e)

Determination of cytokinin during the process of mulberry seed germination.
Détermination de la cytokinine au cours de la germination des graines de mûriers.
LU X.P. *et al.*
1994 Canye Kexue, Vol. 20(4), 239-240. (C)

Effect of nitrogen on ascorbic acid content of mulberry leaves.
Effet de l'azote sur le titre d'acide ascorbique des feuilles de mûriers.
MAJUMDER S.K., DUTTA R.N., KAR R., DAS N.
Central Sericultural Research and Training Institute, CSB, Berhampore 742 101, West Bengal, India.
1994 Indian J. Seric., Vol. 33(2), 191-192. (E)

Performance of mulberry varieties under hill conditions.
Rendement des variétés de mûriers cultivés en montagne.
MASILAMANI S., NAGARAJ B., RAMESH M., THIAGARAJAN V.
Regional Sericultural Research Station, Central Silk Board, Coonoor, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(10), 5-6. (E)

Use of micronutrient formulation for better leaf production of mulberry in Darjeeling Hills.
Utilisation d'une préparation de micronutriments pour une meilleure production de feuilles de mûriers dans les collines Darjeeling.
MISRA A.K., DAS R.K., AHSAN M.M.
Regional Sericultural Research Station, Kalimpong 734 301, India.
1994 Indian J. Seric., Vol. 33(2), 131-134. (E)

Mulberry as high bush or small tree.
Mûrier en buissons hauts ou en arbustes.
NARAIN R., AWASTHI V.K., NEGI B.K., TEWARI R., KHANNA R.P.
P2 Basic Seed Farm, Sheeshambara, Dehradun, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(9), 17-19. (E)

Induction of direct somatic embryogenesis in mulberry embryos cultured *in vitro*.
Induction de l'embryogénèse somatique dans des embryons de mûriers cultivés *in vitro*.
NGUYEN T.T., KATAGIRI K.
Nuclear Research Institute, 13 Dinh Tien Hoang St., Dalat, Vietnam.
1995 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 64(1), 72-74. (E)

Induction of adventious buds in mulberry leaves by Thidiazuron.
Induction des bourgeons adventifs chez les feuilles de mûriers par le Thidiazuron.
NGUYEN T.T., KATAGIRI K.
National Institute of Sericultural and Entomological Science, Owashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1994 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 63(6), 514-516. (E)

Evaliaçao do indice de pegamento em clones de amoreira (*Morus alba* L.). / Sprouting rate evaluation in mulberry clones (*Morus alba* L.).
Evaluation du taux de germination chez les clones de mûriers (*Morus alba* L.).
OKAMOTO F. *et al.*
Centro Estadual de Pesquisa Aplicada em Seric., Inst. de Zootecnia, Rua Heitor Penteado, 56, CP 60, Nova Odessa, Brazil.
1993 Boletim de Industria Animal, Vol. 50(1), 25-29. (Pt,e)

Flavonol glycosides from the leaves of *Morus alba* L.
Les glycosides des flavones des feuilles de *Morus alba* L.
ONOGI A., OSAWA K., YASUDA H., SAKAI A., MORITA H., ITOKAWA H.
1993 Shoyakugaku Zasshi, Vol. 47(4), 423-425. (J)

Studies on the mulberry variety "Yongchonppong" (*Morus alba* L.) - (2) - Increasing effect of mulberry leaf value for food by cover rearing with vinylon gauze.
Etudes sur la variété de mûrier "Yongchonppong" (*Morus alba* L.) - (2) - Augmentation de la valeur nutritive des feuilles de mûriers par leur recouvrement par une gaze en vinyl.
PARK K.J., YANG S.Y., LEE S.U., KWON J.C., KIM Y.H., KIM K.S., CHOI Z.H.
Sericultural Experiment Station, Rural Development Administration, Suwon, Korea Republic.
1993 Korea Journal of Sericultural Science, Vol. 35(1), 21-27. (K,e)

Black leaf spot disease of mulberry - first report.
La maladie de la tache foliaire noire du mûrier : premier rapport.
PHILIP T., JANARDHAN L., GOVINDAIAH, BAJPAI A.K.
Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1994 Indian J. Seric., Vol. 33(2), 186-187. (E)

Studies on biological characters of *Diaphania pyloalis* Walker.
Etudes des caratères biologiques de *Diaphania pyloalis* Walker.
QIAN X.M. *et al.*
1995 Canye Kexue, Vol. 21(1), 50-52. (C)

Bio-slurry - a potential organic manure for mulberry.
La boue biologique - un engrais organique potentiel pour le mûrier.
RAMANJULU S., SUDHAKAR C.
Shri Krishnadevaraya University, Ananthapur, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(11), 15-18. (E)

Short-term shifts in nitrogen metabolism in mulberry *Morus alba* under salt shock.
Changements à court terme du métabolisme de l'azote chez le mûrier *Morus alba* après un choc salé.
RAMANJULU S., VEERANJANAYULU K., SUDHAKAR C.
Shri Krishnadevaraya University, Ananthapur, India.
1994 Phytochemistry, Vol. 37, 991-995. (E)

Economic micro propagation for mulberry.
Micro propagation économique du mûrier.
SHAJAHAN A., KATHIRAVAN K., GANAPATHI A.
Department of Biotechnology, School of Life Sciences, Bharathidasan University, Tiruchirappalli, Tamil Nadu, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(10), 7-8. (E)

Role of potassium in mulberry.
Rôle du potassium chez le mûrier.
SHANKAR M.A., PUTTASWAMY B., PUTTARAJU T.B., RAVI K.N., DEVAIAH M.C.
Department of Sericulture, University of Agricultural Sciences, GKVK Campus, Bangalore 560 065, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(12), 27-30. (E)

Macro and secondary nutrient status of S-54 mulberry as influenced by different sources of nitrogen.
Etat des substances nutritives secondaires et majeures du mûrier S-54 sous l'influence de différentes sources d'azote.
SHANKAR M.A., SHIVASHANKAR K.
Department of Sericulture, University of Agricultural Sciences, GKVK Campus, Bangalore 560 065, India.
1993 Mysore J. agric. Sci., Vol. 27(4), 362-366. (E)

Histochemical study on root-knots of mulberry.
Etude histochimique des galles des racines du mûrier.
SHETTY P.S., RUDRAMUNIYAPPA C.K.
1992 Indian Phytopathol., Vol. 45(3), 361-363. (E)

Mulberry weed control through herbicides.
Lutte contre les mauvaises herbes du mûrier avec des herbicides.
SHIVAKUMAR H.R., SRIDHARA S., DORESWAMY C.
Department of Agronomy, University of Agricultural Sciences, GKVK Campus, Bangalore 560 065, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(10), 13-14. (E)

Retardation of early senescence due to iron deficiency in mulberry leaves by benzyladenine and decapitation.
Retardement de la sénescence précoce due à une déficience en fer chez les feuilles de mûriers grâce à la benzyladénine et la décapitation.
SU G.S., ZHAO X., CHENG X.S., YAO S.M.
Suzhou Sericulture College, Suzhou 215 151, China.
1995 Canye Kexue, Vol. 21(1), 24-28. (C,e)

Effect of different sources of nitrogenous fertilizers on the yield and nutritive value of mulberry (*Morus alba* Linn.).
Effet des différentes sources d'engrais azotés sur le rendement et la valeur nutritive du mûrier (*Morus alba* Linn.).
SUBBARAYAPPA C.T., KENCHANNA GOWDA S.K., MUNIYAPPA T.V., MANJUNATHA S.
Department of Soil Science and Agricultural Chemistry, University of Agricultural Sciences, GKVK Campus, Bangalore 560 065, India.
1995 Mysore J. agric. Sci., Vol. 29(1), 47-53. (E)

Structure change and adequate control of mulberry field harmed by mulberry gall-midge (*Diplosis mori* Yokoyama).
Variation de la structure des mûraies touchées par le moucheron de la galle du mûrier (*Diplosis mori* Yokoyama) et lutte appropriée.
SUN R.Y., FAN K.Z., WANG L., ZHENG S.M., SONG H.Z., LIANG M.Z.
Shandong Sericultural Research Institute, Yantai 264 002, China.
1995 Canye Kexue, Vol. 21(1), 15-19. (C,e)

Portrait d'arbre : *Morus alba* L.
Portrait of a tree : *Morus alba* L.
VAUCHER H.
Chemin du Pavillon 2 A, 2502 Bienne, Switzerland.
1993 Schweiz. Beiträge zur Denrologie, Vol. 43, 4-10. (F)

Plant genetic engineering technology and perspectives of its application in mulberry.
Technologie du génie génétique des plantes et perspectives de son application chez le mûrier.
WANG Y., CHAN A.Y.
Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China.
1994 Canye Kexue, Vol. 20(4), 235-238. (C,e)

Studies on *Batocera horsfieldi* Hope injurious to mulberry and its biological characters.
Etudes sur *Batocera horsfieldi* Hope, nuisible du mûrier et ses caractéristiques biologiques.
WU K.M. *et al.*
1995 Canye Kexue, Vol. 21(1), 53-54. (C)

The distinctive form of mulberry stigma surface under electronic scanning observation.
La forme distinctive de la surface des stigmates du mûrier à l'observation au microscope électronique à balayage.
WU Y.B. *et al.*
1994 Canye Kexue, Vol. 20(4), 256. (C)

Influence of hydrogen and aluminium ions on the growth of mulberry trees.
Influence des ions hydrogène et aluminium sur la croissance des mûriers.
YAHIKOZAWA K., YAMAMOTO M., OSHIGANE K.
Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, 3-15-1 Tokida, Ueda 386, Japan.
1994 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 63(5), 407-414. (J,e)

Characteristics of mulberry trees in respect of aluminium tolerance.
Caractéristiques des mûriers vis à vis de la tolérance à l'aluminium.
YAHIKOZAWA K., YAMAMOTO M., SAITO H., FUJIMATSU H., OSHIGANE K.
Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, 3-15-1 Tokida, Ueda 386, Japan.
1994 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 63(6), 494-498. (J,e)

Changes of the cytokinin contents with the emergence of axillary buds and roots in the hard-wood cutting.
Changements des titres en cytokinine avec l'émergence des bourgeons axillaires et des racines dans les boutures de bois dur.
YANAGISAWA Y., SHIOIRI H., KUDOU T., OOKI M.
Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Tokida, Ueda 386, Japan.
1994 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 63(5), 427-430. (J)

Biological characteristics of *Macrocentrus* sp. and experiment with setting them free.
Caractéristiques biologiques de *Macrocentrus* sp. et expérience avec leur libération dans la nature.
ZHANG J.Q.
Sericultural College, Southwest Agricultural University, Beipei, Chongqing 631 716, China.
1995 Canye Kexue, Vol. 21(1), 20-23. (C,e)

Observation and control tests on mulberry rust disease occurrence.
Observation et tests de contrôle de présence de la maladie de la rouille du mûrier.
ZHANG X.Z. *et al.*
1994 Canye Kexue, Vol. 20(4), 259-260. (C)

B. mori : élevage, nutrition, pathologie

B. mori: rearing, feeding, pathology

Bacteriophages from *Bombyx mori*.
Les bactériophages de *Bombyx mori*.
ACKERMANN H.W., AUCLAIR P., BASAVARAJAPPA S., KONJIN H.P.E., SAVANURMATH C.
1994 Archives of Virology, Vol. 137, 185-190. (E)

Yet another simple device for cocooning.
Un autre encabanage simple pour le filage des cocons.
AHSAN M.M., RAJU C.S., PRAKASH N.B.V., NATH B.S.
Central Sericultural Research and Training Institute, P4 Basic Seed Farm, Hassan, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(11), 25-28. (E)

Silkworm ecdysis and its care for successful crop.
L'ecdysis du ver à soie et les soins nécessaires à un élevage réussi.
ANANTHA RAMAN K.V., MAGADUM S.B., DATTA R.K.
Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(10), 21-24. (E)

First report on the isolation of three microsporidians (*Nosema* spp.) from the silkworm, *Bombyx mori* L. in India.
Premier rapport sur l'isolement de trois microsporidies (*Nosema* spp.) du ver à soie *Bombyx mori* L. en Inde.
ANANTHALAKSHMI K.V.V., FUJIWARA T., DATTA R.K.
Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1994 Indian J. Seric., Vol. 33(2), 146-148. (E)

The developmental stages and site of infection of *Nosema bombycis* in silkworm, *Bombyx mori* L.
Les stades du développement et le site d'infection de *Nosema bombycis* chez le ver à soie *Bombyx mori* L.
ANANTHALAKSHMI K.V.V., SAMSON M.V., BAIG M., DATTA R.K.
Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1994 Indian J. Seric., Vol. 33(2), 180-181. (E)

Comparative efficacy of different disinfectants against nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) and *Beauveria bassiana* of silkworm, *Bombyx mori* L.
Comparaison de l'efficacité de différents désinfectants sur *Beauveria bassiana* et le virus de la polyédrose nucléaire chez *Bombyx mori* L.
BALAVENKATASUBBAIAH M., NATARAJU B., BAIG M., DATTA R.K.
Central Seric. Res. and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1994 Indian J. Seric., Vol. 33(2), 142-145. (E)

Effect of leaf quality on rearing and reproductive potentiality of *Bombyx mori* L.
Effet de la qualité des feuilles sur l'élevage et le potentiel de reproduction de *Bombyx mori* L.
BASU R., ROYCHOUDHURY N., SHAMSUDDIN M., SEN S.K., SINHA S.S.
Central Sericultural Research and Training Institute,CSB, Berhampore 742 101, West Bengal, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(12), 21-22. (E)

Field trial of bleaching powder solution as ovicide for control of uzifly *Exorista sorbillans* (Wiedemann) and its efficacy with benzoic acid solution (uzicide).
Essai sur le terrain d'une solution de chaux comme ovicide pour la lutte contre la mouche uzi *Exorista sorbillans* (Wiedemann) et son efficacité avec une solution d'acide benzoïque (uzicide).
CHAKRABORTY N., BHATTACHARYA S.S., KUMAR M.V.S., SHAHKUNDU A.K.
1993 Environ. Ecol., Vol. 11(3), 599-604. (E)

Artificial diet for mulberry silkworms.
Aliment artificiel pour les vers à soie du mûrier.
CHANDRAKALA M.V., SHIVAKUMAR C., SEKHARAPPA B.M.
Karnataka State Sericulture Res. and Development Inst., Thalaghattapura, Bangalore 560 062, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(12), 18-20. (E)

Toxicity test of a pesticide "Isocarbophos" on larvae of *Bombyx mori*.
Test de toxicité d'un pesticide "Isocarbophos" sur les larves de *Bombyx mori*.
CHEN X.P.
1995 Canye Kexue, Vol. 21(1), 55-56. (C)

Low cost fire burnt cocoon drying chamber.
Un séchoir à cocons, en briques réfractaires et peu coûteux.
CHOWDHURY S.K., ROY S., SHILLIN S.
Conditioning and Testing House, Central Silk Board, Malda, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(10), 33-34, 40. (E)

Comparative studies on the toxicity of some pesticides to silkworm, *Bombyx mori* L. and their effects on enzyme modulation.
Etudes comparatives de la toxicité de quelques pesticides chez le ver à soie *Bombyx mori* L. et leurs effets sur la modulation des enzymes.
EL-GENDY S.A., OSMAN K.A., ALY N.M.
1993 Alexandria Sci. Exch, Vol. 14(3), 449-465. (E)

Susceptibility of Indian races of the silkworm, *Bombyx mori*, to the nuclear polyhedrosis virus and densonucleosis viruses.
Sensibilité des races indiennes du ver à soie *Bombyx mori* au virus de la polyédrose nucléaire et aux virus de la densonucléose.
FURUTA Y.
1994 Acta Seric. Entomol., Vol. 8, 1-10. (J)

Inactivation of the nuclear polyhedrosis virus of the silkworm, *Bombyx mori*, by the cleansers.
Inactivation du virus de la polyédrose nucléaire du ver à soie *Bombyx mori* par les détergents.
FURUTA Y.
1994 Acta Seric. Entomol., Vol. 8, 11-18. (J)

Susceptibility of authorized races of the silkworm, *Bombyx mori*, to nuclear polyhedrosis virus and densonucleosis virus.
Sensibilité des races autorisées du ver à soie *Bombyx mori* au virus de la polyédrose nucléaire et au virus de la densonucléose.
FURUTA Y.
1994 Acta Seric. Entomol., Vol. 8, 29-36. (J)

Cross-infectivity of nuclear polyhedrosis viruses between silkworm, *Bombyx mori*, Japanese tusser, *Antheraea yamamai*, and Chinese tusser, *Antheraea pernyi*.
Infectiosité croisée des virus de la polyédrose nucléaire entre le ver à soie *Bombyx mori*, le tussah japonais *Antheraea yamamai* et le tussah chinois *Antheraea pernyi*.
FURUTA Y., FUKUMOTO M.
1994 Acta Seric. Entomol., Vol. 8, 19-28. (J)

Economic traits of silkworm, *Bombyx mori* L. in direct and reciprocal three-way cross hybrids.
Caractères économiques des hybrides trois voies directs et réciproques du ver à soie *Bombyx mori* L.
GOVINDAN R., MAGADUM S.B., RAYAR S.G., NARASINHARAJU R., ASHOKA J.
Department of Sericulture, University of Agricultural Sciences, GKVK Campus, Bangalore 560 065, India.
1993 Mysore J. agric. Sci., Vol. 27(2), 150-153. (E)

Observations on normal and single end peaked cocoons in some peanut cocooned bivoltine races of silkworm, *Bombyx mori* L.
Observations sur des cocons normaux et assymétriques pointus chez quelques races de cocons bivoltins cintrés du ver à soie *Bombyx mori* L.
GOVINDAN R., MAGADUM S.B., SATENAHALLI S.B., NARAYANASWAMY T.K., YELSHETTY S.
Department of Sericulture, College of Agriculture, University of Agricultural Sciences, Dharwad-580005, Inde.
1993 Mysore J. agric. Sci., Vol. 27(1), 76-81. (E)

Cross infectivity of microsporidians isolated from wild lepidopterous insects to silkworm, *Bombyx mori* L.
Infectiosité croisée des microsporidies isolées de lépidoptères sauvages sur le ver à soie *Bombyx mori* L.
KISHORE S. *et al.*
Central Seric. Res. and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1994 Indian J. Seric., Vol. 33(2), 126-130. (E)

An automatic cleaning system for use with the silkworm multi-stage circulating rearing machine.
Un système de nettoyage automatique pour les machines d'élevage de vers à soie à convoyeurs.
KOBAYASHI K.
Saitama-Ken Sericultural Experiment Station, Ishihara, Kumagaya, Saitama 360, Japan.
1994 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 63(5), 420-422. (J)

A technique for the stabilization of rearing buckets for the multi-stage circulating rearing machine.
Une technique de stablisation des hamacs des machines d'élevages circulantes pour plusieurs stades.
KOBAYASHI K., ITO I.
Saitama-Ken Sericultural Experiment Station, Ishihara, Kumagaya, Saitama 360, Japan.
1994 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 63(5), 423-424. (J,e)

Observations on some of the ethological aspects of uzifly, a parasitoid of mulberry silkworm.
Observations de quelques aspects éthologiques de la mouche uzi, un parasite du ver à soie du mûrier.
KUMAR P., KISHORE R., GIRIDHAR K., SENGUPTA K.
Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1993 Mysore J. agric. Sci., Vol. 27(2), 154-159. (E)

Research of features of fluoride pollution in the atmosphere of Zhenjiang sericultural base.
Recherche des traces de pollution au fluorure dans l'atmosphère de la base séricicole de Zhenjiang.
LIU G.Y. *et al.*
1995 Canye Kexue, Vol. 21(1), 57-58. (c)

Effect of testosterone proprionate on the economic traits of the silkworm, *Bombyx mori* L.
Effet du proprionate de testostérone sur les caractères économiques du ver à soie *Bombyx mori* L.
MAGADUM V.B., MAGADUM S.B.
Department of Zoology, Karnataka University, Karnataka, India.
1993 Korea Journal of Sericultural, Vol. 35(1), 73-76. (E,k)

A new industrial system of sericulture in Japan. Year-round production of cocoons, based on aseptic rearing system of silkworms on an artificial diet. 1/ Development of low cost artificial diets.
Un nouveau système industriel séricicole au Japon. Production annuelle de cocons, basée sur un système d'élevage aseptique des vers à soie sur milieu artificiel. 1/ Développement des milieux artificiels de faible coût.
MATSUBARA F., SUMIDA M., MORI H., CHEN R.Y., IMAMURA T.
Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Kyoto 606, Japan.
1994 Kyoto Kogei Sen'i Daigaku Sen'igakubu Gakujutsu Hokoku, Vol. 18, 49-69. (J)

An investigation of possibilities for hybrid silkworm eggs production using the industrial methods of grainage.
Une étude des possibilités de la production d'oeufs hybrides de vers à soie par les méthodes industrielles de grainage.
MLADENOV G., TSENOV P.
Sericultural Experiment Station, Mito Orozov Str. No. 24, Vratza 3000, Bulgaria.
1993 Animal Science, Vol. 30(5-6), 138-142. (Bg,e,r)

Breeding-genetic evaluation and prediction of the combining ability of Syrian silkworm breeds in crosses with Bulgarian breeds.
Evaluation de la sélection et prédiction de la capacité combinatoire des races de vers à soie syriennes croisées avec les races bulgares.
NACHEVA J., PETKOV N., MALINOVA K.
Sericultural Experiment Station, Mito Orozov Str. No. 24, Vratza 3000, Bulgaria.
1993 Genetics and Breeding, Vol. 26(4), 284-290. (Bg,e)

A marking technique for *Exorista bombycis* (louis) (Diptera : Tachnidae) by adding dye to the adult diet.
Une technique de marquage pour *Exorista bombycis* (louis) (Diptera : Tachnidae) par addition de teinture à l'alimentation de l'adulte.
NARAYANA SWAMY K.C., DEVAIAH M.C., GOCVINDAN R.
Department of Sericulture, University of Agricultural Sciences, GKVK Campus, Bangalore 560 065, India.
1993 Korea Journal of Sericultural Science, Vol. 35(1), 73-76. (E,k)

Automatic machin for silkworm rearing and use of beta ecdysone for moulting.
Machine automatique d'élevage des vers à soie et utilisation de la beta ecdysone pour la montée.
NINAKI O., MARUYAMA C., MIZUSAWA H., KOSAKAI Y., WAKABAYASHI M., MARUYAMA M.
1993 Sanshi Konchu Nogyo Gijutsu Kenkyusho Kenkyu Hokoku, Vol. 9, 7-17. (J)

Young age bivoltine silkworm rearing.
Elevage des jeunes vers à soie bivoltins.
NIRMAL KUMAR S., YAMAMOTO T.
Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1995 Indian Silk, Vol. 34(1), 7-8, 16. (E)

An application of the polymelase chain reaction for practical diagnosis of the nuclear polyhedrosis in large-scale culture of *Bombyx mori*.
Une application de la PCR pour un diagnostic pratique de la polyédrose nucléaire dans l'élevage à grande échelle de *Bombyx mori*.
NOGUCHI Y., KOBAYASHI M., SHIMADA T.
Saitama-ken Sericultural Experiment Station, Ishihara, Kumagaya, Saitama 360, Japan.
1994 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 63(5), 399-406. (J,e)

Productivity studies of silkworm (*Bombyx mori* L.) inbred line F-1071.
Etudes de la productivité de la lignée de vers à soie F-1071 (*Bombyx mori* L.).
PETKOV N., SHABALINA A.
Sericultural Experiment Station, Mito Orozov Str. No. 24, Vratza 3000, Bulgaria.
1993 Genetics and Breeding, Vol. 26(5-6), 403-410. (Bg,e)

Inhibitory effect of soyabean meal on feeding *Bombyx mori* L.
Effet inhibiteur des repas au soja sur l'alimentation de *Bombyx mori* L.
ROYCHOUDHURY N., ROYCHOUDHURY R.
Tropical Forest Research Institute, Jabalpur (M.P.), India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(10), 39-40. (E)

Flacherie in *Bombyx mori* L.
La flacherie chez *Bombyx mori* L.
SAMSON M.V.
Silkworm Seed Technology Laboratory, CSB, United Mansions, 2nd Floor, 39 Mahatma Gandhi Road, Bangalore 560 001, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(11), 31-33. (E)

Characteristics of *Bacillus thuringiensis* isolated from soil in Hokkaido area of Japan.
Caractéristiques de *Bacillus thuringiensis* prélevé dans le sol de la région d'Hokkaido au Japon.
SASAKI J., ASANO S., BANDO H., IIZUKA T.
Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan.
1994 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 63(5), 361-366. (J,e)

Breeding of fluoride resistant hypersilkgeneous variety Huafen and Xuesong.
Sélection des variétés hypersériciginènes Huafen et Xuesong résistantes au fluorure.
SHEN X.H.
Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China.
1995 Canye Kexue, Vol. 21(1), 29-37. (C,e)

Studies on the transovarian transmission in the silkworm of large microsporidia isolated from the *Phyllobrotica armata* Baly.
Etudes sur la transmission transovarienne de grandes microsporidies isolées de *Phyllobrotica armata* Baly chez le ver à soie.
SHEN Z.Y., HUANG K.W., QU L.
Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China.
1994 Canye Kexue, Vol. 20(4), 231-234. (C,e)

Cocoon number counting system by means of image processing.
Système de comptage des cocons par traitement de l'image.
SHIMIZU S., KOBAYASHI M., KUROKAWA T.
Silk Science Research Institute, 3-25-1, Hyakunincho, Shinjuku-kun Tokyo, Japan.
1994 Reports of the Silk Science Research Institute, Vol. 42, 41-46. (J)

Low-cost artificial diets for polyphagous silkworms.
Milieu artificiel à faible coût pour les vers à soie polyphages.
SHINBO H., YANAGAWA H.A.
Department of Sericulture, National Institute of Sericultural and Entomological Science, Owashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1994 JARQ, Vol. 28(4), 262-267. (E)

Management of silkworm rearing in summer.
Gestion de l'élevage des vers à soie en été.
SHIVAKUMAR G.R., HIMANTHRAJ M.T., MAGADUM S.B., GIRIDHAR K., DATTA R.K.
Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(12), 13-17. (E)

Silkworm mountages.
Les encabanages des vers à soie.
SINGH G.B.
Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1995 Indian Silk, Vol. 34(1), 13-16. (E)

Aseptic rearing of original silkworm strains on an artificial diet throughout the entire larval instars.
Elevage aseptique des souches originelles de vers à soie sur aliment artificiel tout au long des âges larvaires.
SUMIDA M., YUHKI T., CHEN R., MORI H., IMAMURA T.
Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Kyoto 606, Japan.
1995 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 64(1), 35-38. (J,e)

Determination of stability parameters and application in evaluating silkworm varieties.
Détermination des paramètres de stabilité et application à l'évaluation des variétés de vers à soie.
SUN A.Q. *et al.*
1995 Canye Kexue, Vol. 21(1), 65. (C)

DJL - a new anti-muscardine disinfectant for silkworm body and rearing bed.
DJL : un nouveau désinfectant anti-muscardine pour les vers à soie et les litières.
TAN Z.A. *et al.*
Shandong Sericultural Research Institute, Yantai 264 002, China.
1995 Canye Kexue, Vol. 21(1), 38-41. (C,e)

On the breeding and characteristics of a polyphagous silkworm race "Hitachi x Nishiki" for summer and autumn rearing.
Sélection et caractéristiques d'une race de vers à soie polyphages "Hitachi x Nishiki" pour l'élevage d'été et de printemps.
TANAKA Y., OOI H.
Institute of Silkworm Genetics and Breeding, 1054 Iikura Ami-machi, Ibaraki-ken 300-04, Japan.
1994 Reports of the Silk Science Research Institute, Vol. 42, 27-40. (J,e)

Studies on the selection of silkworm parent races adapting to artificial diet.
Etudes sur la sélection des races parentales de vers à soie adaptés à l'alimentation artificiel.
TAO M. *et al.*
Zhenjiang Silkworm Eggs-producing Farm, Zhenjiang 212018, China.
1994 Canye Kexue, Vol. 20(4), 201-205. (C,e)

Scientific method of cocoon yield estimation.
Méthode scientifique d'estimation du rendement en cocons.
THANGAVELU K.
NSSP, IV Floor, CSB Complex, BTM Layout, Madivala, Hosur Road, Bangalore 560 008, India.
1995 Indian Silk, Vol. 34(1), 29-31. (E)

Leaf-litter separator.
Séparateur de litières de feuilles.
VERMA S., JOHN M., DATTA R.K.
Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(10), 27-28. (E)

Densonucleosis of the silkworm, *Bombyx mori* L.
Densonucléose du ver à soie *Bombyx mori* L.
WATANABE H.
Nodai Research Institute, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156, Japan.
1994 Indian J. Seric., Vol. 33(2), 114-117. (E)

Double cocoons : how and why ?
Les cocons doubles : comment et pourquoi ?
YADAV P.R., RAJANNA K.L.
Silkworm Seed Technology Laboratory, Kodathi, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(10), 35-36. (E)

Utilization of steamed mulberry branch powder for an artificial diet of the silkworm, *Bombyx mori*.
Utilisation d'une poudre de branches de mûriers traitée à la vapeur pour un aliment artificiel du ver à soie *Bombyx mori*.
YANAGAWA H.A., WATANABE K., NAKAMURA M., HORIE Y.
Department of Sericulture, National Institute of Sericultural and Entomological Science, Owashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1990 Baiomasu Henkan Keikaku Kenkyu Hokoku, Vol. 25, 216-230. (J)

Studies on qualified method for inspecting *Nosema bombycis* in cocoons for egg production.
Etudes sur une méthode appropriée pour la détection de *Nosema bombycis* dans les cocons destinés à la production d'oeufs.
ZHU H.S. *et al.*
1994 Canye Kexue, Vol. 20(4), 249-250. (C)

The development of net-bag frame for acid-treatment and its application significance.
Le développement de la structure en filet à provisions pour le traitement à l'acide et la signification de son application.
ZHUANG Y.N. *et al.*
1994 Canye Kexue, Vol. 20(4), 254-255. (C)

Sériciqènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie

Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology

Role of BSMTC in tasar production and tribals' economy.
Rôle du BSMTC dans la production du tasar et l'économie tribale.
ALAM M.O. MOHAPATRA D.P.D., PATRO P.C., CHATTOPADHYAY A.
BSMTC, Baripada, India.
1995 Indian Silk, Vol. 34(1), 37-38 (E)

Reelable eri cocoons : a new chapter.
Les cocons eri dévidables : un nouveau chapitre.
CHOUDHURI C.C.
Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1995 Indian Silk, Vol. 34(1), 27-28. (E)

Muga : the unique Indian silk.
Muga : la soie uniquement indienne.
CHOWDHURY S.N.
Assam Agricultural University, Jorhat, India.
1994 International Conference on Sericulture:"Global Silk Scenario 2001", 25-29 Oct. 1994, CSR&TI Mysore, India, 105-106. (E)

Studies on oviposition behaviour in tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D.
Etudes sur le comportement au cours de l'oviposition chez le ver à soie tropical tasar *Antheraea mylitta* D.
DUBEY O.P., OJHA N.G., JAYASWAL J., THANGAVELU K.
Central Tasar Research and Training Institute, PO Piska Nagri, Ranchi 835 303, Bihar, India.
1994 Indian J. Seric., Vol. 33(2), 176-177. (E)

Studies on effect of 'Baocanning 2' on controlling thorax transparency disease in oak silkworm.
Etudes de l'effet du "Baocanning 2" utilisé pour la lutte contre la maladie de la transparence thoracique chez le ver à soie du chêne.
GUO D.R., WU Y.L., WANG Z.L.
Shenyang Agricultural University, Shenyang 110160, China.
1994 Canye Kexue, Vol. 20(4), 225-230. (C,e)

Comparison experiment of different rearing types of *Antheraea Yamamai*.
Expérience comparative de différents types d'élevages chez *Antheraea Yamamai*.
LIU C.L. *et al.*
1995 Canye Kexue, Vol. 21(1), 62-63. (C)

Toxicity of some insecticides on the larvae of red beetles, *Tricliona picea* Jacoby (Coleoptera : Chrysomelidae) - a pest of tasar food plant.
Toxicité de quelques insecticides sur les larves des scarabées rouges *Tricliona picea* Jocaby (Coleoptera : Chrysomelidae) - un parasite de la plante hôte du tasar.
MISHRA P.K., SINGH R.N., GOEL A.K., JAYASWAL J., THANGAVELU K.
Regional Sericultural Research Station, Vinod Villa, West End Park, Hehal, Ranchi 834 005, Bihar, India.
1994 Indian J. Seric., Vol. 33(2), 193-194. (E)

Indoor oak tasar silkworm rearing in north-east.
Elevage en magnanerie du ver à soie tasar du chêne dans le nord-est.
PANDEY R.K.
Purvanchal Sericulture Development Project, Varanasi, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(10), 29-31. (E)

Future of tasar silk industry in relation to forestry in India.
Le futur de l'industrie de la soie tasar en relation avec la forêt en Inde.
REMADEVI O.K., SIVARAMAKRISHNAN V.R.
Institute of Woodscience and Technology, Bangalore, India.
1995 Indian Silk, Vol.33(11), 35-38. (E)

Effect of carbendazim and chloroquine on microsporidiosis in tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Drury, and their impact on hemolymph protein recovery.
Effet du carbendazim et de la chloroquine sur les microsporidioses chez le ver à soie tasar *Antheraea mylitta* Drury et leur impact sur la régénération des protéines de l'hémolymphe.
SEXENA N.N., SHUKLA R.M., BANSAL P.K., BANERJEE N.D., GOEL A.K., THANGAVELU K.
National Silkworm Propject, IV Floor, CSB Complex, BTM Layout, Hosur Road, Bangalore 560 068, India.
1993 J. Adv. Zool., Vol. 14(2), 88-92. (E)

Pest control in tasar food plants.
Lutte contre les parasites des plantes hôtes du tasar.
SINGH R.N., KULSHRESTHA V., KARNAN P.
Central Tasar Research and Training Institute, PO Piska Nagri, Ranchi 835 303, Bihar, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(9), 26-28. (E)

Lipid concentration in the pupal hemolymph of differents races and F1's of six crosses of *Antheraea mylitta* Drury.
Concentration de lipides dans l'hémolymphe de la pupe de différentes races et chez les F1 de six croisements d'*Antheraea mylitta* Drury.
SINHA R.K., SRIVASTAVA P.P., KAR P.K., THANGAVELU K.
Central Tasar Research and Training Institute, PO Piska Nagri, Ranchi 835 303, Bihar, India.
1994 Geobios (India), Vol. 21(3), 155-159. (E)

Tasar industry in India and its current scenario.
L'industrie du tasar en Inde et son fonctionnement actuel.
SINHA S.S., JHA M.K.
Central Tasar Research and Training Institute, PO Piska Nagri, Ranchi 835 303, Bihar, India.
1994 International Conference on Sericulture:"Global Silk Scenario 2001", 25-29 Oct. 1994, CSR&TI Mysore, India, 107-112. (E)

Vers à soie : génétique

Silkworms: genetics

Identification of random amplified polymorphic DNA on the W chromosome of the Chinese 137 strain of the silkworm, *Bombyx mori.*
Identification de l'ADN polymorphique amplifié aléatoirement sur le chromosome W de la souche chinoise 137 du ver à soie *Bombyx mori.*
ABE H., SHIMADA T., YOKOYAMA T., OSHIKI T., KOBAYASHI M.
Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183, Japan.
1995 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 64(1), 19-22. (J,e)

Induction of virus-specific proteins in cultured silkworm cells BmN after infection with nuclear polyhedrosis virus.
Induction des protéines spécifiques du virus dans des cellulles BmN de vers à soie en culture après infection avec le virus de la polyédrose nucléaire.
AKOPOV S.B., BAZARNOVA T.M., ZEMSKOV E.A., ABRAMOVA E.B., MIKHAILOW V.S.
1994 Biokhimiya (Moscow), Vol. 59(1), 23-30. (R,e)

Identification of the cDNA, gene and promoter for a major protein from flexible cuticles of the giant silkmoth, *Hyalophora cecropia.*
Identification de l'ADNc, du gène et du promoteur d'une protéine majeure des cuticules flexibles du papillon du ver à soie géant *Hyalophora cecropia.*
BINGER L.C., WILLIS J.H.
1994 Insect. Biochem. Molec. Biol., Vol. 24, 989-1000. (E)

Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus.
Séquence des nucléotides et analyse transcriptionnelle du gène de l'ADN-polymérase du virus de la polyédrose nucléaire de *Bombyx mori.*
CHAEYCHOMSRI S., IKEDA M., KOBAYASHI M.
Laboratory of Sericulture and Entomoresources, School of Agriculture, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464 01, Japan.
1995 Virology, Vol. 206, 435-447. (E)

Developmental regulation of a silkworm gene encoding multiple GATA-type transcription factors by alternative splicing.
Régulation au cours du développement d'un gène du ver à soie codant pour les facteurs de transcription de type GATA par épissage alternatif.
DREVET J.R., SWEVERS L., IATROU K.
Université Blaise Pascal, ERS 063, 24 avenue des Landais, 63170 Aubière, France.
1995 J. Mol. Biol., Vol. 246, 43-53. (E)

RFLP analysis of chromosomal fragments in genetic mosaic strains of *Bombyx mori*.
Analyse par RFLP de fragments de chromosomes des souches mosaïques de *Bombyx mori*.
FUJIWARA H., MAEKAWA H.
Zoological Institute, Faculty of Science, University of Tokyo, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.
1994 Chromosoma, Vol. 103, 468-474. (E)

Mosaic formation by developmental loss of a chromosomal fragment in a "mottled striped" mosaic strain of the silkworm, *Bombyx mori*.
Formation d'une mosaïque par perte d'un fragment de chromosome au cours du développement chez une souche à mosaïque "tachetée rayée" du ver à soie *Bombyx mori*.
FUJIWARA H., YANAGAWA M., ISHIKAWA H.
Zoological Institute, Faculty of Science, University of Tokyo, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.
1994 Roux's Arch. Dev. Biol., Vol. 203, 389-396. (E)

Expression of human pro-urokinase cDNA in silkworm (*Bombyx mori*) larvae and *B. mori* cells using baculovirus vector.
Expression de l'ADNc de pro-urokinase humaine chez les larves du ver à soie (*Bombyx mori*) et les cellules de *B. mori* par utilisation d'un vecteur baculovirus.
GAO Y., CHU R., HU M.
1993 Beijing Daxue Xuebao, Ziran Kexueban, Vol. 29(6), 648-654. (E)

Molecular model systems in the Lepidoptera.
Systèmes modèles moléculaires chez les Lépidoptères.
GOLDSMITH M.R., WILKINS A.S.
Department of Zoology, Biological Sciences Building, University of Rhode Island, Kingston, RI 02881-0816, U.S.A.
1995 Cambridge University Press, Cambridge CB2 1RP, United Kingdom. 542 p. (E)

Production of defective genomes of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus by serial passage through cultures cells.
Production de génomes défectifs du virus de la polyédrose nucléaire de *Bombyx mori* par passages en série sur des cultures de cellules.
HASHIMOTO Y., HATANAKA E., ISHIZAKI A., MATSUMOTO T.
1993 Nippon Oyo Dobutsu Konchu Gakkaishi, Vol. 37(4), 240-243. (J)

***Bombyx* gene promoter analysis in transplanted silk gland transformed by particle delivery system.**
Analyse d'un promoteur de gène de *Bombyx* dans la glande séricigène transplantée transformée par biolistique.
HORARD B., MANGE A., PELISSIER B., COUBLE P.
Centre de Génétique Moléculaire et Cell., CNRS, Univ. Lyon I, 43 bd du 11/11/1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.
1994 Insect Molecular Biology, Vol. 3(4), 261-265. (E)

The p10 gene of natural isolates of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus encodes a truncated protein with an M(r) of 7700.
Le gène p10 des isolats naturels du virus de la polyédrose nucléaire de *Bombyx mori* code pour une protéine tronquée avec une M(r) de 7700.
HU N.T., LU Y.F., HASHIMOTO Y., MAEDA S., HOU R.F.
1994 J. General Virology, Vol. 75, 2085-2088. (E)

Biopotency of inactivated subunit vaccine of Newcastle disease virus fusion protein produced by gene transfer using a hybrid baculovirus vector in *Bombyx mori* pupae.
Potentiel comme vaccin de la sous-unité inactivée de la protéine de fusion du virus de la maladie de Newcastle produit par transfert de gène en utilisant un vecteur baculovirus hybride dans les chrysalides de *Bombyx mori*.
IRITANI Y. *et al.*
1995 Nippon Kakin Gakkaishi, Vol. 32(1), 42-46. (J)

Chromosomal arrangement and fine structure mapping of the chorion genes of the domesticated silkmoth (*Bombyx mori*).
Disposition chromosomique et cartographie fine des gènes du chorion du papillon du ver à soie (*Bombyx mori*).
KAOMINI M.
1993 Ph D, University of Rhode Island, Kingston (RI), U.S.A.. (E)

Genetic analysis of the soft and elongated trunk mutant in *Bombyx mori*.
Analyse génétique du mutant "tronc moux et allongé" de *Bombyx mori*.
KAWAGUCHI Y., KAWAKAMI K., DOIRA H., BANNO Y., KOGA K.
Laboratory of Sericultural Science, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan.
1995 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 64(1), 31-34. (E)

Expression of firefly luciferase gene in silkworm.
Expression du gène de la luciférase de la luciole chez le ver à soie.
LEI X.D., MI Y.G., YUAN Z.Y., LI Z.P., WU X.F.
1994 Chin. Sci. Bull., Vol. 39(18), 1554-1557. (C)

Mediators of activation of Fushi Tarazu gene transcription by Bmftz-F1.
Les médiateurs de l'activation de la transcription du gène Fushi Tarazu par Bmftz-F1.
LI F.Q., UEDA H., HIROSE S.
1994 Molecular and Cellular Biology, Vol. 14, 3013-3021. (E)

Drosophila 'elastin-type' gene identified with antibody to *Bombyx* PTTH.
Un gène de type élastine de la Drosophile identifié avec un anticorps de la PTTH de *Bombyx*.
LI W.W., FILIPPOV V.A., FILIPPOVA M.A., JINDRA M., SEHNAL F.
Entomological Institute, Czech Academy of Sciences, Branisovska 31, 370 05 Ceské Budejovice, Czech Republic.
1995 Eur. J. Entomol., Vol. 92(1), 151-153. (E)

Restriction endonuclease cleavage maps of mtDNA from the pupae of eri silkworms.
Cartes de restriction de l'ADNmt des pupes des vers à soie eri.
LING J., CHEN Y.
1993 Xiamen Daxue Xuebao, Ziran Kexueban, Vol. 32(5), 641-646. (C)

Improved culture method for transferring antibacterial peptide gene from Chinese oak silkworm into yeast and identification of its expressed products.
Méthode de culture améliorée pour le transfert d'un gène de peptide antibactérien du ver à soie du chêne chinois dans la levure et identification des produits exprimés.
MA L.J., ZHUANG C. X., HUANG Z.R.
South China Agricultural University, Guangzhou 510 642, China.
1995 Canye Kexue, Vol. 21(1), 42-46. (C,e)

Molecular characterization of four genes expressed in the silkmoth wing epidermis during adult development.
Caractérisation moléculaire de quatre gènes exprimés dans l'épiderme des ailes du papillon du ver à soie au cours du développement de l'adulte.
MOINE A., SRIDHARA S.
Dept of Biochem. & Mol. Biol., Texas Tech Univ. Health Sciences Center, Lubbock, TX 79430, USA.
1994 Insect Biochem. Molec. Biol., Vol. 24(9), 919-928. (E)

Expression of a foreign gene in four species of lepidoterous insects using a baculovirus vector.
Expression d'un gène étranger dans quatre espèces de lépidoptères par utilisation d'un vecteur baculovirus.
NAGAMINE T., KURIHARA M., MATSUMOTO S., MITSUI T.
1994 Nippon Noyaku Gakkaishi, Vol. 19(1), 33-38. (J)

A defective non-LTR retrotransposon is dispersed throughout the genome of the silkworm, *Bombyx mori*.
Un rétrotransposon non-LTR défectif est dispersé dans le génome du ver à soie Bombyx mori.
OGURA T., OKANO K., TSUCHIDA K., MIYAJIMA N., TANAKA H., TAKADA N. *et al.*
1994 Chromosoma, Vol. 103, 311-323. (E)

cDNA structure and characterization of a kinesin-like protein from the silkworm, *Bombyx mori*.
Struture de l'ADNc et caractérisation d'une protéine analogue à la kinésine chez le ver à soie *Bombyx mori*.
OKANO K., TAKADA N., KOBAYASHI M., MAEKAWA H.
Division of Radiation Control and Biology, National Institute of Health, University of Tokyo, Japan.
1994 Insect Molecular Biology, Vol. 3(4), 195-200. (E)

Overexpression of *Bombyx mori* prothoracicotropic hormone using baculovirus vectors.
Surexpression de l'hormone prothoracicotrope de *Bombyx mori* par l'utilisation de vecteurs baculovirus.
O'REILLY D.R., MILLER L.K. *et al.*
Departments of Entomology and Genetics, University of Georgia, Athens, GA 30602, U.S.A.
1995 Insect Biochem. Molec. Biol., Vol. 25(4), 475-485. (E)

Sex-chromatin in the epidermal nuclei of the cold treatment induced mosaic larvae of the silkworm, *Bombyx mori*.
Chromatine sexuelle dans les noyaux épidermiques des larves mosaïques de ver à soie *Bombyx mori* obtenues par traitement au froid.
PAN Q.Z., SUGAI E., OSIKI T.
Department of Sericulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China.
1994 Canye Kexue, Vol. 20(4), 220-224. (C,e)

Expression of biologically active monomeric form of human M-CSF in baculovirus infected silkworm, *Bombyx mori*.
Expression de la forme monomérique biologiquement active du M-CSf humain chez le ver à soie *Bombyx mori* infecté par un baculovirus.
QIU P., DING Y., QIN J.C., HAN K.K., ZHU D.X.
1994 Biological Chemistry Hoppe-Seyler, Vol. 375, 413-418. (E)

Cloning of a structural and functional homolog of the circadian clock gene period from the giant silkmoth, *Antheraea pernyi*.
Clonage d'un gène homologue sur les plans structurel et fonctionel de celui de l'horloge circadienne chez le papillon du ver à soie géant *Antheraea pernyi*.
REEPERT S.M., TSAI T., ROCA A.L., SAUMAN I.
1994 Neuron, Vol. 13, 1167-1176. (E)

Production of influenza virus HA protein in silkworm.
Production de la protéine HA du virus de la grippe chez le ver à soie.
SAEKI Y., HORIUCHI T.
1994 Baiosaiensu to Indasutori, Vol. 52(6), 468-472. (J)

Strutural and fonctional abnormality of the polyhedrin gene in a polyhedron-deficient mutant of the *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus.
Anomalie struturelle et fontionnelle du gène de la polyédrine chez un mutant du virus de la polyédrose nucléaire de *Bombyx mori*, déficient en polyedron.
SHIMADA T., CHAN I.C., NOGUCHI Y., NAGATA M., KOBAYASHI M.
Department of Agrobiology, Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.
1994 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 63(5), 353-360. (J,e)

Polymorphism and linkage analysis of the prothoracicotropic hormone gene in the silkmoth, *Bombyx mori*.
Polymorphisme et analyse des liaisons du gène de l'hormone prothoracicotrope chez le papillon du ver à soie *Bombyx mori*.
SHIMADA T., HASEGAWA T., MATSUMOTO K., AGUI N., KOBAYASHI M.
Department of Agrobiology, University of Tokyo, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.
1994 Genet. Res. Camb., Vol. 63, 189-195. (E)

Comparative study of various characters between trimoulters and tetramoulters segregated from F1 hybrids of trimoulter and tetramoulter strains of the silkworm, *Bombyx mori* L.
Etude comparative de divers caractères entre des trivoltins et des tetravoltins isolés d'hybrides F1 de souches trivoltines et tetravoltines du ver à soie *Bombyx mori* L.
SINGH R., NAGARAJU J., DATTA R.K.
Central Seric. Res. and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1994 Indian J. Seric., Vol. 33(2), 155-159. (E)

Characterization of a *Bombyx mori* cDNA encoding a novel member of the attacin family of insect antibacterial proteins.
Caratérisation de l'ADNc de *Bombyx mori* codant pour un nouveau membre de la famille des attacines, protéines antibactériennes d'insectes.
SUGIYAMA M., YAMAKAWA M. *et al.*
Laboratory of Biological Defense, National Institute of Sericultural and Entomological Science, Owashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1995 Insect Biochem. Molec. Biol., Vol. 25(3), 385-392. (E)

Further studies on non-preference mutations in the silkworm. (17) On a silkworm strain in which the third chromosome having a wide food range gene is tagged with zebra marking gene.
Etudes complémentaires sur les mutations "non-préférence" chez le ver à soie. (17) Sur une souche de ver à soie dont le troisième chromosome porteur d'un gène polyphage est marqué avec un gène "zèbré".
TAZIMA Y., OHNUMA A.
Institute of Silkworm Genetics and Breeding, 1054 Iikura Ami-machi, Ibaraki-ken 300-04, Japan.
1994 Reports of the Silk Science Research Institute, Vol. 42, 11-18. (J,e)

Further studies on non-preference mutations in the silkworm. (16) Genetics analyses of wide food range mutant strains, Sj and Brd, by crossing them with C136 strain.
Etudes complémentaires sur les mutations "non-préférence alimentaire" chez le ver à soie. (16) Analyses génétiques des souches mutantes polyphages Sj et Brd par coisement avec la souche C136.
TAZIMA Y., OHNUMA A.
Institute of Silkworm Genetics and Breeding, 1054 Iikura Ami-machi, Ibaraki-ken 300-04, Japan.
1994 Reports of the Silk Science Research Institute, Vol. 42, 1-9. (J,e)

Dominant lethals induced by dithane M-45 in silkworm, *Bombyx mori*.
Létaux dominants induits par le dithane M-45 chez le ver à soie *Bombyx mori*.
VASUDEV V., SUBRAMANYA G., KRISHNAMURTHY N.B.
1994 Environ. Res., Vol. 65(1), 145-148. (E)

Stage-dependent and temperature controlled expression of the gene encoding the precursor protein of diapause hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide in the silkworm, *Bombyx mori*.
Expression en fonction du stade et contrôlée par la température du gène codant pour la protéine du précurseur de l'hormone de diapause et le neuropeptide activant la biosynthèse de la phéromone chez le ver à soie *Bombyx mori*.
XU W.H., SATO Y., IKEDA M., YAMASHITO O.
Laboratory of Sericultural Science, School of Agriculture, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya 464-01, Japan.
1995 J. Biol. Chem., Vol. 270, 3804-3808. (E)

Cloning of cDNA for cecropins A and B, and expression of the genes in the silkworm, *Bombyx mori*.
Clonage de l'ADNc pour les cécropines A et B, et expression des gènes chez le ver à soie *Bombyx mori*.
YAMANO Y., MATSUMOTO M., INOUE K., KAWABATA T., MORISHIMA I.
1994 Biosci., Biotechnol., Biochem., Vol. 58, 1476-1478. (E)

Vitellogenin gene of the silkworm, *Bombyx mori*: structure and sex-dependent expression.
Gène de la vitellogénine du ver à soie ***Bombyx mori*** : structure et expression liée au sexe.
YANO K., SAKURAI M.T., IZUMI S., TOMINO S.
1994 FEBS Letters, Vol. 356, 2-3. (E)

Expression of the Giant egg gene (Ge) in triploid eggs of the silkworm, *Bombyx mori*.
Expression du gène oeuf géant (Ge) dans les oeufs triploïdes du ver à soie *Bombyx mori*.
YOKOYAMA T., SUZUKI M., ABE H., OSHIKI T.
Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183, Japan.
1994 J. Seric. Sci. Jpn,, Vol. 63(5), 347-352. (J,e)

Optimum infection conditions for recombinant protein production in insect cell (Bm5) suspension culture.
Conditions optimum d'infection pour la production de protéines recombinantes dans une culture de cellules d'insectes en suspension (Bm5).
ZHANG J., KALOGERAKIS N., BEHIE L.A., IATROU K.
Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Calgary, 3330 Hospital Drive N.W., Calgary, Alberta R2N 4N1, Canada
1994 Biotechnol. Prog., Vol. 10(6), 636-643. (E)

Expression of CAT gene under the control of P10 gene promoter from *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus.
Expression du gène CAT sous le contrôle du promoteur du gène P10 du virus de la polyédrose nucléaire de *Bombyx mori*.
ZHANG Y., WU X., LI Z.
1993 Bingdu Xuebao, Vol. 9(4), 361-366. (C)

Vers à soie : physiologie, biochimie

Silkworms: physiology, biochemistry

Purification and partial amino acid sequence of initiatorin, an endopeptidase of the silkworm, *Bombyx mori*.
Purification et séquence partielle d'acides aminés de l'initiatorine, une endopeptidase du ver à soie *Bombyx mori*.
AIGAKI T., KASUGA H., OSANAI M.
1994 Insect Biochem. Molec. Biol., Vol. 24, 969-975. (E)

A target protease activity of serpins in insect hemolymph.
Une activité protéase des serpines dans l'hémolymphe d'insectes.
ASHIDA M., SASAKI T.
Biochemical Laboratory, The Institute of Low Temperature Science, Hokkaido Univ., Sapporo, Japan.
1994 Insect Biochem. Molec. Biol., Vol. 24(10), 1037-1041. (E)

Ecdysteroid synthesis in dissociated cells of the prothoracic gland of the silkworm, *Bombyx mori*.
Synthèse d'ecdystéroïde dans des cellules dissociées de la glande prothoracique du ver à soie *Bombyx mori*.
ASHINA M., FUGO H., TAKEDE S.
1994 Zool. Sci., Vol. 11(1), 107-111. (E)

Inhibition of prophenol oxidase-activating enzyme from *Bombyx mori* by endogenous chymotrypsin inhibitors.
Inhibition de l'enzyme d'activation de la prophénol-oxydase de *Bombyx mori* par les inhibiteurs de chymotrypsine endogènes.
ASO Y., YAMASHITA T., MENO K., MURAKAMI M.
1994 Biochem. Molec. Biol. Int., Vol. 33(4), 751-758. (E)

Recent advances in lepidopteran midgut functions.
Récents progrès dans la connaissance des fonctions de l'intestin moyen chez les lépidoptères.
AZUMA M.
Laboratory of Insect Biochemistry, Faculty of Agriculture, Tottori Univ., Koyama, Tottori 680, Japan.
1995 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 64(1), 1-18. (J)

The application of enzymic hydrolysis in process of silkworm pupa.
L'application de l'hydrolyse enzymatique dans l'évolution de la pupe du ver à soie.
BAI H., LIU D., ZHANG B., LIU J.
1994 Shipin Kexue (Beijing), Vol. 5, 25-27. (E)

Régulation du cycle monovoltin d'*Orthosia gothica* L. (Lepidoptère Noctuidae).
Regulation of the univoltin cycle of *Orthosia gothica* L. (Lepidoptera, Noctuidae).
BUES R., POITOUT S., TOUBON J.F., GALAS S.
INRA, Station de Zoologie et d'Apidologie, 84143 Montfavet Cedex, France.
1994 Bull. Soc. zoll. Fr., Vol. 119(3), 201-209. (F,e)

Occurence of novel types of nitric oxide synthase in the silkworm, *Bombyx mori*.
Présence de nouveaux types de synthase d'oxyde nitrique chez le ver à soie *Bombyx mori*.
CHOI S.K. *et al.*
1995 Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 207, 452-459. (E)

Why do pupating insects lack an activity for the repair of uracil-containing DNA ? One explanation involves apoptosis.
Pourquoi les insectes se métamorphosant perde une activité de réparation de l'ADN contenant de l'uracil ? Une explication implique l'apoptose.
DEUTSCH W.A.
Department of Biochemistry, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana, U.S.A.
1995 Insect Molecular Biology, Vol. 4(1), 1-5. (E)

Amino acid sequence of an inhibitor from the silkworm (*Bombyx mori*) hemolymph against fungal protease.
Séquence d'acides aminés d'un inhibiteur de la protéase fongique chez l'hémolymphe du ver à soie (*Bombyx mori*).
EGUCHI M., ITOH M., NISHINO K., SHIBATA H., TANAKA T., KAMEIHAYASHI K., HARA S.
1994 J. Biochem., Vol. 115, 882-884. (E)

The amino acid/K+ symporters for neutral amino acids along the midgut of lepidopteran larvae : functional differentiations.
Les protéines membranaires de transport acides aminés/K+ pour les acides aminés neutres dans l'intestin moyen des larves de lépidoptères : différenciations fontionnelles.
GIORDANA B., LEONARDI M.G., TASCA M., VILLA M., PARENTI P.
Department of Biology, University of Milan, Via Celoria 26, 20133 Milan, Italy.
1994 J. Insect. Physiol., Vol. 40(12), 1059-1068. (E)

Determinants for the activity of the neutral amino acid/K+ symport in lepidopteran larval midgut.
Déterminants de l'activité de la protéine membranaire de transport acides aminés neutres/K+ dans l'intestin moyen des larves de lépidoptères.
GIORDANA B., PARENTI P.
Department of Biology, University of Milan, Via Celoria 26, 20133 Milan, Italy.
1994 J. exp. Biol., Vol. 196, 145-155. (E)

The prothoracicotropic hormone (PTTH) of the commercial silkmoth, *Bombyx mori*, in the CNS of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*.
L'hormone prothoracicotrope (PTTH) du papillon du ver à soie *Bombyx mori* chez le CNS du ver du tabac *Manduca sexta*.
GRAY R.S., MUEHLEISEN D.P., KATAHIRA E.J., BOLLENBACHER W.E.
1994 Peptides, Vol. 15, 777-792. (E)

Fluctuations in the biosynthetic activity of the prothoracic gland in recessive trimolters of the silkworm, *Bombyx mori*: their modulation by juvenile hormone and physiological significance.
Fluctuations dans l'activité biosynthétique de la glande prothoracique des trimuants récessifs du ver à soie *Bombyx mori* : leur modulation par l'hormone juvénile et signification physiologique.
GU S.H., CHOW Y.S., LIN F.J.
1995 J. experimental Zoology, Vol. 271, 211-219. (E)

Further characterization of a novel lectin derived from silkworm feces: specific binding to immunoglobulins and activation of immunocytes.
Caractérisation supplémentaire d'une nouvelle lectine dérivée des fèces de vers à soie : liaison spécifique avec les immunoglobulines et activation des immunocytes.
HIRAYAMA E., ISHIKAWA N., KIM J.
1994 Cell Biol. Int., Vol. 18(4), 257-269. (E)

Distribution of exogenous thyroid hormones in silkworm, *Bombyx mori* and its effect on protein contents in some tissues.
Distribution des hormones thyroïdiennes exogènes chez le ver à soie *Bombyx mori* et son effet sur les titres en protéines dans quelques tissus.
HUA G., ZHANG J., WEI Z.G.
1994 Dongwu Xuebao, Vol. 40, 108-111. (C)

A new cell line separated from the contractile muscle cell line of Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi.*
Une nouvelle lignée de cellules isolée de la lignée de cellules musculaires contractiles du ver à soie du chêne chinois *Antheraea pernyi.*
INOUE H., HAYASAKA S.
National Institute of Entomological and Sericultural Sci., 1-2 Owashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1995 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 64(1), 79-81. (E)

Infection and development of Vairimorpha sp. NIS M12 (Microsporida: Protozoa) in a lepidopteran cell line.
Infection et développement de Vairimorha sp. NIS M12 (Microsporida : Protozoa) dans une lignée de cellules de lépidoptères.
INOUE S., YASUNAGA C., FUNAKOSHI M., KAWARABATA T., HAYASAKA S.
1995 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 64(1), 39-45. (J,e)

Prothoracicotropic hormone controling ecdysis and metamorphosis of silkworm.
L'hormone prothoracicotrope controlant l'ecdysis et la métamorphose du ver à soie.
ISHIZAKI H.
1993 Kagaku to Seibutsu, Vol. 31(11), 698-699. (J)

The brain secretory peptides that control molting and metamorphosis of the silkmoth, *Bombyx mori.*
Les peptides des sécrétions cérébrales qui contrôlent la mue et la métamorphose du papillon du ver à soie *Bombyx mori.*
ISHIZAKI H., SUZUKI A.
1994 Int. J. Dev. Biol., Vol. 38(2), 301-310. (E)

Studies on the chromogen of the tussah cocoon layer and its chromophoric mechanism.
Etudes du chromogène de la coque soyeuse du cocon tussah et de son mécanisme chromophore.
JI T., HU J., WANG J., GUO H.F., JIN D.Z., JU J.T.
1993 Sci. China, Ser. B, Vol. 36(9), 1046-1051. (C)

Morphological and physiological properties of pheromone-triggred flipflopping descending interneurons of the male silkworm moth, *Bombyx mori.*
Propriétés physiologiques et morphologiques des interneurones descendants monostables déclenchés par la phéromone du papillon mâle du ver à soie *Bombyx mori.*
KANZAKI R., IKEDA A., SHIBUYA T.
1994 J. of Comparative Physiology, Vol. 175A, 1-14. (E)

Protein concentration in the pupal haemolymph of different races and F1's of top cross of *Antheraea mylitta* D.
Concentration de protéines dans l'hémolymphe de chrysalides de différentes races et des F1 des meilleurs croisements d'*Antheraea mylitta* D.
KAR P.K., SRIVASTAVA P.P., SINHA R.K., SINHA B.R.R.P.
Central Tasar Research and Training Institute, PO Piska Nagri, Ranchi 835 303, Bihar, India.
1994 Indian J. Seric., Vol. 33(2), 174-175. (E)

Hemolymph protein profiles in allatectomy induced trimolters resemble those of a recessive trimolting mutant of the silkworm, *Bombyx mori*.
Les profils protéiques de l'hémolymphe des trimuants induits par l'allatectomie ressemblent à ceux des mutants récessifs trimuants du ver à soie *Bombyx mori*.
KAWAGUCHI Y., BANNO Y., KOGA K., DOIRA H., FUIJII H.
1994 Comp. Biochem. Physiol., Vol. 107B, 579-584. (E)

Growth regulation of silkworm by insect hormones.
Régulation de la croissance du ver à soie par les hormones d'insectes.
KAWAMURA S., EBI T.
1993 Gifu-ken Sanshi kenkyushu Yoho, Vol. 3,46-53. (J)

Purification and characteristics of lipophorin in *Bombyx mori*.
Purification et caratéristiques de la lipophorine chez *Bombyx mori*.
KIM B.S., KIL H.R.
1994 Tongmul Hakhoechi, Vol. 37(1),76-87. (E)

Purification and characterization of a juvenile hormone binding protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*.
Purification et caractérisation d'une protéine liante de l'hormone juvénile dans l'hémolymphe du ver à soie *Bombyx mori*.
KURATA K., NAKAMURA M., OKUDA T., HIRANO H., SHINBO H.
1994 Comp. Biochem. Physiol., Vol. 109B, 105-114. (E)

Contrôles hormonaux des mues et métaporphoses des arthropodes : faits établis et questions ouvertes.
Hormonal control of molting and metamorphosis of Arthropods : established facts and open questions.
LAFONT R.
Ecole normale supérieure, Laboratoire de Biochimie, CNRS URA 686 et IFREMER URM 4, 46 rue d'Ulm, 75005 Paris, France.
1994 Bull. Soc. zool. Fr., Vol. 119(3), 185-199. (F,e)

Studies on the relationship between protein metabolism and cocoon shell conversion efficiency of the 5th instar larvae of different silkworm varieties.
Etudes sur la relation entre le métabolisme des protéines et l'efficacité de la conversion en coque soyeuse chez des larves de différentes variétés de ver à soie au 5e âge.
LI L. *et al.*
1995 Canye Kexue, Vol. 21(1), 59-61. (C)

Host specificity of *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin proteolyzed by proteases of larval gut juice.
Spécificité de l'hôte de la delta endotoxine de *Bacillus thuringiensis* protéolysée par des protéases du suc de l'intestin larvaire.
LI R., SHEN Z.
1993 Kunchong Xuebao, Vol. 36(3), 263-271. (C)

Haemagglutinin active substance in the hemolymph of ailantus silkworm (*Philosamia cynthia*) pupae.
Substance active d'hemagglutinine dans l'hémolymphe des chrysalides du ver à soie de l'ailante (*Philosamia cynthia*).
LI S.Y.
1994 Canye Kexue, Vol. 20(4), 247-248. (C)

Identification of amino acid residues of *Bacillus thuringiensis* deltan endotoxin CrylAa associated with membrane binding and toxicity to *Bombyx mori*.
Identification des résidus d'acides aminés de la delta endotoxine CrylAa de *Bacillus thuringiensis* associés à la fixation à la membrane et à la toxicité chez *Bombyx mori*.
LU H., RAJAMOHAN F., DEAN D.H.
1994 J. Bacteriology, Vol. 176, 5554-5559. (E)

Effect of fluoride poisoning on the composition of fatty acid in the fat bodies of silkworm (*Bombyx mori*) larvae.
Effet de l'empoisement au fluorure sur la composition en acide gras dans les corps adipeux des larves de vers à soie (*Bombyx mori*).
LÜ S.L. *et al.*
1994 Canye Kexue, Vol. 20(4), 251. (C)

Taxonomical studies on enterococci isolated from the intestine of the silkworm, *Bombyx mori*.
Etudes taxonomiques sur les entérocoques isolés de l'intestin du ver à soie *Bombyx mori*.
LU X.M., HASHIMOTO Y., MATSUMOTO T., MAEKAWA S.
Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan.
1994 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 63(6), 481-487. (J,e)

Purification and identification of serum red pigment-protein complex from the rb mutant of the silkworm, *Bombyx mori*.
Purification et identification du complexe protéine-pigment rouge du sérum du mutant rb du ver à soie *Bombyx mori*.
MAKI N., KAJIURA Z., NAKAGAKI M., TAKEI R.
Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Tokida 3-15-1, Ueda 386, Japan.
1995 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 64(1), 46-55. (J,e)

Specificity domain localization of *Bacillus thuringiensis* insectidicidal toxins is highly dependent on the bioassay system.
La localisation du domaine de spécificité des toxines insecticides de *Bacillus thuringiensis* dépend beaucoup du système de dosage biologique.
MASSON L., MAZZA A., GRINGORTEN L., BAINES D., ANELIUNAS V., BROUSSEAU R.
1994 Molecular Microbiology, Vol. 14, 851-860. (E)

Attachment and growth of fibroblast cells on silk fibroin.
Fixation et croissance de fibroblastes sur la fibroïne de soie.
MINOURA N., AIBA S.I., HIGUCHI M., GOTOH Y., TSUKADA M., IMAI Y.
National Institute of Materials and Chemical Research, 1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1995 Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 208(2), 511-516. (E)

A new continuous cell line from the larval fat bodies of the mulberry tiger moth, *Spilosoma imparilis* (Lepidoptera : Arctiidae).
Une nouvelle lignée cellulaire continue à partir des corps adipeux des larves du papillon tigre du mûrier *Spilosoma imparilis* (Lepidoptera : Arctiidae).
MITSUHASHI W.
Lab. of Vector and Transmission, Natl Inst. of Seric. and Entomol. Sci., Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1994 Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci., Vol. 11, 1-8. (E)

Lysozyme activity in immunized and non-immunized hemolymph during the development of the silkworm, *Bombyx mori*.
Activité des lysozymes dans l'hémolymphe immunisée et non-immunisée au cours du développement du ver à soie *Bombyx mori*.
MORISHIMA I., HORIBA T., YAMANO Y.
1994 Comp. Biochem. Physiol., Vol. 108A, 311-314. (E)

Differentiation of tyrosine hydroxylase and phenol oxidase after electrophoresis.
Différenciation de la tyrosine-hydroxylase et de la phénol-oxydase après électrophorèse.
NELLAIAPPAN K., VALIVITTAN K.
1993 Biotechn. Histochem., Vol. 68(5), 281-283. (E)

A cysteine proteinase encoded by the baculovirus *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus.
Une protéase à cystéine codée par le baculovirus du virus de la polyédrose nucléaire de *Bombyx mori*.
OHKAWA T., MAJIMA K., MAEDA S.
1994 J. of Virology, Vol. 68, 6619-6625. (E)

Effet of xanthurenic acid on P-450-dependent biotransformation by molting glands *in vitro*.
Effet *in vitro* de l'acide xanthurénique sur la biotransformation dépendante du P-450 par les glandes de mues.
OHNISHI M., NAYA Y.
1994 Experientia, Vol. 50, 654-657. (E)

Interaction of the insectidial crystal protein CrylA from *Bacillus thuringiensis* with amino acid transport into brush border membranes from *Bombyx mori* larval midgut.
Interaction de la protéine cristalline insecticide CrylA de *Bacillus thuringiensis* avec le transport des acides aminés dans les membranes pileuses de l'intestin moyen des larves de *Bombyx mori*.
PARENTI P., VILLA M., HANOZET G.M., TASCA M., GIORDANA B.
Department of Biology, University of Milan, Via Celoria 26, 20133 Milan, Italy.
1995 Journal of Invertebrate Pathology, Vol. 65, 35-42. (E)

Characterization of high affinity juvenile hormone binding protein in the haemolymph of *Bombyx mori* L.
Caractérisation d'une protéine fixatrice de grande affinité pour l'hormone juvénile dans l'hémolymphe de *Bombyx mori* L.
PARK C.H., KIM H.R.
1994 Tongmul Hakhoechi, Vol. 37(4), 495-503. (E)

Hemolymph juvenile hormone binding protein of fifth instar larvae of *Bombyx mori* L. : identification and purification.
Protéine liante à l'hormone juvénile de l'hémolymphe du cinquième âge larvaire de *Bombyx mori* L. : identification et purification.
PARK C.H., KIM H.R.
1994 Tongmul Hakhoechi, Vol. 37(1), 66-75. (E)

Surface ultrastructure of olfactory receptor sense hairs in the silkmoth, *Antheraea pernyi*.
Ultrastructure de la surface des poils récepteurs olfactifs chez le papillon du ver à soie *Antheraea pernyi*.
POPOV V.L., NIKINOV A.A., AGAFONOVA N.K., FESENKO E.E.
1994 J. of Microscopy, Vol. 174(1), 39-46. (E)

Effect of 1-thyroxine-sodium-pentahydrate on protein and nucleic acid turnover in fat body during fifth larval stage of non-diapausing tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Drury.
Effet du 1-thyroxine-sodium-pentahydrate sur le renouvèlement des protéines et des acides nucléiques dans le corps adipeux au cours du cinquième âge larvaire du ver à soie tasar non-diapausant *Antheraea mylitta* Drury.
REDDY K.D., CHAUDHURI A., THANGAVELU K.
Indian Institute of Chemical Technology, Biology Division, Hyderabad 500 007, A.P., India.
1994 Indian J. Exp. Biol., Vol. 32(6), 413-417. (E)

L-thyroxine (T4) elevates the free amino acid pool of hemolymph plasma of tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera: Saturnidae).
La L-thyroxine (T4) augmente le pool d'acides aminés libres dans l'hémolymphe du ver à soie tasar, *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera : Saturnidae).
REDDY K.D., CHAUDHURI A., THANGAVELU K.
National Silkworm Project, IV Floor, CSB Complex, BTM Layout, Madivala, Hosur Road, Bangalore 560 008, India.
1994 Horm. Metab. Res., Vol. 26(12), 570-573. (E)

A comparison and analysis of the toxicity and receptor binding properties of *Bacillus thuringiensis* CrylC partial derivative-endotoxin on *Spodoptera littoralis* and *Bombyx mori*.
Comparaison et analyse de la toxicité et des propriétés de fixation au récepteur du dérivé de l'endotoxine partiel CrylC de *Bacillus thuringiensis* sur *Spodoptera littoralis* et *Bombyx mori*.
SANCHIS V., CHAUFAUX J., PAURON D.
1994 FEBS Letters, Vol. 353, 259-263. (E)

Neurosecretory cells expressing the gene for common precursor for diapause hormone and pheromone biosynthesizing-activating neuropeptide in the suboesophageal ganglion of the silkworm, *Bombyx mori*.
Les cellules neurosécrétrices exprimant le gène pour le précurseur commun à l'hormone de diapause et au neuropeptide activant la biosynthèse de la phéromone dans le ganglion sub-oesophagien chez le ver à soie *Bombyx mori*.
SATO Y., IKEDA M., YAMASHITA O.
Laboratory of Sericultural Science, School of Agriculture, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-01, Japan.
1994 General and comparative Endocrinology, Vol. 96, 27-36. (E)

Identification of ommin in the integument of the silkworm, *Bombyx mori*.
Identification de l'ommin dans le tégument du ver à soie *Bombyx mori*.
SAWADA H., TSUSUE M, IINO T.
1994 Biological Chemistry Hoppe-Seyler, Vol. 375, 425-427. (E)

Studies on the effects of gibberellins in terminating the pupal diapause in *Antheraea mylitta* Drury.
Etudes des effets des gibbérellines en fin de diapause nymphale chez *Antheraea mylitta* Drury.
SINGH P.N., MEHROTRA P.N.
1991 Trends Life Sci., Vol. 6(1), 21-28. (E)

Acetylcholine content and acetylcholinesterase activity in the pupal heads of different races of *Antheraea mylitta* D. during diapause.
Titre en acétylcholine et activité de l'acétylcholinestérase dans les têtes des chrysalides de différentes races d'*Antheraea mylitta* D. au cours de la diapause.
SRIVASTAVA P.P., KAR P.K., BANERJEE N.D., THANGAVELU K.
Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi 835 303, India.
1994 Indian J. Seric., Vol. 33(2), 152-154. (E)

Development of an analysis system of spinning behaviour of the silkworm using three-dimensional computer graphics.
Développement d'un système d'analyse du comportement de filage du ver à soie par l'utilisation de graphiques informatisés tri-dimensionnels.
SUGIURA A., MIURA M., MORIKAWA H.
Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, 3-15-1 Tokida, Ueda 386, Japan.
1994 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 63(6), 499-507. (E)

Digestion and absorption of nutrients in the midgut tissue in silkworm, *Bombyx mori*, aseptically reared on an artificial diet with special reference to midgut sucrase.
Digestion et absorption des aliments dans le tissu de l'intestin moyen chez le ver à soie *Bombyx mori* élevé aseptiquement sur milieu artificiel avec une référence spéciale à la sucrase de l'intestin moyen.
SUMIDA M., MORI H., MATSUBARA F.
Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, Mastugasaki, Kyoto 606, Japan.
1994 Kyoto Kogei Sen'i Daigaku Sen'igakubu Gakujutsu Hokoku, Vol. 18, 79-84. (J)

Sucrase activity and its kinetic properties in peritrophic membrane, and in membrane-bound and soluble fractions of midgut in the silkworm, *Bombyx*.
Activité de la sucrase et ses propriétés cinétiques dans la membrane péritrophique et dans les fractions solubles et liées à la membrane de l'intestin moyen du ver à soie *Bombyx*.
SUMIDA M., YUAN X.L., MATSUBARA F.
Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Kyoto 606, Japan.
1994 Comp. Biochem. Physiol., Vol. 108A, 255-264. (E)

Intermittent expression of BmFTZ-F1, a member of the nuclear hormone receptor superfamily during development of the silkworm, *Bombyx mori*.
Expression intermittente de BmFTZ-F1, un membre de la superfamille de récepteurs d'hormones nucléaires au cours du développement du ver à soie *Bombyx mori*.
SUN G.C., HIROSE S., UEDA H.
1994 Developmental Biology, Vol. 162, 426-437. (E)

Separation and analysis of silkworm odor.
Séparation et analyse de l'odeur du ver à soie.
SUN L., SHEN P.Y.
1993 Wuxi Qinggongye Xueyuan Xuebao, Vol. 12(3), 192-196. (C)

Silkworm diapause hormone, structure-activity relationships indispensable role of C-terminal amide.
L'hormone de diapause du ver à soie. Les relations structure-activité. Le rôle indispensable de l'amide C-terminale.
SUWAN S., ISOBE M., YAMASHITA O., MINAKATA H., IMAI K.
Laboratory of Sericultural Science, School of Agriculture, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya 464-01, Japan.
1995 Insect Biochem. Molec. Biol., Vol. 24, 1001-1007. (E)

Preliminary report on the changes in the contents of biogenic amines in the testes of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae*, during pupal diapause.
Rapport préliminaire sur les variations des titres en amines biogéniques dans les testicules du ver du chou *Mamestra brassicae* au cours de la diapause nymphale.
TAKEDA S., TAKEDA M.
National Institute of Sericultural and Entomological Science, Owashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1994 Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci., Vol. 11, 17-25. (J,e)

The different effects of ecdysone and 20-hydroxyecdysone on the induction of larval ecdysis in the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidopera: Bombycidae).
Les différents effets de l'ecdysone et de la 20-hydroxyecdysone sur l'induction de l'ecdysis larvaire chez le ver à soie *Bombyx mori* (lepidoptera : Bombycidae).
TANAKA Y.
Departement of Insect Physiology, National Institute of Sericultural and Entomological Science, Owashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1995 Eur. J. Entomol., Vol. 92(1), 155-160. (E)

Induction of ultranumerary larval ecdyses by ecdysone does not require an active prothoracic gland in the silkworm, *Bombyx mori*.
L'induction d'ecdysis larvaires surnuméraires par l'ecdysone ne nécessite pas une glande prothoracique active chez le ver à soie *Bombyx mori*.
TANAKA Y., ASAHINA M., TAKEDA S.
1994 J. Insect Physiol., Vol. 40, 753-757. (E)

Purification of glycosylphosphatidylinositol anchoring aminopeptidase N from the plasma membrane of larval midgut epithelium cells of the silkworm, *Bombyx mori*.
Purification du glycosylphosphatidylinositol fixant l'aminopeptidase N de la membrane plasmatique des cellules de l'épithélium de l'intestin moyen larvaire du ver à soie *Bombyx mori*.
TOMITA M., OBARA H., TAKESUE Y., TAMURA H., MIYAJAMA S.
1994 Int. J. Biochem., Vol. 26(8), 977-986. (E)

Synthesis and biological activity of *Bombyx* eclosion hormone.
Synthèse et activité biologique de l'hormone d'éclosion de *Bombyx*.
UMEMURA I., HAYASHI H., SHIBANAKA Y., FUJITA N., TAKAI M.
1993 Pept. Chem., Vol. 31, 253-256. (E)

Influence of temperature on the passage of food through the gut of multivoltine *Bombyx mori* L. larvae.
Influence de la température sur le passage de la nourriture dans l'intestin des larves de *Bombyx mori* L. polyvoltin.
UPADHYAY V.B., MISHRA A.B.
Department of Zoology, University of Gorakhpur, Gorakhpur 273 009, India.
1994 Indian J. Seric., Vol. 33(2), 183-185. (E)

Toxicity of activated Cryl proteins from Bacillus thuringiensis to six forest lepidoptera and *Bombyx mori*.
Toxicité des protéines Cryl activées de Bacillus thuringiensis sur six lépidoptères forestiers et *Bombyx mori*.
VAN FRANKENHUYZEN K., GRINGORTEN J.L., GAUTHIER D., MILNE R.E. *et al.*
1993 J. Invert. Pathol., Vol. 62, 295-301. (E)

Effect of campicillin on the growth of silkworm, *Bombyx mori* (L.).
Effet de la campicilline sur la croissance du ver à soie *Bombyx mori* (L.).
VIJAYA T.
1993 Geobios (Jodhpur India), Vol. 20(4), 260-261. (E)

Chemical modification of *Bacillus thuringiensis* subsp. aizawa delta endotoxin: implication of arginine residues in *Bombyx mori* toxicity.
Modification chimique de l'endotoxine delta de *Bacillus thuringiensis* subsp. aizawa : implication des résidus arginine dans la toxicité chez *Bombyx mori*.
VILLA M., GIGLIONE C., HANOZET G.M., PARENTI P.
1994 Pestic. Biochem. Physiol., Vol. 50(1), 15-22. (E)

The biological effect of magnetic treatment on silkworm, *Bombyx mori*.
L'effet biologique du traitement magnétique sur le ver à soie *Bombyx mori*.
WANG Y.X. *et al.*
1994 Canye Kexue, Vol. 20(4), 252-253. (C)

Studies on the accumulation of urea in the silkworm.
Etudes sur l'accumulation d'urée chez le ver à soie.
YAMADA M.,
1994 Nogyo Seibutsu Shigen Kenkyusho Kenkyu Hokoku, Vol. 9, 163-220. (J)

Properties and oxidative stability of silk cocoon oil.
Propriétés et stabilité oxydative de l'huile de cocons de soie.
YANG X., WU W., LIU Y., HE H., GUO Z.
1993 Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa, Vol. 5(2), 59-64. (E)

Technology for extraction of protein from silkworm chrysalis.
Technologie pour l'extraction de protéines des chrysalides de vers à soie.
ZHANG G., WANG G., XIONG Y., QIAN L.
1994 Shipin Kexue, Vol. 10, 20-22. (C)

Electrophoretic observation and comparison in protein components between eggs and the blood in larvae, pupae and moths of *Bombyx mori*.
Observation électrophorétique et comparaison des composants des protéines dans les oeufs et le sang des larves, des chrysalides et des papillons de *Bombyx mori*.
ZHANG J.Y. *et al.*
1994 Canye Kexue, Vol. 20(4), 245-246. (C)

Optimization of the physicochemical parameters for the culture of *Bombyx mori* insect cell used in recombinant protein production.
Optimisation des paramètres physico-chimiques pour la culture de cellules de *Bombyx mori* utilisées dans la production de protéines recombinantes.
ZHANG J., KALOGERAKIS N., BEHIE L.A.
1994 J. Biotechnol., Vol. 33(3), 249-256. (E)

Distribution and biosynthesis sites of acid cysteine proteinase in silkworm, *Bombyx mori*.
Distribution et sites de biosynthèse de la protéinase à cystéine acide chez le ver à soie *Bombyx mori*.
ZHAO X.F., TAKAHASHI S.Y.
1994 Dongwu Xuebao, Vol. 40(1), 24-29. (C)

Vers à soie : oeufs, empbryologie

Silkworms: eggs, embryology

Involvement of a maternally transcribed lectin gene in the early development of *Bombyx mori.*
Implication du gène de la lectin maternellement transcrit dans le développement précoce de *Bombyx mori.*
AMANAI K., SUZUKI Y., OHTAKI T.
Department of Developmental Biology, National Institute for Basic Biology, Myodaiji, Okazaki 444, Japan.
1994 Roux's Arch. Dev. Biol., Vol. 203, 397-401. (E)

Influence of thyroxine on ovarian glycogen of *Bombyx mori* L. (race Nistari) during ontogenesis.
Influence de la thyroxine sur le glycogène ovarien de *Bombyx mori* L. (race Nistari) au cours de l'ontogénèse.
CHAUDHURI A., MEDDA A.K.
1993 Insect Sci. Its Appl., Vol. 14(5-6), 621-626. (E)

Influence of illumination duration and light intensity for warming eggs on the appearance of diapause pupae of Chinese tussah silkworm.
Influence de la durée d'éclairage et de l'intensité de la lumière utilisée pour réchauffer les oeufs sur l'apparition des pupes en diapause chez le ver à soie chinois tussah.
GONG J.Y. *et al.*
1995 Canye Kexue, Vol. 21(1), 64. (C)

Induction of larger eggs by 20-hydroxyecdysone in giant egg mutant phenotypes in the silkworm, *Bombyx mori.*
Induction d'oeufs plus gros par la 20-hydroxyecdysone dans les phenotypes des mutants oeufs géants chez le ver à soie *Bombyx mori.*
KAWAGUCHI Y., BANNO Y., KOGA K., DOIRA H., HIROSHI F.
Laboratory of Sericultural Science, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan.
1994 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 63(6), 443-448. (J,e)

Studies on the parthogenesis and generation succession of the silkworm, *Bombyx mori*, through freezing the ovaries.
Etudes sur la parthénogénèse et la succession des générations chez le ver à soie *Bombyx mori* par congélation des ovaires.
LU J.Y. *et al.*
1994 Canye Kexue, Vol. 20(4), 243-244. (C)

Role of light during incubation of silkworm eggs and its effect on rearing performance and diapause.
Rôle de la lumière au cours de l'incubation des oeufs de vers à soie et son effet sur les performances d'élevage et la diapause.
MEENAL A., MATHUR V.B., RAJAN R.K.
Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1994 Indian J. Seric., Vol. 33(2), 139-141. (E)

Fate mapping of the silkworm, *Bombyx mori*, using localized UV irraditation of the egg at fertilization.
Cartographie des zones présomptives du ver à soie *Bombyx mori* par irradiation aux UV localisée de l'oeuf à la fécondation.
MYOHARA M.
Department of Insect Genetics and Breeding, National Institute of Sericultural and Entomological Science, Owashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1994 Development, Vol. 120, 2869-2877. (E)

Morphogenesis in the early embryo of the lepidopteran *Bombyx mori*.
Morphogénèse chez l'embryon précoce du lépidoptère *Bombyx mori*.
NAGY L., RIDDIFORD L., KIUCHI K.
Department of Zoology, University of Washington, Seattle, Washington 98195, U.S.A.
1994 Developmental Biology, Vol. 165, 137-151. (E)

A comparative study on the arginine degradation cascade for sperm maturation of *Bombyx mori* and *Drosophila melanogaster*.
Une étude comparative de la cascade de dégradation de l'arginine pour la maturation du sperme chez *Bombyx mori* et *Drosophila melanogaster*.
OSANAI M., CHEN P.S.
1993 Amino Acids, Vol. 5(3), 341-350. (E)

Seasonal variation in silkworm, *Bombyx mori* L. under gamma irradiation of eggs.
Variation saisonnière chez le ver à soie *Bombyx mori* L. après irradiation gamma des oeufs.
RAMA MOHANA RAO P., GUPTA S.K., SENGUPTA K.,KANNANTHA V.
Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1994 Indian J. Seric., Vol. 33(2), 178-179. (E)

Temporal regulators of a silkmoth chorion gene.
Régulateurs temporels du gène du chorion du papillon du ver à soie.
RHEE E.
1993 Ph D, University of Connecticut, U.S.A.

The core and complementary sequence responsible for biological activity of the diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*.
Séquence principale et complémentaire responsable de l'activité biologique de l'hormone de diapause du ver à soie *Bombyx mori*.
SAITO H., TAKEUCHI Y., TAKEDA R., HAYASHI Y., WATANABE K., SHIN M. *et al.*
1994 Peptides, Vol. 15, 1173-1178. (E)

Studies on the development of a method for long-term storage of diapausing silkworm eggs and selection of cold-tolerant varieties of the silkworm, *Bombyx mori*.
Etudes sur le développement d'une méthode de longue conservation des oeufs de vers à soie diapausants et sélection des variétés tolérant le froid chez le ver à soie *Bombyx mori*.
SHIMIZU K., KOSEGA E., SHIMIZU L.F.
National Institute of Sericultural and Entomological Science, Owashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1994 Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci., Vol. 11, 45-52. (J,e)

Induction of non-diapause eggs by injection of anti-diapause hormone rabbit serum into the diapause type of the silkworm, *Bombyx mori*.
Induction d'oeufs non-diapausants par l'injection de sérum de lapin anti-hormone de diapause chez le ver à soie *Bombyx mori* de type diapausant.
SHIOMI K., ISHIDA Y., IKEDA M., SATO H., IMAI K., ISOBE M., YAMASHITA O.
Nagoya University, School of Agriculture, Sericultural Science Laboratory, Chikusa-ku, Nagoya 464-01, Japan.
1994 J. Insect Physiology, Vol. 40, 693-699. (E)

Appropriate preservation methods of female silk moth.
Méthodes appropriées pour la conservation des papillons femelles des vers à soie.
SINGH G.P., MATHUR V.B., KUMAR V., KAMBLE C.K., DATTA R.K.
Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(11), 11-13. (E)

Molecular characterization of ovary trehalase of the silkworm, *Bombyx mori*, and its transcriptional activation by diapause hormone.
Caractérisation moléculaire de la tréhalase ovarienne du ver à soie *Bombyx mori* et son activation transcriptionnelle par l'hormone de diapause.
SU Z.H., IKEDA M., SAITO H., IMAI M., YAMASHITA O.
Nagoya University, School of Agriculture, Sericulture Science Laboratory, Chikusa-ku, Nagoya 464-01, Japan.
1994 Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1218, 366-374. (E)

Handling of silkworm eggs.
Manipulation des oeufs de vers à soie.
SUBRAMANIAM R.K., SINGHVI N.R., CHIKKANNA, KALAPPA H.K., DATTA R.K.
Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(12), 23-24. (E)

Climatic differential phenotypic expression of voltine genes in *Bombyx mori* L.
Expression phénotypique différente selon les climats des gènes du voltinisme chez *Bombyx mori* L.
SUBRAMANYA G., MURAKAMI A.
Department of Sericulture, University of Mysore, Mysore 570 006, India.
1994 Indian J. Seric., Vol. 33(2), 103-109. (E)

Ion channel activity on microsomal vesicle from unfertilized eggs of the silkworm, *Bombyx mori*.
Activité du canal d'ion sur la vésicule microsomique d'oeufs non fertilisés du ver à soie *Bombyx mori*.
TOSHIMA Y.
1995 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 64(1), 68-71. (J)

Absence of sensivity of oocyte system in *Bombyx mori* L. to a cyclic hydrocarbon.
Absence de sensibilité à un hydrocarbure cyclique du système ovocytaire chez *Bombyx mori* L.
VIJAYAN V.A., KRISHNAMURTHY N.B.
1994 J. Environ. Biol., Vol. 15(2), 135-137. (E)

Effect of Pilocardine on the reproduction of silkworm, *Bombyx mori.*
Effet de la Pilocardine sur la reproduction du ver à soie *Bombyx mori.*
XU H.R. *et al.*
1994 Canye Kexue, Vol. 20(4), 257-258. (C)

Changes of nucleic acid and protein metabolism in acid-treated eggs.
Variation du métabolisme des protéines et des acides nucléiques dans les oeufs traités à l'acide.
XU S.Q.
Suzhou Sericulture College, Suzhou 215151, China.
1994 Canye Kexue, Vol. 20(4), 214-219. (C,e)

Cysteine proteinase from the eggs of the silkmoth, *Bombyx mori*: site of synthesis and a suggested role in yolk protein degradation.
Protéinase à cystéine des oeufs du papillon du ver à soie *Bombyx mori* : site de la synthèse et un rôle suggéré dans la dégradation des protéines du vitellus.
YAMAMOTO Y., ZHO X.F., SUZUKI A.C., TAKAHASHI S.Y.
1994 J. Insect. Physiology, Vol. 40, 447-454. (E)

Molecular cloning and sequencing of DNA which encodes cysteine proteinase in the eggs of the silkmoth, *Bombyx mori.*
Clonage moléculaire et séquençage du l'ADN codant pour la protéase à cystéïne dans les oeufs du papillon de *Bombyx mori.*
YAMAMOTO Y. *et al.*
1994 J. of Biochemistry, Vol. 116, 1330-1335. (E)

Vers à soie : glandes séricigènes

Silkworms: silkglands

The selective expression of silk-protein-encoding genes in *Bombyx mori* silk gland.
L'expression sélective des gènes codant pour les protéines de la soie dans la glande séricigène de *Bombyx mori*.
BELLO B., HORARD B., COUBLE P.
CGMC du CNRS et de l'Université Claude Bernard, 43 boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.
1994 Bull. Inst. Pasteur, Vol. 92, 81-100. (E)

Effect of magnetization on acid and alkaline phophatases in the developing silk gland of *Bombyx mori* (L.).
Effet de la magnétisation sur les phophatases acide et alcaline dans la glande séricigène au cours de son développement chez *Bombyx mori* (L.).
CHOUGALE A.L., MORE N.K.
1993 Entomon, Vol. 18(1/2), 1-5. (E)

Régulation tissulaire et cellulaire du gène de la protéine P25 de *Bombyx mori* : Etudes fonctionnelles *in vivo*.
Tissular and cellular regulation of *Bombyx mori* protein P25 gene : *in vivo* functional studies.
HORARD B.
Laboratory of Pr. Pirrotta, Department of Zoology, Sciences 3, University of Geneva, 30 quai E. Ansermet, 1211 Geneva, Switzerland.
1995 Thèse, Université C. Bernard Lyon I, 43 bd du 11.11.1918, 69622 Villeurbanne Cedex. (F)

Developmental regulation of silk protein P25 in the silkworm, *Bombyx mori*.
Regulation au cours du développement de la protéine de soie P25 chez le ver à soie *Bombyx mori*.
MUTHUMANI K., MATHAVAN S., MAYILVAHANAN S.
Sericulture Research Unit, Department of Genetics, School of Biological Sciences, Madurai Kamaraj University, Madurai 625 021, India.
1995 J. Biosci., Vol. 20(2), 211-223. (E)

Quantitative measurements of amino acids in posterior silk gland of *Bombyx mori* influenced by different cultivation forms of mulberry.
Mesures quantitatives des acides aminés dans la glande séricigène postérieure de *Bombyx mori* influencées par les différentes formes de culture du mûrier.
QADER M.A., HAQUE R., ABSAR N.
1993 Pak. J. Zool., Vol. 25(4), 279-283. (E)

Soie

Silk

Effect of preparation method of powdered silk on the mechanical properties of molded silk.
Effet de la méthode de préparation de la soie en poudre sur les propriétés mécaniques de la soie façonnée.
AKIYAMA D., HIRABAYASHI K.
1994 Polymer, Vol. 35(11), 2355-2358. (E)

Morphology and primary crystal structure of a silk-like protein polymer synthetized by genetically engineered *Escherichia coli* bacteria.
Morphologie et structure cristalline primaire d'un polymère analogue à la soie synthétisé par la bactérie *Escherichia coli* génétiquement modifiée.
ANDERSON J.P., CAPPELLO J., MARTIN D.C.
1994 Biopolymers, Vol. 34(8), 1049-1058. (E)

Structure of *Bombyx mori* silk fibroin studies by REDOR MNR spectroscopy.
Structure de la fibroïne de soie de *Bombyx mori* par spectroscopie RNM REDOR.
ASAKURA T., AOKI A., DEMURA M., JOERS J.M., ROSANSKE R.C., GUILLION T.
1994 Polym. J. (Tokyo), Vol. 26(12), 1405-1408. (E)

Determination of the structure of (1-13C)glycine-(15N)alanine double labeled *Bombyx mori* silk fibroin fibers using solid state 15N NMR.
Détermination de la structure des fibres de la fibroïne de soie de *Bombyx mori* doublement marquées par la (1-13C)glycine et la (15N)alanine par RNM au 15N à l'état solide.
ASAKUTA T., DEMURA M., HIRAISHI Y., OGAWA K., UYAMA A.
1994 Chem. Lett., Vol. 12, 2249-2252. (E)

Quantitative structural analysis and physical properties of silk fibroin hydrogels.
Analyse quantitative structurelle et propriétés physiques des hydrogels de fibroïne de soie.
AYUB Z.H., ARAI M., HIRABAYASHI K.
Dept of Mol. Biotechnol., Fac. of Technology, Tokyo Univ. of Agric. and Technology, 2-24-16 Nakamachi, Tokyo 184, Japan.
1994 Polymer, Vol. 35(10), 2197-2200. (E)

Raw silk - 1995.
La soie grège - 1995.
A.I.S./I.S.A.
Association internationale de la Soie/International Silk Association, 34 rue de la Charité, 69002 Lyon, France.
1995 Congrès de l'AIS/ISA, Mai 1995, Brighton, Great Britain. 28 p. (E,F)

Small-angle X-ray scattering of treated silk fibers.
Analyse par dispersion des rayons X à angle faible des fibres de soie traitées.
BHAT N.V., KARLEKAR R.B., CHITRA N., GEETHA P.
1994 Polym. Sci., Vol. 1, 357-361. (E)

Disulfide bond in recombinant repeat units from an aquatic insect's silk protein.
Liaison disulfure dans des unités recombinantes répétées d'une protéine de soie d'un insecte aquatique.
CASE S.T., SMITH S.V., BRATTON M.R.
Dept of Biochemistry, University of Mississippi Medical Center, 2500 North State Street, Jackson, MS 39216-4505, U.S.A.
1994 Mater. Res. Soc. Symp. Proc., Vol. 330(Biomolecular Materials by Design), 31-36. (E)

Observations on the estimation of amino groups in silk using ninhydrin reaction.
Evaluation des groupes aminés dans la soie par utilisation de la réaction à la ninhydrine.
CHAVAN R.B., NALANKILLI G.
1993 Indian J. Fibre Text. Res., Vol. 18(3), 129-134. (E)

Transport of pharmaceuticals through silk fibroin membrane.
Transport de produits pharmaceutiques à travers une membrane de fibroïne de soie.
CHEN J.Y., MINOURA N., TANIOKA A.
National Institute of Materials and Chemical Research, Tsukaba City, Ibaraki 305, Japan.
1994 Polymer, Vol. 35, 2583-2856. (E)

Ion permeability across silk fibroin membrane.
Perméabilité aux ions d'une membrane de fibroïne de soie.
CHEN J.Y., TANIOKA A., MINOURA N.
National Institute of Materials and Chemical Research, Tsukuba City, Ibaraki 305, Japan.
1994 Sen'i Gakkaishi, Vol. 50(1), 32-37. (E)

Bound water of silkworm cocoon.
L'eau contenue dans le cocon du ver à soie.
CHEN J., SHIRUO C.
1993 Zhejiang Sichou Gongxueyuan Xuebao, Vol. 10(2), 6-10. (C)

Yellowing of cocoon filament obtained from silkworm, *Bombyx mori* reared on artificial diet containing tofu cake powder.
Jaunissage du filament des cocons de vers à soie *Bombyx mori* élevés sur un milieu artificiel contenant de la poudre de gâteau tofu.
CHEN R., MORI H., SUMIDA M., MATSUBARA F., YAMAZAKI T., ITO H.
Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Kyoto 606, Japan.
1993 Sen'i Gakkaishi, Vol. 49(8), 416-420. (J)

Formation of nickel(11)-silk sericin (*Bombyx mori*) complexes and their secondary structure.
Formation de complexes nickel(11)-séricine de soie (*Bombyx mori*) et leur structure secondaire.
CHEN W., KOYAMA T., HANBUSA K., SHIRAI H.
1994 Kobunshi Ronbunshu, Vol. 51(3), 167-171. (J)

The effect of penetrating agents (monopol LX, emulon DO-113) treatment on reeling results.
L'effet du traitement des agents pénétrants (monopol LX, emulon DO-113) sur les résultats du dévidage.
CHOI J.S., BAE K.S., KIM D.G., JEONG W.B.
College of Agriculture, Donga University, Pusan, Korea Republic.
1992 Research Bulletin of Institute of Agricultural Resources - Donga Univ., Vol. 1(1), 39-51. (K,e)

Mechanical and thermal properties of dragline silk from the spider *Nephila clavipes*.
Propriétés mécaniques et thermiques de la soie de la toile de l'araignée *Nephila clavipes*.
CUNNIFF P.M. *et al.*
Natick Res., Development and Engineering Center, Dept of the Army, Natick, MA 01760-5019, USA
1994 Polym. Adv. Technol., Vol. 5(8), 401-410. (E)

Structural studies of dragline silk proteins and their peptides.
Etudes structurelles des protéines de soie de la toile d'araignée et leurs peptides.
DONG Z.
1992 Ph D, University of Wyoming, Laramie (Wy), U.S.A.. (E)

Physical properties and dyeability of NaOH-treated silk fibers.
Propriétés physiques et capacité tinctoriale des fibres de soie traitées à la soude.
FREDDI G., KATO H., TSUKADA M., ALLARA G., SHIOZAKI H.
Stazione Sperimentale per la Seta, via G. Colombo 81, 20133 Milano, Italy.
1995 Journal of Applied Polymer Science, Vol. 55, 481-487. (E)

Calibration curves between the concentration and absorbance for silk fibroin and sericin aqueous solutions.
Courbes d'étalonnage entre la concentration et l'absorbance des solutions aqueuses de séricine et de fibroïne.
FUKUI K., TSUBOUCHI K., AKAHANE T.
1994 Acta Seric. Entomol., Vol. 8, 45-50. (J)

Studies of degumming of silk with aliphatic amines.
Etudes du décreusage de la soie avec des amines aliphatiques.
GULRAJANI M.L., SINHA S.
1993 J. Soc. Dyers Colour., Vol. 109(7-8), 256-260. (E)

Effect of light on the properties of silk fabrics coated with parylene-C.
Effet de la lumière sur les propriétés des tissus de soie recouverts de parylène-C.
HALVORSON B.G., KERR N.
1994 Stud. Conserv., 1994, Vol. 39(1), 45-56. (E)

Physical characteristics of Indian and Japanese bivoltine cocoons.
Caractéristiques physiques des cocons bivoltins indiens et japonais.
HARIRAJ G., KINOSHITA H., SOMASHEKAR T.H.
Central Silk Technological Reserach Institute, CSB Complex, BTM Layout, Madivala, Bangalore 560 068, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(12), 31-36. (E)

Equilibrium sorption of water vapor in silk fibroin film.
Equilibre d'absorbtion de la vapeur d'eau d'un film de fibroïne de soie.
ISHIKURO J., HIRAI Y., NAKAJIMA T.
1994 Sen'i Gakkaishi, Vol. 49(12), 621-627. (E)

A study on the crystallinity of silk fibers. 1/ Crystallinity of acid-hydrolyzed silk fibroin.
Une étude sur la cristallinité des fibres de soie. 1/ Cristallinité de la la fibroïne de soie hydrolysée à l'acide.
JANG J.D., CHOI S.C.
1993 Han'guk Somyu Konghakhoechi, Vol. 30(10), 771-779. (C)

The drying of fresh silkworm cocoons by irradiation with microwave.
Séchage des cocons frais de vers à soie par irradiation aux micro-ondes.
KAGAWA T., SHINOZUKA H., MIKI M.
Saitama Cocoon Testing Station, Akebono, Kumagaya, Saitama 360, Japan.
1994 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 63(6), 488-493. (J,e)

Changes in physical properties and feel of glyoxal resin-treated silk fabrics by repeating wet cleaning and drying.
Variations des propriétés physiques et du toucher des tissus de soie traités avec de la résine glyoxale après des lavages et des séchages répétés.
KAKO T., KOMURASAKI K., KATAYAMA A.
Himeji Junior College, Himeji, Hyogo 670, Japan.
1994 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 63(6), 449-456. (J,e)

Sensory and mechanical characterization of feel in silk fabrics treated with glyoxalmonourein resin.
Caractérisation mécanique et sensoriel du toucher des tissus de soie traités avec de la résine glyoxalmonouréine.
KAKO T., KOMURASAKI K., KATAYAMA A.
Himeji Junior College, Himeji, Hyogo 670, Japan.
1994 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 63(6), 437-442. (J,e)

Properties of silk fabrics treated simultaneously with grafting and crosslinking agents.
Propriétés des tissus de soie traités simultanément avec des agents de greffage et de réticulation.
KAMIISHI Y.
Textile Research Institute of Gunma, Kityu, Gunma 376, Japan.
1994 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 63(5), 383-391. (J,e)

Self-organization (assembly) in biosynthesis of silk fibers - a hierarchical problem.
Auto-organisation dans la biosynthèse des fibres de soie - un problème hiérarchique.
KAPLAN D.L., FOSSEY S., VINEY C., MULLER W.
Biotechnology Division, Natick Research, Development and Engineering Center, U.S. Army, Natick, MA 01760-5020, U.S.A.
1992 Mater. Res. Soc. Symp. Proc., Vol. 255(Hierarchically structured materials), 19-29. (E)

Adsorption of acid dyes into silk fibers derived from cocoon filaments with different sizes.
Absorption des colorants acides par les fibres de soie dérivées de filaments de cocons de différentes tailles.
KATO H., TSUKADA M., OBO M., MIYAZAWA M.
1995 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 64(1), 82-84. (J)

Analysis for the void structure of silk fibers by tin-weighting.
Analyse de la structure vide des fibres de soie par pesée de l'étain.
KAWAHARA Y.
1993 Sen'i Gakkaishi, Vol. 49(12), 621-627. (E)

Changes in microstructures of silk fibers by treatment with organic solvents.
Changements dans les microstructures des fibres de soie par traitement avec des solvants organiques.
KAWAHARA Y.
1994 Sen'i Gakkaishi, Vol. 50(1), 43-45. (J)

Influence of residual soap on dyeing behavior of silk fibers.
Influence du savon résiduel sur le comportement à la teinture des fibres de soie.
KAWAHARA Y., FURUTA H.
1994 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 63(6), 511-513. (J)

Behavior of silk fibroin molecules in longitudinal hydrodynamic field.
Comportement des molécules de la fibroïne de soie dans un champ hydrodynamique longitudinal.
KHOLMUMINOV A.A., SATTOROV K..A., URINOV E.U.
1994 Vysokomol. Soedin., Ser. A Ser. B, Vol. 36(5), 878-880. (E)

Changes in molecular aggregation structures of silk fibroin fibers treated with organic solvents.
Changements dans les structures d'agrégation moléculaire des fibres de la fibroïne de soie traitées avec des solvents organiques.
KITAMURA A., CHEN K., SHIBAMOTO A., DEMURA M.
Aburadai, Akigawa, Tokyo 197, Japan.
1994 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 63(5), 415-419. (J,e)

N-terminal amino acid sequence analysis of cocoon shell low molecular weight proteins.
Analyse de la séquence des acides aminés N-terminaux des protéines à faible poids moléculaire des coques soyeuses.
KURIOKA A.
Silk Science Research Institute, 3-25-1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan.
1994 Reports of the Silk Science Research Institute, Vol. 42, 19-25. (J,e

Comparative study of the internal structures of Kevlar and spider silk by atomic force microscopy.
Etude comparative des structures internes du Kevlar et de la soie d'araignée par microscopie atomique.
LI S.F.Y., MAC GHIE A.J., TANG S.L.
1994 J. Vac. Sci. Technol. A, Vol. 12(4, pt 2), 1891-1894. (E

A report from the investigation of cocoon filament properties of silkworm variety resources.
Un rapport sur les tests de qualité des filaments des cocons de différentes variétés de vers à soie.
LIN C.Q., CHEN K.P., WU D.X., WANG P., QIN Y.
Sericultural Res. Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China.
1994 Canye Kexue, Vol. 20(4), 206-213. (C,e)

Structural engineering of an orb-spider's web.
Organisation structurelle d'une toile d'araignée sphérique.
LIN L.H., EDMONDS D.T., VOLLRATH F.
Clarendon Laboratory, University of Oxford, Oxford OX1 3PS, United Kingdom.
1995 Nature, Vol. 373, 146-148. (E)

Thermal analysis and molecular structure of *Antheraea yamamai* silk.
Analyse thermique et structure moléculaire de la soie d'*Antheraea yamamai*.
LIU G., WANG X., HU C.
1993 Zhejiang Sichou Gongxueyuan Xuebao, Vol. 10(1), 1-5. (C)

Physical properties of silk thread from cocoons of various Japanese local varieties of the silkworm, with special reference to the sex-dependent difference.
Propriétés physiques du fil de soie de cocons de différentes variétés locales japonaises de ver à soie, avec une référence spéciale à la différence liée au sexe.
LU Q., IIZUKA E.
Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Ueda, Nagano 386, Japan.
1994 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 63(6), 475-480. (J,e)

Yellowing of cocoon filaments produced by the silkworm reared with artificial diets.
Jaunissement des filaments des cocons produits par le ver à soie élevé sur un milieu artificiel.
MORI H., CHEN R.Y., SUMIDA M., IMAMURA T., MATSUBARA F.
Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Kyoto 606, Japan.
1994 Kyoto Kogei Sen'i Daigaku Sen'igakubu Gakujutsu Hokoku, Vol. 18, 85-95. (J)

Improvment of tusser silk fibrils by treatment with epoxy resin.
Amélioration des fibrilles de soie tussor par traitement à la résine époxyde.
NAKAJIMA S., TSUNODA T., YOSHIDA H., KOBAYASHI K.
1995 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 64(1), 65-67. (J)

In vivo synthesis and solid state structural analysis of a periodic chain containing local sequence inversions.
Synthèse *in vivo* et analyse struturelle à l'état solide d'une chaîne périodique contenant des inversions de séquences locales.
PARKHE A.D., FOURNIER A.J., MASON T.L., TIRRELL D.A.
1993 Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.), Vol. 34(1), 150-151. (E)

Prohibition of azo dyes in textiles.
Interdiction des teintures azoïques dans les textiles.
PRABHU J., JOSEPH M.A.
Central Silk Technological Research Institute, CSB Complex, BTM Layout, Madivala, Bangalore 560 068, India.
1995 Indian Silk, Vol. 33(11), 39-41. (E)

Studies on weight increase of silk fabric.
Etudes de l'augmentation de poids des tissus de soie.
RHEE K.B., OH B.S., CHOI G.Y., PARK C.Y., KIN G.D., GONG M.I.
1992 Yongu Pogo-Kungnip Kongap kisulwon, Vol.42, 64-81.

The effect of silk underwear on skin.
L'effet des sous-vêtement en soie sur la peau.
SHIMIZU H., SHIMIZU Y., SAKAGUCHI A., FUKUI J., SHIMAZAKI A.
Faculty of Education, Utsunomiya University, 350 Minemachi, Utsunomiya 321, Japan.
1995 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 64(1), 23-30. (J,e)

Adsorption of metal ions on silk.
Adsorption des ions métalliques sur la soie.
SHIMIZU Y., KIKUCHI K., TAKAGISHI T.
1994 Comp. Biochem. Physiol., Vol. 108A, 255-264. (E)

Relationship between the form of silk fibroin and the dyeing property.
Relation entre la forme de la fibroïne de soie et la propriété tinctoriale.
SHIMIZU Y., KIMURA M.
1994 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 63(6), 508-510. (J)

Solid-state 13C NMR of *Nephila clavipes* dragline silk establishes structure and identity of crystalline regions.
La RMN au 13C à l'état solide de la soie de la toile de *Nephila clavipes* établit la structure et l'identité des régions cristallines.
SIMMONS A., RAY E., JELINSKI L.M.
1994 Macromolecules, Vol. 27(18), 5235-5237. (E)

Effect of 2-directional measurement conditions on the determination and classification of cleanness and neatness of raw silk.
Effet des conditions de mesures bidirectionelles sur la détermination et la classification de propreté et de netteté de la soie grège.
TAJIMA F., INOUE M.
Faculty of Education, Yokohama National University, 156 Tokiwadai, Hodogaya-ku, Yokohama 240, Japan.
1994 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 63(5), 376-382. (J,e)

Extraction of parameters from the wawe-forms of cleanness and neatness of raw silk and their 2-dimensional distribution.
Extraction des paramètres des formes d'onde de la propreté et de la netteté de la soie grège et leur distribution bidimensionnelle.
TAJIMA F., INOUE M., ISHIGURO Y.
Faculty of Education, Yokohama National University, 156 Tokiwadai, Hodogaya-ku, Yokohama 240, Japan.
1994 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 63(6), 457-463. (J,e)

Conditions of producing hybrid silk by interlacing method.
Conditions de production de soie hybride par la méthode d'entrelacement.
TAKABAYASHI C., ITSUBO T., MIYAZAKI E.
Filature Engineering Research Team, National Institute of Sericultural and Entomological Science, Okaya City 394, Japan.
1995 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 64(1), 56-60. (J,e)

Crystal structure of native cellulose and silk (*Bombyx mori*).
Structure cristalline de la cellulose naturelle et de la soie (*Bombyx mori*).
TAKAHASHI Y.
Department of Macromolecular Science, Faculty of Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560, Japan.
1992 Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.), Vol. 33(1), 278-279. (e)

Physical and chemical microstructure of spider dragline : a study by analytical transmission electron microscopy.
Microstructure chimique et physique de la toile d'araignée : une étude par microscopie électronique en transmission.
THIEL B.L., KUNKEL D.D., VINEY C.
Department of Materials Science and Engineering, University of Virginia, Charlottesville, VA 22903-2442, USA.
1994 Biopolymers, Vol. 34, 1089-1097. (E)

Optical method for detection of many cocoon filaments.
Méthode optique pour la détection des filaments des cocons.
TOSHIMA Y., SHIMADA T.
1995 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 64(1), 75-78. (J)

Structure and compatibility of poly(vinyl alcohol)-silk fibroin (PVA/SF) blend films.
Structure et compatibilité des films mélangés de poly(vinyl alcohol) et de fibroïne de soie (PVA/SF).
TSUKADA M., FREDDI G., CRIGHTON J.S.
National Institute of Sericultural and Entomological Science, Owashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1994 J. Polym. Sci.: Part B : Polymer Physics, Vol. 32, 243-248. (E)

Preparation and application of porous silk fibroin materials.
Préparation et application des matériaux en fibroïne de soie poreuse.
TSUKADA M., FREDDI G., MINOURA N., ALLARA G.
National Institute of Sericultural and Entomological Science, Owashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1994 Journal of Applied Polymer Science, Vol. 54, 507-514. (E)

Physical properties of silk fibers grafted with a binary mixture of styrene and n-butyl methacrylate.
Propriétés physiques des fibres de soie greffées avec un mélange binaire de styrène et de n-butyl methacrylate.
TSUKADA M., FREDDI G., MONTI P., BERTOLUZZA A.
National Institute of Sericultural and Entomological Science, Owashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1993 J. Appl. Polym. Sci., Vol. 49, 1565-1571. (E)

Changes in physical properties of methacrylonitrile(MAN)-grafted silk fibers.
Varations des propriétés physiques des fibres de soie greffées avec du méthacrylonitrile(MAN).
TSUKADA M., FREDDI G., SHIOZAKI H., PUSCH N.
National Institute of Sericultural and Entomological Science, Owashi 1-2, Tsukuba , Ibaraki 305, Japan.
1993 J. Appl. Polym. Sci., Vol. 49, 593-598. (E)

Structural changes of silk fibroin membranes induced by immersion in methanol aqueous solutions.
Changements structuraux des membranes de fibroïne de soie, induits par l'immersion en solutions aqueuses de méthanol.
TSUKADA M., GOTOH Y., NAGURA M., MINOURA N., KASAI N., FREDDI G.
National Institute of Sericultural and Entomological Science, Owashi 1-2, Tsukaba , Ibaraki 305, Japan.
1994 J. Polym. Sci., Part. B: Polyme. Phys., Vol. 32(5), 961-968. (E)

Mechanical properties of silk fabrics graft-copolymerized with polyethylene glycol di(metha)acrylate.
Propriétés mécaniques des tissus de soie greffés-copolymerisés avec du polyéthylène glycol di(metha)acrylate.
TSUKADA M., KATO H., YOKOZAWA M., URASHIMA H., FREDDI G.
National Institute of Sericultural and Entomological Science, Owashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1994 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 63(6), 464-474. (E)

The preparation of poly[N(n-butoxymethyl)methacrylamide] grafted silk fibers by polymerization using a low pH system.
La préparation des fibres de soie greffées avec du poly[N(n-butoxymethyl)methacrylamide] par polymérisation avec un système à faible pH.
TSUKADA M., SHIOZAKI H., CRIGHTON J.S.
National Institute of Sericultural and Entomological Science, Owashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1993 J. Appl. Polym. Sci., Vol. 48, 1409-1416. (E)

Physical properties of silk fibers treated with ethylene glycol diglycidyl ether by the pad/batch method.
Propriétés physiques des fibres de soie traitées à l'éthylène glycol diglycidyl éther par la méthode pad/batch.
TSUKADA M., SHIOZAKI H., GOTO Y., FREDDI G.
National Institute of Sericultural and Entomological Science, Owashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1993 J. Appl. Polym. Sci., Vol. 50, 1841-1849. (E)

Studies on the effect of sample size on raw silk test results.
Etudes de l'effet de la taille des échantillons sur les résultats des tests de la soie grège.
VASUMATHI B.V., CHILALWAD S.L.
Central Silk Technological Research Institute, CSB Complex, BTM Layout, Madivala, Bangalore 560 068, India.
1994 Indian J. Seric., Vol. 33(2), 135-138. (E)

Research on fibroin fine structure of different varieties of cocoon.
Recherche sur la structure fine de la fibroïne de différentes variétés de cocons.
YANG B., LI M.S.
1992 Zhejiang Sichou Gongxueyuan Xuebao, Vol. 9(3), 4-9. (C)

Study on layer structure and dissolution properties of sericin.
Etude sur la structure des couches et les propriétés de dissolution de la séricine.
YOU Q., CHEN W.X.
1992 Zhejiang Sichou Gongxueyuan Xuebao, Vol. 9(3), 4-9. (C)

Study on properties of sericin solution and effect of surfactant on degumming.
Etudes des propriétés d'une solution de séricine et effet du tensio-actif sur le décreusage.
YOU Q., CHEN W.X.
1992 Zhejiang Sichou Gongxueyuan Xuebao, Vol. 9(4), 12-15. (C)

Model of the fibrillization mechanism of silk fibroin - conformational transition of fibroin by stretching.
Modèle du mécanisme de la fibrillisation de la fibroïne de soie : transition conformationnelle de la fibroïne par étirement.
YU T., LI G.
1993 Gaofenzi Xuebao, Vol. 4, 423-429. (C)

Viscoelastic behavior of *Bombyx mori* L. silk fibroin in solution.
Comportement viscoélastique de la fibroïne de soie de *Bombyx mori* L. en solution.
ZHENG C., WANG Y.
1993 Sichuan Daxue Xuebao Ziran Kexueban, Vol. 30(3), 365-369. (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. Seric. Sci. Jpn. Sous presse.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

* * *

INFORMATION FOR CONTRIBUTORS

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

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

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

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

5) The typescript should contain the following features:

- Title followed by the author's name and full address.
- Abstract which should be a brief summary of the contents and conclusions of the paper and should refer to any new information. It should not exceed 200 words and may be divided into numbered sections.
- Keywords. A short list of keywords provided for rapid scanning of the contents of the paper and used for compiling the index.
- Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion should be given for papers presenting original results. For review, authors may choose the convenient presentation.
- Acknowledgements.
- References. The 'Harvard system' is to be followed. References should be detailed in the following order: author's names and initials, date (in parentheses), the title of the article, the name of the journal as abbreviated in the World List of Scientific Periodicals (4th edit., 1963), the volume and the first and last pages of the article.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

* * *

Directeur Gérant : Dr H. BOUVIER **Dépôt légal : 1er trimestre 1995**