

Revue des Vers à Soie

Journal of Silkworms

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

Directeur Gérant
Rédacteur en Chef
Rédacteur Adjoint

H. BOUVIER
G. CHAVANCY
A. FOURNIER

Managing Director
Chief Editor
Deputy Editor

COMITE DE REDACTION
EDITORIAL BOARD

- | | |
|---|--|
| AKAPANTHU S. (Thaïlande / <i>Thailand</i>) | LIU S.-X. (Chine / <i>China</i>) |
| BEAULATON J. (France) | LU H.-S. (Chine / <i>China</i>) |
| BECK D. (France) | MANO Y. (Japon / <i>Japan</i>) |
| BOSQUET G. (France) | MAUCHAMP B. (France) |
| COUBLE P. (France) | PERSOONS C.J. (Pays-Bas / <i>Netherlands</i>) |
| DANDIN S.B. (Inde / <i>India</i>) | PRUDHOMME J.-C. (France) |
| DAS B.C. (Inde / <i>India</i>) | REALI G. (Italie / <i>Italy</i>) |
| DATTA R.K. (Inde / <i>India</i>) | SHIMURA K. (Japon / <i>Japan</i>) |
| DOIRA H. (Japon / <i>Japan</i>) | SHIRATA A. (Japon / <i>Japan</i>) |
| FONSECA T.C. (Brésil / <i>Brazil</i>) | SOMASHEKAR T.H. (Inde / <i>India</i>) |
| FOURCHE J. (France) | SONWALKAR T.N. (Inde / <i>India</i>) |
| FREDDI G. (Italie / <i>Italy</i>) | TAKAHASHI R. (Brésil / <i>Brazil</i>) |
| GOLDSMITH M.R. (USA) | TAZIMA Y. (Japon / <i>Japan</i>) |
| HORIE Y. (Japon / <i>Japan</i>) | TRENCZEK T. (Suisse / <i>Switzerland</i>) |
| IATROU K. (Canada) | VAGO C. (France) |
| JOLLY M.S. (Inde / <i>India</i>) | VEY A. (France) |
| KOBAYASHI M. (Japon / <i>Japan</i>) | XIA J.-G. (Chine / <i>China</i>) |
| KRISHNASWAMY S. (Inde / <i>India</i>) | YAMASHITA O. (Japon / <i>Japan</i>) |
| LEA H. Z. (Corée / <i>Korea</i>) | YANAGAWA H. (Japon / <i>Japan</i>) |
| LEGAY J.-M. (France) | |

SOMMAIRE - CONTENTS

Articles scientifiques / Scientific papers

- Eggshell architecture in the wild silkworm, *Bombyx mandarina*, inhabiting China** . . . 609
 Architecture du chorion chez une variété chinoise du ver à soie sauvage *Bombyx mandarina* . . . 619
 Y. KAWAGUCHI, M.-K. XU, Y. BANNO, K. KOGA, T. KAWARABATA & H. DOIRA
- Effect of high temperature on dehydrogenases of the haemolymph, fat body and silk gland of the silkworm, *Bombyx mori* L.** . . . 623
 Effet de la température élevée sur les déshydrogénases de l'hémolymphe, du corps adipeux et de la glande séricigène du ver à soie *Bombyx mori* L. . . . 629
 B. SURENDRA NATH, A. SURESH, B. MAHENDRA VARMA, Ch. SATHYANARAYANA RAJU & R.P. SURENDRA KUMAR
- Characterization of a geographical isolate nuclear polyhedrosis virus of the silkworm, *Bombyx mori* (L.)** . . . 633
 Caractérisation d'un isolat géographique du virus de la polyédrose nucléaire du ver à soie *Bombyx mori* (L.) . . . 641
 K.K. SINGH, S.S. INGALHALLI, R.D. SANAKAL, S.B. HINCHIGERI, S. BASAVARAJAPPA & C.J. SAVANURMATH
- Growth and photosynthesis of mulberry under ultraviolet-B-enhanced solar irradiances** . . . 645
 Croissance et photosynthèse du mûrier exposé à un rayonnement solaire enrichi en ultraviolets B . . . 651
 A. PREMKUMAR, N. NEDUNCHEZHIAN & G. KULANDAIVELU
- Differentiation of adventitious buds and plant regeneration by *in vitro* leaf culture in mulberry** . . . 655
 Différenciation des bourgeons adventifs et régénération des plants par culture *in vitro* des feuilles chez le mûrier . . . 661
 C.-F. LOU, J.-Z. TAN, J.-M. ZHOU & M.-J. HU

Rapports techniques / Technical reports

- Studies on the hibernation schedule for bivoltine pure and hybrid silkworm eggs, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), aestivated for twenty days under tropical conditions** . . . 665
 Etude d'un calendrier d'hibernation pour les oeufs de vers à soie bivoltins purs et hybrides (*Bombyx mori*) (Lepidoptera: Bombycidae) après estivation pendant vingt jours en milieu tropical . . . 677
 A. MANJULA & H.K. HURKADLI
- Studies on the catalase activity in the haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori* L.** 681
 L'activité de la catalase dans l'hémolymphe du ver à soie *Bombyx mori* L. . . . 687
 WU X.-f., LOU C.-f., XU J.-l., MIAO Y.-g. & CUI W.-z.
- Response of five different races of silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae), to hydrolysed soy protein supplementation** . . . 691
 Réponse de cinq races différentes du ver à soie *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) à l'apport de protéines de soja hydrolysées . . . 699
 V. VANISREE, X. NIRMALA & M. KRISHNAN

Survey on the seasonal incidence of uzi fly, <i>Exorista bombycis</i> (Louis), infestation on the silkworm, <i>Bombyx mori</i> L., and assessment of cocoon loss in Birbhum district, West Bengal, India	703
Etude sur l'incidence saisonnière de l'infestation du ver à soie <i>Bombyx mori</i> L. par la mouche uzi <i>Exorista bombycis</i> (Louis) et évaluation des pertes en cocons dans le district de Birbhum (Bengale occidentale, Inde)	711
N. CHAKRABORTY, S.S. BHATTACHARYA, N.K. DAS, S.K. SEN & T. PAVAN KUMAR	
Transfer of mulberry plants from test tubes to field: Evaluation of morphogenic and nutritional status	715
Transfert des plants de mûrier des tubes à essai vers les plantations : Evaluation de l'état morphogénétique et nutritionnel	719
A. ZAMAN, M.A. QADER, R. ISLAM, O.I. JOARDER & A.C. BARMAN	
Evaluation of leaf gas-exchange parameters of five Chinese mulberry germplasms in Indian tropical conditions	723
Evaluation des paramètres d'échanges gazeux des feuilles de mûrier de cinq lignées chinoises en milieu tropical indien	727
S. CHATTOPADHYAY, C. DAS, T. SENGUPTA, J.K. GHOSH, K.K. DAS, S.K. SEN & T. PAVAN KUMAR	
Effects of host genotypes, shoot age and climatic conditions on the development of <i>Phyllactinia corylea</i> in mulberry	729
Effet du génotype de l'hôte, de l'âge de la pousse et des conditions climatiques sur le développement de <i>Phyllactinia corylea</i> chez le mûrier	735
S. BISWAS, K.K. DAS, S.K. MANDAL & S.K. SEN	
Influence of host genotypes, shoot age and climatic conditions on the development of <i>Pseudocercospora mori</i> in mulberry	737
Influence du génotype de l'hôte, de l'âge de la pousse et des conditions climatiques sur le développement de <i>Pseudocercospora mori</i> chez le mûrier	743
S. BISWAS, N.K. DAS & T. PAVAN KUMAR	
Biophysical and biochemical characters of some mulberry cultivars resistant and susceptible to leaf spot (<i>Cercospora moricola</i>)	745
Caractères biophysiques et biochimiques de certains cultivars de mûrier résistants et sensibles à la tache foliaire (<i>Cercospora moricola</i>)	749
T. PHILIP, GOVINDAIAH, J. LATHA, D.D. SHARMA, A.K. BAIPAI & R.K. DATTA	
Seasonal incidence of some important nursery diseases of mulberry	753
Incidence saisonnière de certaines maladies importantes du mûrier en pépinière	759
J. SUKUMAR, S.D. PADMA, T.D. NAGENDRA KUMAR & U.D. BONGALE	
Note brève / Brief note	
Some records of pests and predators of primary muga food plants and muga silkworms (<i>Antheraea assama</i> Ww.) in Assam	763
Observations de parasites et prédateurs des plantes nourricières primaires muga et du ver à soie muga (<i>Antheraea assama</i> Ww.) dans l'Assam	767
P.K. SINGH & P.K. DAS	
Bibliographie / Bibliography	769
Instructions aux auteurs / Information for contributors	

EGGSHELL ARCHITECTURE IN THE WILD SILKMOTH, *BOMBYX MANDARINA*, INHABITING CHINA

Y. KAWAGUCHI^{1*}, M.-K. XU², Y. BANNO¹, K. KOGA¹, T. KAWARABATA³ &
H. DOIRA⁴

1. Laboratory of Sericultural Science, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan.
2. Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029, China.
3. Institute of Biological Control, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan.
4. Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan.

The eggshells of a Chinese inhabitant of *Bombyx mandarina* was observed for surface and internal structures using a scanning electron microscope, and the results were compared with those of *B. mori*. In both species, the shape of micropyle openings at the anterior pole region of the eggshell surface could be classified into four types, and, at the inside surface areas at the micropyle openings, structures named 'sperm ducts' were located. The number of these ducts depended on the type of the external openings. The size of rosette-shaped imprints and that of polygonal imprints on the lateral region of the egg surface were significantly smaller in *B. mandarina* than in *B. mori*. Also the shape and number of aeropyles and the feature of knobs distributed on the surface differed between *B. mandarina* and *B. mori*. The internal view of the *B. mandarina* chorion revealed mountain-like peaks with a large air cavity. This peculiar structure, previously confirmed in Japanese and Korean individuals of *B. mandarina*, has never been found in *B. mori*, suggesting the possibility that the difference of inhabitable environment between the two species has affected the morphological diversity of the eggshell.

Keywords: *Bombyx mandarina* in China, chorion, surface structure, internal air cavity.

INTRODUCTION

The insect eggshell, or chorion, protects the ooplasm and embryo from environmental hazards such as extreme temperatures, high humidity, dryness and pathogenic attacks (Hinton, 1962, 1967, 1969, 1970). Also it must support adequate rates of oxygen adsorption for the cells and allow the sperm entry. Although the eggshells of insects have general functions like these, their architectures are species specific (Margaritis, 1985). In the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, morphological analyses of the eggshell have been done in detail (Sakaguchi *et al.*, 1973; Kanda *et al.*, 1974; Akai, 1976; Ohtsuki *et al.*, 1977a, 1977b; Ohtsuki and Kanda, 1978; Mazur *et al.*, 1980; Regier *et al.*, 1980; Katsuno, 1984a, 1984b). The surface of *B. mori* chorion can be discriminated into four spatially differentiated regions, 1) the anterior pole region (which has the specialized area for the sperm entry), 2) the posterior pole region, 3) the ventral and dorsal regions (the former is close to the site where the germ band is formed) and 4) the lateral flat regions on which a large number of network patterns named polygons are observed. The sectional structure of the *B. mori* chorion is shown to be composed of three layers, outer, middle and inner. On the other hand, knowledge on the eggshell structures of the wild silkmoth, *Bombyx mandarina*, which is supposed to be an ancestor of the domesticated

* To whom correspondence should be addressed.

silkworm and known to inhabit Japan, Korea, China, etc., is scarce; there are only a few reports dealing with the surface and sectional structures of Japanese and Korean individuals (Omura and Kataoka, 1943; Sakaguchi *et al.*, 1990; Nho, 1990; Kawaguchi *et al.*, 1996). The aim of the present study is to characterize the eggshell morphology of *B. mandarina* collected in Zhejiang, China.

MATERIALS AND METHODS

Insects:

Female moths and fertilized eggs of *Bombyx mandarina* were collected from the University Farm of Zhejiang Agricultural University, China. The *B. mori* strain used was p22, a standard bivoltine, tetramolt strain maintained at the Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University. Mature eggs were removed from unmated female adults of *B. mandarina* and p22, washed with distilled water and processed as follows.

Morphological observation of the surface and internal structures of the eggshell:

For observation of the surface, the eggs were fixed for 3 hours with cold 3% glutaraldehyde in sodium cacodylate buffer, pH 7.2, then washed thoroughly in the same buffer, dehydrated in a graded ethanol series, freeze-dried with *tert*-butyl alcohol, sputter-coated with gold and subjected to a scanning electron microscopy (SEM) using an equipment, JSM5200. To observe the chorion layer structures the eggs were immersed in distilled water, ripped with fine watchmaker's forceps and then the fragments were processed as above and subjected to SEM. The average lengths of major and minor axes of an egg, the areas of network patterns (polygons) and those of petals surrounding the micropyle of eggshell were measured with SEM photographs, applying previously published methods (Kawamura and Nakada, 1981; Kawaguchi *et al.*, 1993).

RESULTS

Shape and size of mature eggs:

The lateral view of a mature egg of the present Chinese *B. mandarina* inhabitant was somewhat ellipsoidal (Fig. 1) like that of *B. mori*. The lengths of major and minor axes of the *B. mandarina* egg were 1.16 ± 0.01 mm and 0.99 ± 0.01 mm, respectively ($N = 50$), and its area at the lateral flat region was 0.92 ± 0.20 mm² ($N = 50$). These were in agreement with the corresponding values in *B. mori* measured in p22 (1.22 ± 0.03 mm, 0.98 ± 0.02 mm and 1.10 ± 0.04 mm², respectively; $N = 50$).

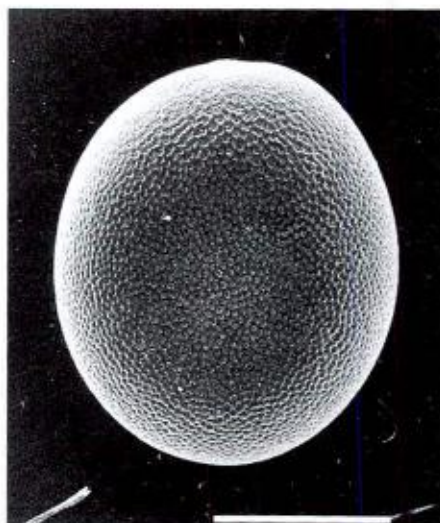


Fig. 1: Lateral flat side view of an eggshell of *B. mandarina* inhabiting China observed by SEM.

Upper side, anterior pole; bottom side, posterior pole; right and left sides, dorsal and ventral regions, respectively. Scale bar, 500 μ m.

Fig. 1 : Vue au microscope électronique à balayage de la face latérale d'un chorion de *B. mandarina* provenant de Chine.

Côté supérieur : pôle antérieur. Côté inférieur : pôle postérieur. Côtes droit et gauche : respectivement régions dorsale et ventrale. Echelle du trait : 500 μ m.

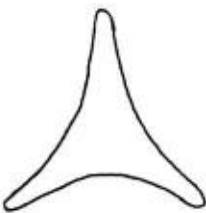
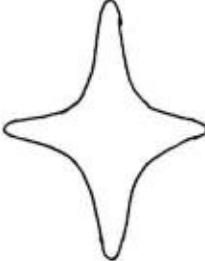
Morphology of anterior and posterior pole regions:

The anterior pole region of the eggshell surface in *B. mandarina* had the micropyle, a single external opening for the entrance of sperms (Fig. 2A and C). This opening, surrounded by comparatively uniform, petal-shaped imprints making a double-petaled rosette, was found to be bobbin-shaped, triangular, cruciform or starfish-shaped, depending on the individual (sketched in Table I; photographs of the triangular and cruciform types are seen in Fig. 2A and C, respectively). We confirmed that these features observed in *B. mandarina* were exactly the same as in *B. mori* (one of the examples is shown in Fig. 2E). However, the numbers of petals directly surrounding the micropyle opening in *B. mandarina* and *B. mori* were 10.6 ± 1.6 and 12.6 ± 1.2 , respectively ($N = 50$), slightly fewer in the former than in the latter, but the difference was statistically significant. As to the area of each petal, the value for *B. mandarina* ($1,417 \pm 278 \mu\text{m}^2$, $N = 50$) was significantly smaller than that ($1,976 \pm 342 \mu\text{m}^2$, $N = 50$) for *B. mori*.

Inside the micropyle region of eggshells, there were ducts which were connected with the external micropyle openings and thus considered to provide the routes for sperms (Fig. 2B and D). Each duct was about $13.5 \mu\text{m}$ in length and about $0.6 \mu\text{m}$ in inside diameter (Fig. 2F). Interestingly, the number of these 'sperm ducts' depended on the type of micropyle (Table I). Again, no difference was found between *B. mandarina* and *B. mori* with respect to the mode of occurrence, morphology and dimensions of these ducts.

Table I. Correlation between the shape of the micropyle and the number of 'sperm ducts'.

Tableau I. Corrélation entre la forme du micropyle et le nombre de « spermaductes ».

Shape of micropyle <i>Forme du micropyle</i>				
Type <i>Type</i>	Bobbin <i>Bobine</i>	Triangle <i>Triangle</i>	Cross <i>Croix</i>	Starfish <i>Etoile</i>
Number of 'sperm ducts' <i>Nombre de « spermaductes »</i>	2	3	4	5

The posterior region of the *B. mandarina* eggshell was found to be covered with irregularly shaped, large knobs (Fig. 3A). Each knob was provided with a wide aeropyle like a crater (Fig. 3B, large arrow) as well as a small aeropyle(s) (Fig. 3B, small arrow). On the other hand, the corresponding

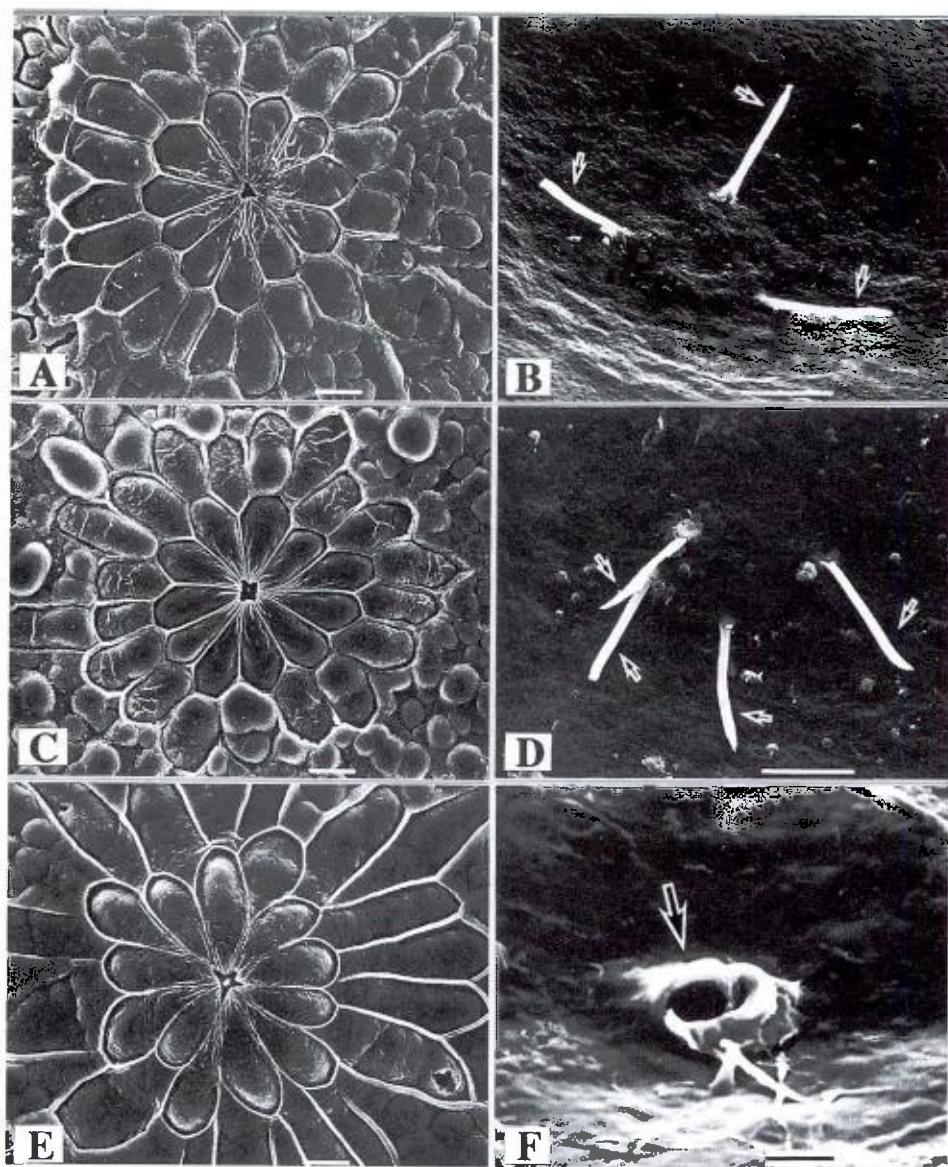


Fig. 2: Surface structures of the outside and inside at the anterior pole region of eggshells observed by SEM.

A, B, C, D and F: *B. mandarina*; E: *B. mori*.

A, C and E: the petal-like patterns surrounding the micropyle. B and D: the 'sperm ducts' (small arrows) located inside the eggshells. F: the 'sperm duct' (large arrow) observed in a sectional specimen.

Scale bars: 10 μ m in A, C and E; 10 μ m in B and D; 1 μ m in F.

Fig. 2 : Observation au microscope électronique à balayage des structures superficielles de l'extérieur et de l'intérieur du chorion au niveau de la région du pôle antérieur.

A, B, C, D et F : *B. mandarina*. E : *B. mori*.

A, C et E : dessin en forme de pétales autour du micropyle. B et D : « spermaductes » (petites flèches) à l'intérieur du chorion.

F : « spermaducte » (grande flèche) observé sur un spécimen en coupe.

Echelle des traits : 10 μ m en A, C et E; 10 μ m en B et D; 1 μ m en F.

region of the *B. mori* chorion revealed an assembly of numerous small knobs like granules (Fig. 3C), whose surface was simpler than that of *B. mandarina* and sometimes had small aeropyles (Fig. 3D). The huge and irregular knobs with wide aeropyles seen in *B. mandarina* were never observed in *B. mori*.

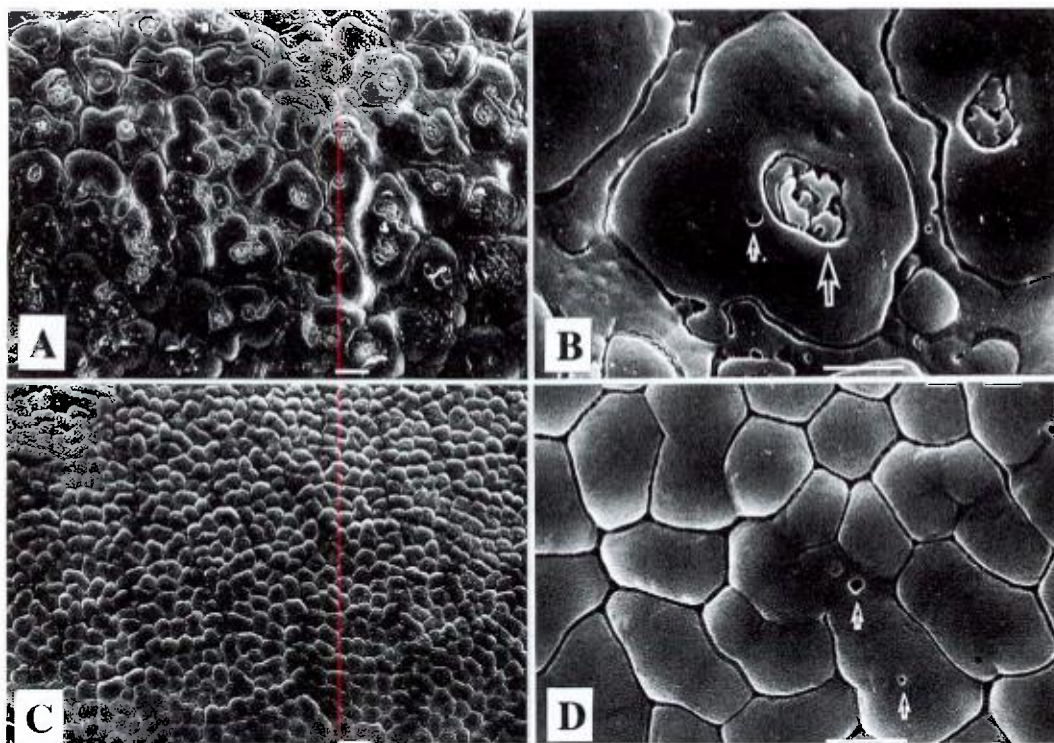


Fig. 3: Surface structure at the posterior pole region observed by SEM.

A and B: *B. mandarina*; C and D: *B. mori*.

Large and small arrows indicate the large and small aeropyles, respectively.

Scale bars: 10 μ m in A and C; 5 μ m in B and D.

Fig. 3 : Observation au microscope électronique à balayage de la structure superficielle de la région du pôle postérieur.

A et B : *B. mandarina*. C et D : *B. mori*.

La grande flèche indique le grand aéropyle ; les petites flèches indiquent les petits aéropyles.

Echelle des traits : 10 μ m en A et C ; 5 μ m en B et D.

Morphology of the lateral and ventral regions:

Like the *B. mori* chorion, the surface structure at the two flat lateral side regions of the *B. mandarina* chorion consisted of network patterns called the polygons, each of which corresponds to the secretory surface of a single follicular epithelial cell; the ridges at the boundary between polygons reflect the cell junctions. As to *B. mandarina*, each polygon is adjacent to five to eight polygons, making penta- to octagonal units, and the overall pattern of polygons varied from batch to

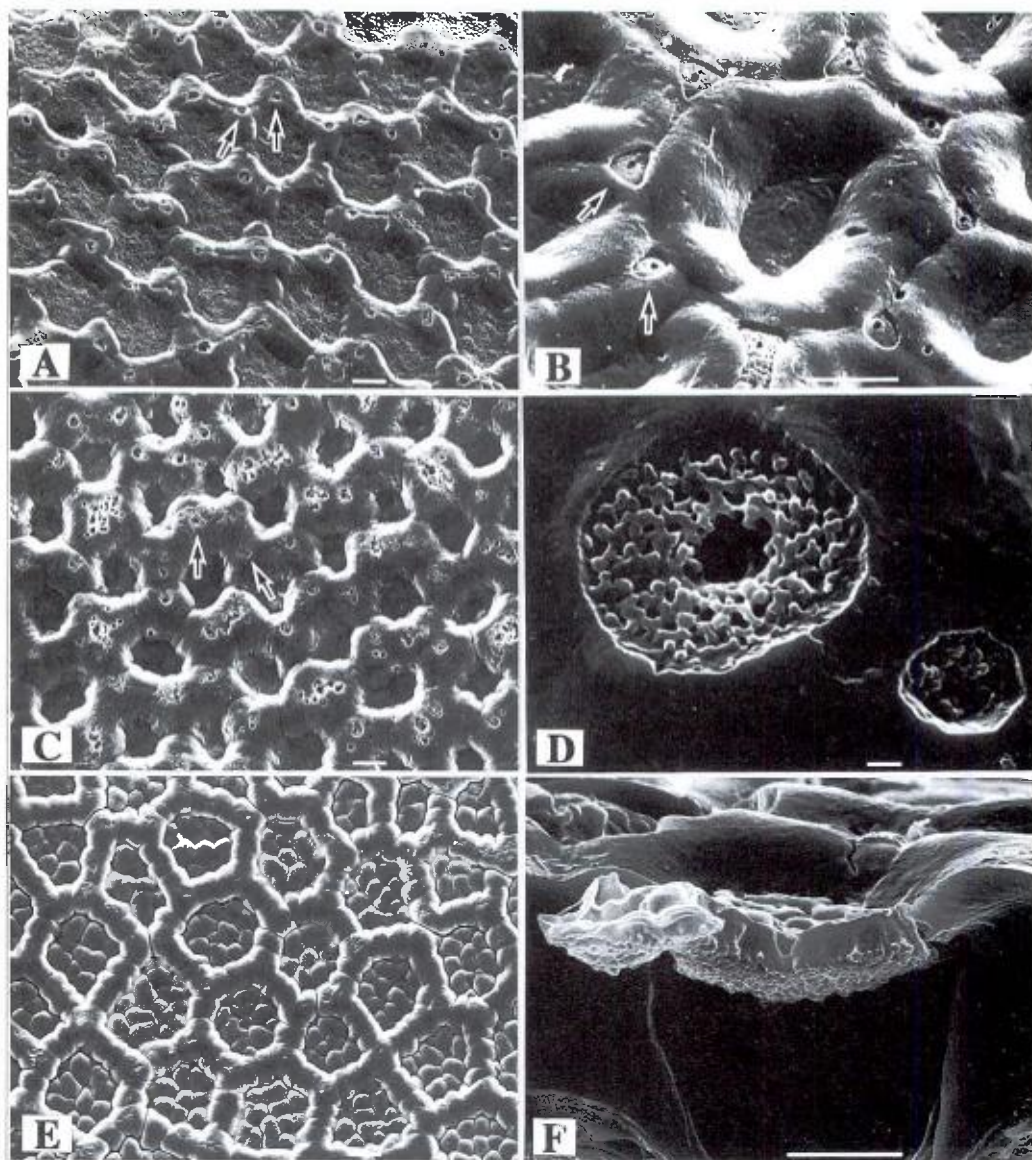


Fig. 4: Surface structure of the lateral flat region of eggshells observed by SEM.

A, B, C, D and F: *B. mandarina*; E: *B. mori*.

A network of polygonal imprints of the follicular epithelial cells is seen. Arrows in C denote the large aeropyles. B: higher magnification of a polygonal unit (arrows indicate large and small aeropyles); D: higher magnification of the large and the small aeropyles; F: the porous layer (and the hollow beneath the layer) at the polygon observed in a sectional specimen.

Scale bars: 10 μ m in A, C and E; 5 μ m in B and F; 1 μ m in D.

Fig. 4 : Observation au microscope électronique à balayage de la structure superficielle des régions latérales plates.

A, B, C, D et F : *B. mandarina*. E : *B. mori*.

On peut voir le réseau d'empreintes polygonales des cellules épithéliales folliculaires. Les flèches en C indiquent les grands aëropyles. B : agrandissement d'un polygone (les flèches indiquent les grands aëropyles) ; D : agrandissement des grands et des petits aëropyles ; F : couche poreuse (et cavité sous la couche poreuse) au niveau du polygone observée sur un spécimen en coupe.

Echelle des traits : 10 μ m en A, C et E ; 5 μ m en B et F ; 1 μ m en D.

batch of eggs (e.g. Fig. 4A and C). This is in contrast to *B. mori*, wherein the polygonal pattern was invariable in different batches of eggs. Large aeropyles opened at the junction of three cells (arrows in Fig. 4A, B and C), whereas small aeropyles were present on the boundary ridges. The inside of the large aeropyle had a meshwork with a central hole which seemingly facilitates gas exchange (Fig. 4D). This type of aeropyle was not found in *B. mori* (Fig. 4E). Each polygon of *B. mori* had eight to thirteen small knobs and only the small aeropyles were located on the boundary ridges as well as in the inner hollows. The average area of polygon ($469.1 \pm 62.4 \mu\text{m}^2$, $N = 250$) in *B. mandarina* was significantly smaller than that ($673.2 \pm 56.0 \mu\text{m}^2$, $N = 250$) in *B. mori*. The feature which was the most marked for *B. mandarina* was the air cavity under brittle and porous top materials (Fig. 4F). This structure will be observed more fully in what follows.

Huge knobs were distributed also at the ventral region of the *B. mandarina* eggshell (Fig. 5A). Large aeropyles were present (large arrow in Fig. 5B) and small aeropyles surrounded the large ones (small arrow in Fig. 5B), a feature resembling that at the posterior region (cf. Fig. 3A). However, the

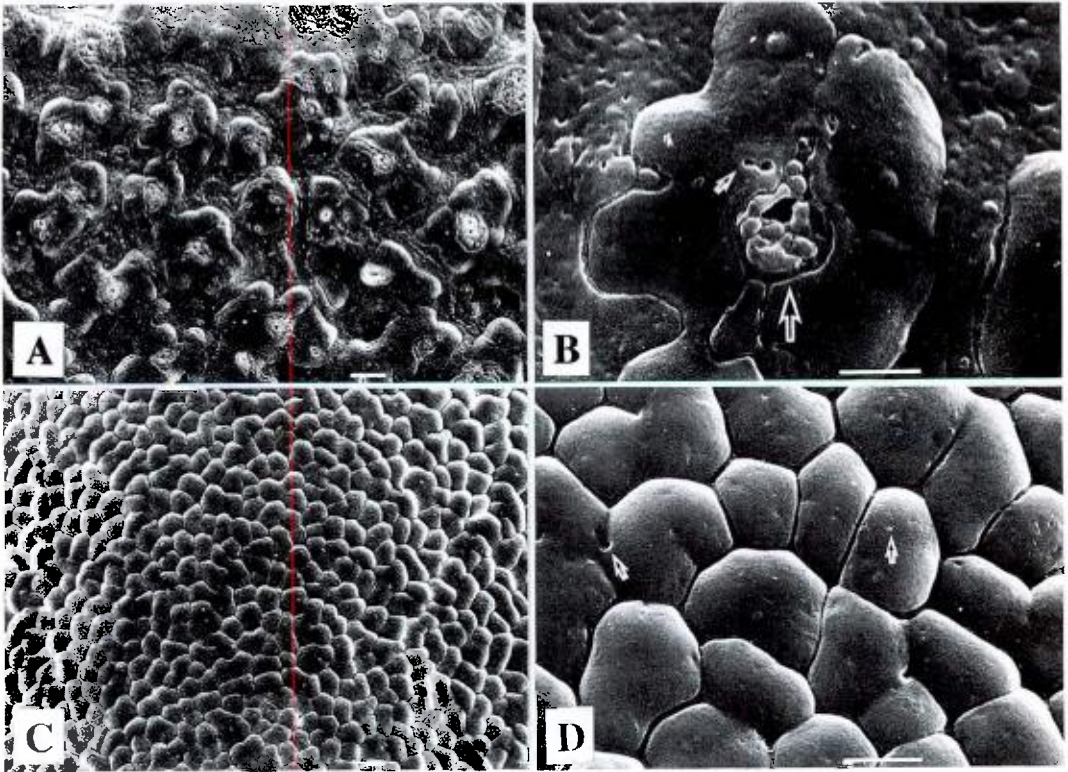


Fig. 5: Surface structure at the ventral side region of eggshells observed by SEM.

A and B: *B. mandarina*; C and D: *B. mori*.

Similar results were obtained for the dorsal side region (not shown). Large and small arrows indicate the large and small aeropyles, respectively.

Scale bars: 10 μm in A and C; 5 μm in B and D.

Fig. 5 : Observation au microscope électronique à balayage de la structure superficielle de la région dorsale.

A et B : *B. mandarina*. C et D : *B. mori*.

Les résultats sont identiques pour la région dorsale (non montrée). La grande flèche indique le grand aérople ; les petites flèches indiquent les petits aéroplex.

Echelle des traits : 10 μm en A et C ; 5 μm en B et D.

knobs at the ventral region seemed to be well carved, making the surface more undulating than at the posterior region. The morphology at the dorsal side surface of the *B. mandarina* chorion (not shown) was similar to that at the ventral region. In *B. mori*, the huge knobs and the large aeropyles were not observed (Fig. 5C and D), but only the small type of aeropyles were present (arrow in Fig. 5D). The surface structure was common among the dorsal, ventral and posterior regions in this species.

Morphology of cross sections of chorions:

Internal features of the *B. mandarina* chorion at different regions were observed using cross-sectional specimens. The chorion comprised three major layers, the inner, middle and outer (Fig. 6A, B, C and E). The thin innermost layer in contact with the vitelline membrane and the thick

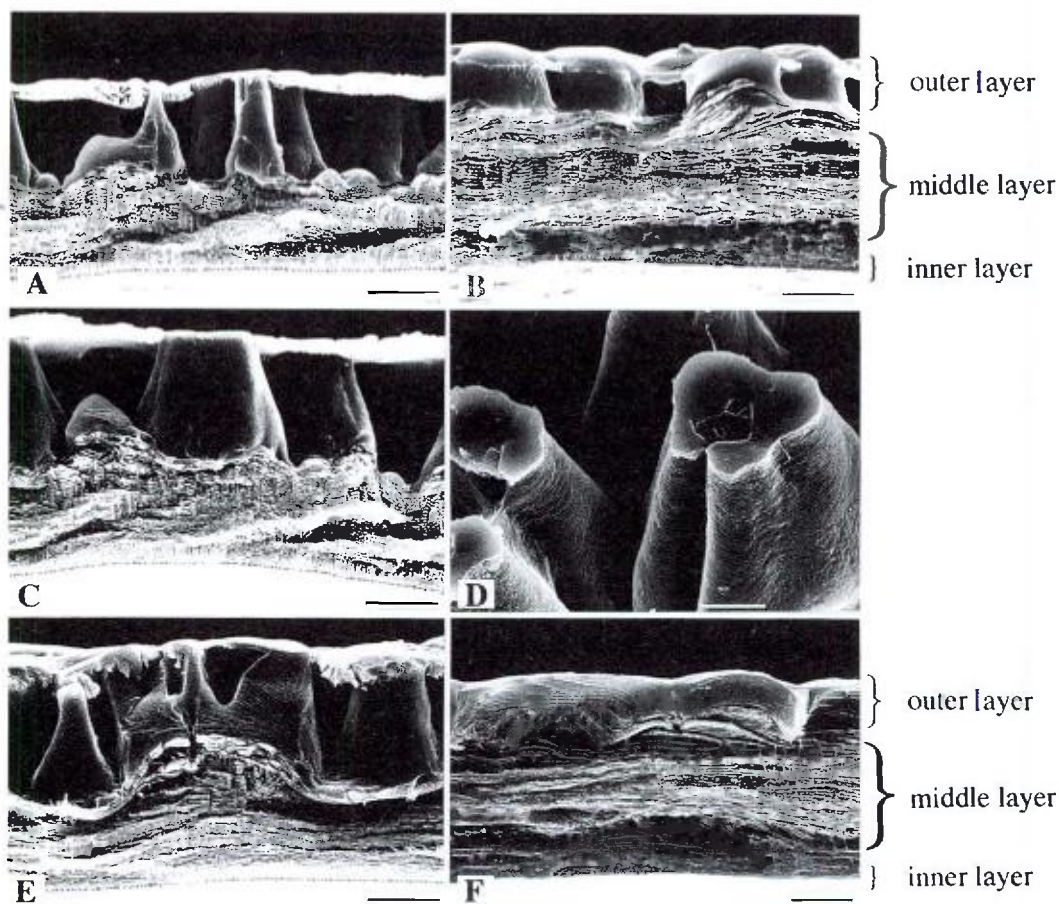


Fig. 6: Sectional structures at different regions of eggshells observed by SEM.

A, B, C, D and E: *B. mandarina*; F: *B. mori*.

A: at the anterior pole region surrounding the micropyle; B: at the ventral region; C and D: at the posterior regions; E and F: at the lateral flat side regions. Scale bars: 10 µm in A, B, C, E and F; 5 µm in D.

Fig. 6 : Observation au microscope électronique à balayage des structures en coupe de différentes régions du chorion.

A, B, C, D et E : *B. mandarina*. F : *B. mori*.

A : au pôle antérieur entourant le micropyle ; B : à la région ventrale ; C et D : aux régions postérieures ; E et F : aux régions latérales plates. Echelle des traits : 10 µm en A, B, C, E et F ; 5 µm en D.

middle layer having regular and parallel lamella were similar to those of *B. mori* (Fig. 6F). On the other hand, the outer layer of the chorion in *B. mandarina* was quite different from that in *B. mori*; the former had mountain-like peaks oriented perpendicularly to the surface, making large air spaces within the chorion layer, whereas the latter had no such peaks. These peaks, all of which seemed to be made of crusts exhibiting compactly integrated thin strata (Fig. 6D), varied in shape depending on the spatially differentiated regions: cylindrical at the anterior region surrounding the micropyle (Fig. 6A), short and thick at the ventral region (Fig. 6B), conical or dome-like at the posterior region (Fig. 6C and D) and complicated (as if two to four peaks were fusing) at the lateral region (Fig. 6E). On top of the peaks, there was a layer composed of brittle and porous materials, which were often scraped off during preparation of specimens.

DISCUSSION

The insect eggshells are composed of plural proteins synthesized in and secreted from the follicular epithelial cells which surround the oocytes. The choriogenesis proceeds according to a developmentally controlled, sophisticated program (Matsuzaki, 1968; Smith *et al.*, 1971; Mazur *et al.*, 1980; Bock *et al.*, 1986) and thus the imprinted surface structures of eggshells may be varied according to the secretory activities of these cells (Omura and Kataoka, 1943). The regional difference in the surface morphology of an eggshell (which can be discriminated into four regions; see Introduction) known in *B. mori* was also found in the present Chinese inhabitant of *B. mandarina*, as was so in a Japanese one (Kawaguchi *et al.*, 1996). The polymorphism in the micropyle shape, which was interconnected with the number of 'sperm ducts', was exactly the same between the present *B. mandarina* and *B. mori* specimens. However, there were remarkable differences between the two species in detailed surface morphology: the size of the petals surrounding the micropyle, the size and pattern of the polygons, the shape and number of aeropyles and the features of knobs at the posterior, ventral and dorsal regions. Moreover, we have reported that one of the most peculiar characters of *B. mandarina* was the internal structure of the chorion, i.e., the numerous mountain-like peaks which were never observed in *B. mori* but consistently found in the *B. mandarina* individuals collected in Japan (Sakaguchi *et al.*, 1990; Kawaguchi *et al.*, 1996). This structure was found also in a Korean inhabitant of *B. mandarina* (Nho, 1990). The present study confirmed that this was the case for the Chinese (although limited to Zhejiang) counterpart. We further showed here that these peaks had different shapes which depended on the region. The regional difference in shapes of these peaks was not clearly recognized in a Japanese inhabitant of *B. mandarina* (unpublished data). The large air cavity covered with a thin outermost layer appears to support respiration and helps to keep internal temperatures within tolerable ranges under severe environmental conditions, e.g., with much water and at extreme temperatures. This character, which is unnecessary for indoor species of the silkworm and probably lost during the establishment of the current *B. mori* species, seemed to be inherited dominantly by a single gene as far as suggested by our preliminary crossing experiments between *B. mandarina* and *B. mori*.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research (Nos. 07406004 and 08406006) from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan.

REFERENCES

- AKAI H. (1976) Surface Structure of Insects. University of Tokyo Press, Tokyo, pp. 122-127.
- BOCK S.C., CAMPO K., GOLDSMITH M.R. (1986) Specific protein synthesis in cellular differentiation. VI. Temporal expression of chorion gene families in *Bombyx mori* strain C101. Develop. Biol., 117, 215-225.
- HINTON H.E. (1962) The fine structure and biology of the egg-shell of the wheat bulb fly, *Leptohylemyia coarctata*. Quart. J. Microsc. Sci., 103, 243-251.

- HINTON H.E. (1967) The respiratory system of the egg-shell of the common housefly. *J. Insect Physiol.*, 13, 647-651.
- HINTON H.E. (1969) Respiratory system of insect egg shell. *Ann. Rev. Ent.*, 14, 343-368.
- HINTON H.E. (1970) Insect egg shell. *Sci. Amer.*, 223, 84-91.
- KANDA T., MATSUMURA H., OHTSUKI Y. (1974) Surface structure of silkworm (*Bombyx mori*) egg. I. Fine structure of micropylar apparatus. *J. Sericult. Sci. Japan*, 43, 379-383.
- KATSUNO S. (1984a) Size of polygonal patterns of the egg-shell and facets of the compound eye in the tetraploid silkworm, *Bombyx mori*. *J. Sericult. Sci. Japan*, 53, 1-6.
- KATSUNO S. (1984b) Surface structure of the egg-shell in polyploid silkworm, *Bombyx mori*. *J. Sericult. Sci. Japan*, 53, 97-107.
- KAWAGUCHI Y., BANNO Y., KOGA K., DOIRA H., FUJII H. (1993) Polygonal patterns on eggshells of giant egg mutant and large eggs induced by 20-hydroxyecdysone in *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 39, 437-443.
- KAWAGUCHI Y., BANNO Y., KOGA K., KAWARABATA T., DOIRA H. (1996) Comparison of chorion structure of eggs from *Bombyx mori*, *Bombyx mandarina* (Lepidoptera: Bombycidae) and their first filial generation. *Appl. Entomol. Zool.*, 31, 407-415.
- KAWAMURA N., NAKADA T. (1981) Studies on the increase in egg size in tetraploid silkworms induced from a normal and a giant egg strains. *Jpn. J. Genet.*, 56, 249-256.
- MARGARITIS L.H. (1985) Structure and physiology of the eggshell. In *Comprehensive Insect Physiology. Biochemistry and Pharmacology*. Ed. by G.A. Kerkut and L.I. Gilbert, Vol. 1, Pergamon Press, Oxford, pp. 153-230.
- MATSUZAKI M. (1968) Electron microscopic observation on chorion formation of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Sericult. Sci. Japan*, 34, 483-490.
- MAZUR G.D., REGIER J.C., KAFATOS F.C. (1980) The silkmooth chorion: Morphogenesis of surface structures and its relation to synthesis of specific protein. *Develop. Biol.*, 76, 305-321.
- NHO S.K. (1990) Chorion gene expression in the cellular differentiation and accumulation of chorion protein of silkmooth, *Bombyx mandarina*. I. Specific structures of egg-shell and chorion protein. *Korean J. Appl. Entomol.*, 29, 157-164.
- OHTSUKI Y., KANDA T. (1978) Characteristic structure of egg shell in the collapsing egg strain of the silkworm. *J. Sericult. Sci. Japan*, 47, 215-220.
- OHTSUKI Y., KANDA T., MATSUMURA H. (1977a) Surface structure of silkworm (*Bombyx mori*). II: Characteristics of different areas of egg surface. *J. Sericult. Sci. Japan*, 46, 45-50.
- OHTSUKI Y., KITAZAWA T., KANDA T. (1977b) *In vitro* formation of egg shell in the silkworm (*Bombyx mori*). *Zool. Mag.*, 86, 168-173.
- OMURA S., KATAOKA T. (1943) Shape, sizes and their formation of the surface pattern of the egg-shell in *Bombyx mori* and *Bombyx mandarina*. *J. Sericult. Sci. Japan*, 14, 263-275.
- REGIER J.C., MAZUR G.D., KAFATOS F.C. (1980) The silkmooth chorion: Morphological and biochemical characterization of four surface regions. *Develop. Biol.*, 76, 286-304.
- SAKAGUCHI B., CHIKUSHI H., DOIRA H. (1973) Observation of the eggshell structures controlled by gene action in *Bombyx mori*. *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.*, 18, 53-62.
- SAKAGUCHI B., SUGAHARA K., NAKAJIMA Y., KOGA K., NINAKI O., SUGIMOTO Y., GOLDSMITH M.R., MAZUR G.D., KAFATOS F.C. (1990) Expression of chorion multigene families of *Bombyx mandarina* in comparison with those of *Bombyx mori*. In *Advances in Invertebrate Reproduction 5*. Ed. by M. Hoshi and O. Yamashita, Elsevier, Amsterdam, pp. 517-522.
- SMITH D.S., TELFER W.H., NEVILLE A.C. (1971) Fine structure of the chorion of a moth, *Hyalophora cecropia*. *Tissue Cell*, 3, 477-489.

ARCHITECTURE DU CHORION CHEZ UNE VARIÉTÉ CHINOISE DU VER À SOIE SAUVAGE *BOMBYX MANDARINA*

Y. KAWAGUCHI^{1*}, M.-K. XU², Y. BANNO¹, K. KOGA¹, T. KAWARABATA³ & H. DOIRA⁴

1. Laboratory of Sericultural Science, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japon.
2. Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029, Chine.
3. Institute of Biological Control, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japon.
4. Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japon.

On a observé les structures superficielle et interne de chorions d'une variété chinoise de *Bombyx mandarina* au microscope électronique à balayage ; les résultats ont été comparés à ceux obtenus chez *B. mori*. Chez ces deux espèces, on peut classer la forme des orifices du micropyle dans la région du pôle antérieur de la surface du chorion en quatre catégories ; à l'intérieur des zones superficielles des orifices du micropyle, on observe des structures appelées « canaux à sperme ». Le nombre de ces canaux dépend du type de l'orifice externe. La taille des empreintes en forme de rosace et des empreintes polygonales sur la région latérale de la surface de l'oeuf est nettement plus petite chez *B. mandarina* que chez *B. mori*. De plus, la forme et le nombre d'aéropyles et les caractéristiques des bosses réparties sur la surface diffèrent entre *B. mandarina* et *B. mori*. La vue interne du chorion de *B. mandarina* fait apparaître des pics en forme de montagne avec une cavité d'air de grande taille. Cette structure particulière, déjà observée chez des spécimens japonais et coréens de *B. mandarina*, n'a jamais été observée chez *B. mori*, ce qui suggère que la différence d'habitat entre ces deux espèces affecte la diversité morphologique du chorion.

INTRODUCTION

La coque de l'oeuf des insectes, ou chorion, protège l'ovoplasme et l'embryon des risques environnementaux comme les températures extrêmes, l'humidité élevée, la sécheresse et les agents pathogènes (Hinton, 1962, 1967, 1969, 1970). Le chorion doit également assurer des taux appropriés d'adsorption d'oxygène pour les cellules et permettre l'entrée du sperme. Bien que tous les chorions d'insectes aient ces fonctions générales, leur architecture est spécifique de l'espèce (Margaritis, 1985). Chez le ver à soie domestique *Bombyx mori*, l'analyse morphologique du chorion a été réalisée de manière approfondie (Sakaguchi et coll., 1973 ; Kanda et coll., 1974 ; Akai, 1976 ; Ohtsuki et coll., 1977a, 1977b ; Ohtsuki et Kanda, 1978 ; Mazur et coll., 1980 ; Regier et coll., 1980 ; Katsuno, 1984a, 1984b). La surface du chorion de *B. mori* se divise en quatre régions différenciées en fonction de leur emplacement : 1) la région du pôle antérieur (qui comporte la zone spécialisée pour l'entrée du sperme), 2) la région du pôle postérieur, 3) les régions ventrale et dorsale (la première est située près du site de formation de la bande germinale) et 4) les régions plates latérales sur lesquelles on observe un grand nombre de motifs en réseau appelés polygones. La structure transversale du chorion de *B. mori* est composée de trois couches : la couche externe, la couche intermédiaire et la couche interne. En revanche, on connaît peu de choses sur les structures du chorion du ver à soie sauvage *Bombyx mandarina*, ancêtre supposé du ver à soie domestique habitant le Japon, la Corée, la Chine etc. :

* Auteur auquel doit être adressée la correspondance.

quelques rares publications traitent des structures superficielle et transversale des spécimens japonais et coréens (Omura et Kataoka, 1943 ; Sakaguchi et coll., 1990 ; Nho, 1990 ; Kawaguchi et coll., 1996). Cette étude a pour objet la caractérisation de la morphologie du chorion d'un spécimen de *B. mandarina* originaire du Zhejiang (Chine).

MATERIELS ET METHODES

Insectes :

Des papillons femelles et des oeufs fécondés de *Bombyx mandarina* ont été fournis par la ferme universitaire de la *Zhejiang Agricultural University* (Chine). La souche de *B. mori* utilisée est p22, un bivoltin standard tétramant conservé à l'*Institute of Genetic Resources (Faculty of Agriculture, Kyushu University)*. Les oeufs arrivés à maturité ont été prélevés chez des femelles non accouplées de *B. mandarina* et de p22, lavés dans l'eau distillée. Le protocole suivi est décrit ci-dessous.

Observation morphologique des structures superficielle et interne du chorion :

Pour l'observation de la surface, les oeufs ont été fixés pendant 3 heures avec du glutaraldéhyde à 3 % dans un tampon cacodylate de sodium, pH 7,2, puis lavés soigneusement dans ce tampon, déshydratés dans une série d'éthanol graduée, séchés sous congélation avec de l'alcool *tert*-butyl, enduits d'or et observés au microscope électronique à balayage à l'aide d'un appareil JSM5200. Pour l'observation des structures des couches du chorion, les oeufs ont été plongés dans de l'eau distillée et découpés à l'aide d'une pince d'horloger ; les fragments obtenus ont été traités selon le protocole décrit ci-dessus et soumis à une observation au microscope électronique à balayage. Les longueurs moyennes des axes majeur et mineur de l'oeuf, les zones comportant les motifs en réseau (polygones) et celles comportant les rosaces entourant le micropyle du chorion ont été mesurées d'après les photographies prises au microscope électronique à balayage, selon les méthodes décrites précédemment (Kawamura et Nakada, 1981 ; Kawaguchi et coll., 1993).

RESULTATS

Forme et taille des oeufs matures :

Latéralement, l'oeuf mature du spécimen chinois de *B. mandarina* est de forme ellipsoïde (Fig. 1), comme celui de *B. mori*. Les longueurs des axes majeur et mineur de l'oeuf de *B. mandarina* sont respectivement de $1,16 \pm 0,01$ mm et $0,99 \pm 0,01$ mm ($N = 50$) et la surface à la région latérale plate est de $0,92 \pm 0,20$ mm² ($N = 50$). Ces résultats correspondent aux valeurs obtenues chez la souche p22 de *B. mori* (respectivement : $1,22 \pm 0,03$ mm, $0,98 \pm 0,02$ mm et $1,10 \pm 0,04$ mm² ; $N = 50$).

Morphologie des régions des pôles antérieur et postérieur :

La région du pôle antérieur de la surface du chorion de *B. mandarina* comporte le micropyle, un seul orifice externe pour l'entrée du sperme (Fig. 2A et C). Cet orifice, entouré d'empreintes en forme de pétales, comparativement uniformes et formant une rosace à doubles pétales, a une forme de bobine, de triangle, de croix ou d'étoile suivant l'individu (dessins montrés dans le tableau I ; les photographies des types triangulaire et crueiforme sont présentés respectivement dans les Fig. 2A et 2C). Nous avons pu confirmer que les caractéristiques observées chez *B. mandarina* sont rigoureusement identiques à celles de *B. mori* (l'un des exemples est montré dans la Fig. 2E). Cependant, le nombre de pétales entourant directement l'ouverture du micropyle est de $10,6 \pm 1,6$ chez *B. mandarina* et $12,6 \pm 1,2$ chez *B. mori* ($N = 50$), soit légèrement moins chez le premier que chez le second, mais cette différence n'est pas statistiquement significative. Pour ce qui concerne la surface de chaque pétale, la valeur pour *B. mandarina* ($1\,417 \pm 278$ μm², $N = 50$) est nettement inférieure à celle de *B. mori* ($1\,976 \pm 342$ μm², $N = 50$).

A l'intérieur du micropyle, on observe des canaux connectés avec l'ouverture externe du micropyle qui sont supposés servir de conduits pour le sperme (Fig. 2B et D). Chaque canal mesure environ 13,5 μm de long et 0,6 μm de diamètre intérieur (Fig. 2F). Il est intéressant de noter que le nombre de ces spermaductes dépend du type de micropyle (Tableau I). Là encore, il n'y aucune

différence entre *B. mandarina* et *B. mori* pour ce qui concerne la présence, la morphologie et les dimensions de ces canaux.

La région postérieure du chorion de *B. mandarina* est recouverte de grandes bosses de forme irrégulière (Fig. 3A). Chaque bosse comporte un aérotype large et ressemblant à un cratère (Fig. 3B, grande flèche) ainsi qu'un ou plusieurs aérotype(s) de petite taille (Fig. 3B, petite flèche). Par ailleurs, la région correspondante du chorion de *B. mori* fait apparaître un amas de nombreuses petites bosses ressemblant à des granules (Fig. 3C) dont la surface est plus simple que celle de *B. mandarina* et comporte parfois de petits aérotypes (Fig. 3B). Les bosses irrégulières et de grande taille comportant de grands aérotype chez *B. mandarina* n'existent pas chez *B. mori*.

Morphologie des régions latérale et ventrale :

De même que le chorion de *B. mori*, la structure superficielle dans les deux régions latérales plates du chorion de *B. mandarina* est formée de motifs en réseau appelés polygones, dont chacun correspond à la surface sécrétrice d'une seule cellule épithéliale folliculaire ; les crêtes entourant les polygones reflètent les jonctions des cellules. Chez *B. mandarina*, chaque polygone est adjacent à cinq à huit autres polygones, formant des unités pentagonales à octogonales et le motif général des polygones varie d'un lot à l'autre (par exemple, Fig. 4A et C). Ceci est en contraste avec les observations réalisées sur *B. mori* chez lequel le dessin polygonal ne varie pas d'un lot à l'autre. Les grands aérotypes s'ouvrent à la jonction de trois cellules (flèches, Fig. 4A, B et C) tandis que les petits aérotypes sont présents sur les crêtes limitrophes. L'intérieur du grand aérotype présente une structure en mailles avec un orifice central qui semble faciliter les échanges gazeux (Fig. 4D). Ce type d'aérotype n'a pas été observé chez *B. mori* (Fig. 4E). Chaque polygone de *B. mori* comporte huit à treize petites bosses et seuls les petits aérotypes sont situés sur les crêtes limitrophes ainsi que dans les creux internes. La surface moyenne d'un polygone ($469,1 \pm 62,4 \mu\text{m}^2$, $N = 250$) chez *B. mandarina* est nettement inférieure à celle observée chez *B. mori* ($673,2 \pm 56,0 \mu\text{m}^2$, $N = 250$). La caractéristique la plus marquée chez *B. mandarina* est la cavité d'air située sous des matériaux poreux et friables (Fig. 4F). Cette structure sera observée plus en détail ci-après.

Des bosses de très grande taille sont également réparties sur la région ventrale du chorion de *B. mandarina* (Fig. 5A). Des aérotypes de grande taille sont présents (grande flèche, Fig. 5B) ainsi que de petits aérotypes entourant les grands (petite flèche, Fig. 5B), cette caractéristique ressemble à celle observée pour la région postérieure (cf. Fig. 3A). Cependant, les bosses de la région ventrale semblent être bien dessinées, rendant la surface plus ondulée qu'à la région postérieure. La morphologie de la surface dorsale du chorion de *B. mandarina* (non montrée) est similaire à celle de la région ventrale. Chez *B. mori*, les grandes bosses et les grands aérotypes n'ont pas été observés (Fig. 5C et D), le chorion présente uniquement des aérotypes de petite taille (flèche, Fig. 5D). La structure superficielle est identique dans les régions dorsale, ventrale et postérieure chez cette espèce.

Morphologie des coupes transversales du chorion :

Les caractéristiques internes du chorion de *B. mandarina* dans les différentes régions ont été observées sur des échantillons de coupes transversales. Le chorion comprend trois couches principales : la couche interne, la couche intermédiaire et la couche externe (Fig. 6A, B, C et E). La couche interne fine en contact avec la membrane vitelline et l'épaisse couche intermédiaire, qui présente des lamelles régulières et parallèles, sont similaires à celles de *B. mori* (Fig. 6F). Par contre, la couche externe du chorion de *B. mandarina* est très différente de celle de *B. mori* ; celle de *B. mandarina* comporte des pics en forme de montagne perpendiculaires à la surface, laissant de larges cavités d'air à l'intérieur de la couche du chorion tandis que celle de *B. mori* ne présente pas ce type de pics. La forme de ces pics, dont la croûte extérieure semble être faite de strates fines intégrées de manière compacte (Fig. 6D), varie suivant les régions différenciées en fonction de leur emplacement : ils sont cylindriques à la région antérieure entourant le micropyle (Fig. 6A), courts et épais à la région ventrale (Fig. 6B), coniques ou en forme de dôme à la région postérieure (Fig. 6C et D) et complexes (deux à quatre pics semblant fusionner) à la région latérale (Fig. 6E). Au sommet des pics, on observe une couche composée de matériaux friables et poreux que nous avons souvent effrités lors de la préparation des échantillons.

DISCUSSION

Les chorions d'insectes sont composés de nombreuses protéines synthétisées et sécrétées par les cellules épithéliales folliculaires qui entourent les ovocytes. La choriogenèse se déroule suivant un programme sophistiqué et contrôlé au niveau développemental (Matsuzaki, 1968 ; Smith et coll., 1971 ; Mazur et coll., 1980 ; Bock et coll., 1986), aussi les structures des empreintes superficielles peuvent-elles varier en fonction des activités sécrétrices de ces cellules (Omura et Kataoka, 1943). Les différences, liées à la région, de morphologie superficielle du chorion (que l'on peut diviser en quatre régions, voir l'introduction), qui sont connues chez *B. mori*, ont également été observées chez les spécimens chinois de *B. mandarina* étudiés ici, de même que chez une variété japonaise (Kawaguchi et coll., 1996). Le polymorphisme de la forme du micropyle, qui est lié au nombre de canaux à sperme, est rigoureusement identique chez les spécimens de *B. mandarina* et de *B. mori* considérés. Cependant, on observe des différences importantes entre ces deux espèces pour ce qui concerne le détail de la morphologie superficielle : la taille des pétales entourant le micropyle, la taille et le dessin des polygones, la forme et le nombre d'aéropyles et les caractéristiques des bosses aux régions postérieure, ventrale et dorsale. De plus, un des aspects le plus particulier de *B. mandarina* est la structure interne du chorion, caractérisée par de nombreux pics en forme de montagne que nous n'avons pas observés chez *B. mori* mais qui sont présents chez toutes les souches de *B. mandarina* collectées au Japon (Sakaguchi et coll., 1990 ; Kawaguchi et coll., 1996). Cette structure a également été observée chez une souche coréenne de *B. mandarina* (Nho, 1990). Cette étude confirme ces observations pour la souche chinoise (bien que limitée au Zhejiang). Nous avons également démontré que la forme de ces pics varie suivant la région du chorion. Les différences liées à la région de la forme de ces pics n'ont pas été distinguées de façon claire chez une souche japonaise de *B. mandarina* (données non publiées). La grande cavité d'air recouverte d'une fine couche externe semble contribuer à la respiration et permet de maintenir les températures internes dans des fourchettes tolérables lorsque les conditions environnementales sont défavorables, par exemple en cas d'humidité élevée ou de températures extrêmes. Cette caractéristique, qui n'est pas nécessaire pour les espèces domestiques du ver à soie et qui s'est probablement perdue lors de l'établissement de l'espèce de *B. mori* actuelle, semble être transmise de façon dominante par un seul gène, comme l'ont montré nos expériences préliminaires de croisement entre *B. mandarina* et *B. mori*.

EFFECT OF HIGH TEMPERATURE ON DEHYDROGENASES OF THE HAEMOLYMPH, FAT BODY AND SILKGAND OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

B. SURENDRA NATH*, A. SURESH, B. MAHENDRA VARMA,
Ch. SATHYANARAYANA RAJU** & R.P. SURENDRA KUMAR

Department of Zoology Sri Krishnadevaraya University, Anantapur - 515 003, India.

The effect of high temperature on dehydrogenases, namely, succinate dehydrogenase (SDH), malate dehydrogenase (MDH) and lactate dehydrogenase (LDH), in the haemolymph, fat body and silkgland on day 1, day 3, day 5 and day 7 of the fifth instar of the silkworm, *Bombyx mori*, was studied after exposure to high temperature ($33 \pm 1^\circ\text{C}$) continuously for a period of 7 days (i.e., approximate fifth instar larval duration). A significant reduction in the levels of SDH, MDH and increase in the levels of LDH in the tissues were observed. These changes clearly indicated abnormality in the oxidative metabolic activity at the mitochondrial level. The magnitude of these changes increased over time ($1 < 3 < 5 < 7$).

Keywords: Temperature, *Bombyx mori*, succinate dehydrogenase (SDH), malate dehydrogenase (MDH), lactate dehydrogenase (LDH).

INTRODUCTION

India being a tropical country, most of the places where silkworm rearing is conducted for commercial production of raw silk as well as seed production show a great degree of variation in temperature (Pillai and Krishnaswami, 1987; Benchamin and Reddy, 1989a, 1989b). The temperature affects not only the chemical reactions, but also causes conformational transition of various substrates, enzymes, etc. (Somme, 1972; Alexandrov, 1977; Reddy and Benchamin, 1992). Other workers established that increase in temperature entails a greater demand for energy to meet the metabolic requirements (Hochachka and Somero, 1973). No studies have been reported so far on the effect of high temperature on the vitally important enzymes of oxidative metabolism in the tissues of the silkworm, *Bombyx mori*, with reference to major sericultural zones like Andhra Pradesh and Tamil Nadu States, where extreme high temperatures (31°C to 46°C in the room to environment) prevail from late February to July. Hence, the present study was undertaken to evaluate the high temperature effects on certain oxidative metabolism enzymes in the functionally important tissues of the silkworm, *Bombyx mori*.

MATERIALS AND METHODS

Insect rearing:

A popular pure bivoltine breed of NB₄D₂ race (5th instar) of *Bombyx mori* of uniform size and age was used as test material in the present study.

Freshly hatched larvae of *Bombyx mori* were brushed and reared up to the fourth moult on leaves of *Morus alba* (K₂ variety) following standard rearing conditions (Krishnaswami, 1978).

* Present address: Central Silk Board, 6th Floor, BTM Layout, Madivala, Bangalore - 560 068, India

** Present address: Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore - 570 008, India.

Experimental procedure:

Immediately after the fourth moult, the test individuals of the same size and age were collected from the rearing tray, divided into six batches (each batch comprising 100 larvae) and transferred to the environmental chamber at $33 \pm 1^\circ\text{C}$ and $67 \pm 1\%$ relative humidity (RH) (prevailing humidity during the summer season). The larvae were fed four times a day up to spinning. Another set of six batches was maintained separately at standard rearing conditions of $23.5 \pm 1^\circ\text{C}$ and $75 \pm 5\%$ RH. These served as control batches. Six larvae each from the control and experimental batches were sacrificed on day 1 (24 hr after the last exposure), day 3 (72 hr after the last exposure), day 5 (120 hr after the last exposure), day 5 (120 hr after the last exposure) and day 7 (168 hr after the last exposure) for the estimation of enzyme levels.

Haemolymph, fat body and silk gland collection:

The haemolymph was collected on day 1, day 3, day 5 and day 7 separately from the control and experimental larvae by cutting the first pair of prolegs. The haemolymph from six larvae from each batch was pooled and collected in pre-chilled glass vials. The haemolymph thus collected was used for biochemical analysis. After collection of the haemolymph, both control and experimental silkworms were dissected out in ice-cold *Bombyx* saline (Yamaoka *et al.*, 1971) after making a longitudinal mid-ventral incision along the entire body length. The posterior silk gland and freely floating fat bodies from the abdominal region of the insect was carefully excised and was blotted, then the required weight of tissue was used for the estimation of enzymic activities.

Determination of enzyme activities:

Two per cent homogenates of fat body and silk gland were prepared in 0.25 % ice-cold sucrose solution for the estimation of succinate dehydrogenase (E.C.1.3.99.1), malate dehydrogenase (E.C.1.4.1.3), lactate dehydrogenase (E.C.1.1.1.27). Homogenates were centrifuged at 2500 g for 10 minutes at 4°C to remove cell debris. The clear cell-free extracts were used for enzyme assays. LDH activity was determined by the amount of formazon formed/mg protein/hr at 37°C incubation by the method of Srikanthan and Krishnamurthy (1955). The reaction mixture volume of 2 ml contained 100 μmoles of phosphate buffer (pH 7.4), 40 μmoles of sodium lactate, 0.1 μmole of NAD and 4 μmoles of 2-(4-indophenyl) 3-(4-nitrophenyl) 5-phenyltetrazolium chloride (INT). SDH and MDH activities were assayed by the amount of formazon formed/mg protein/hr at 37°C incubation by the method of Nachlas *et al.* (1960). The reaction mixture for SDH contained 100 μmoles of sodium phosphate buffer (pH 7.4), 40 μmoles of sodium succinate and 4 μmoles of INT. For MDH the reaction mixture was the same as that of SDH except for sodium succinate, sodium malate was used. For the estimation of LDH, SDH and MDH in the haemolymph, 0.2 ml haemolymph was added to the reaction mixture and run similarly.

Statistical analysis:

Student's *t* test was used to compare the mean values of the control group with those of the experimental group. A value of $P < 0.05$ was accepted as indicating significance.

RESULTS AND DISCUSSION

The results obtained in the present study are documented in Figures 1 to 3. The activity levels of SDH and MDH in the haemolymph, fat body and silk gland of larvae were found to be significantly decreased on day 1, day 3, day 5 and day 7 when subjected to high temperatures (Fig. 1 and 2). SDH and MDH are the oxidative enzymes involved in Krebs's cycle in the mitochondria and these two dehydrogenases are considered as an index of aerobic metabolism. Any perturbation in these enzymic activities is bound to affect the TCA cycle. Since this cycle represents a major oxidative pathway for carbohydrates, fats as well as most of the amino acids, the whole metabolism is likely to be affected. We presume that the progressive depletion in SDH and MDH levels in the tissues may be due to the

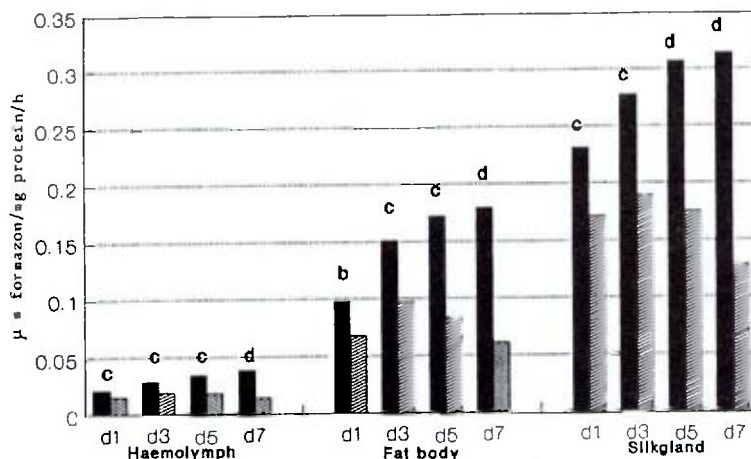


Fig. 1: Effect of high temperature on succinate dehydrogenase (SDH) levels in the haemolymph, fat body and silk gland on day 1, day 3, day 5 and day 7 of the fifth instar of control ($23.5 \pm 1^\circ\text{C}$) and experimental ($33 \pm 1^\circ\text{C}$) silkworms.

b: significant at $P < 0.02$; c: significant at $P < 0.01$; d: significant at $P < 0.001$. ■ Control. ▨ Experimental.

Fig. 1 : Effet de la température élevée sur les niveaux de succinate déshydrogénase (SDH) dans l'hémolymph, le corps adipeux et la glande séricigène aux 1er, 3e, 5e et 7e jours du cinquième âge chez les larves témoins ($23.5 \pm 1^\circ\text{C}$) et expérimentales ($33 \pm 1^\circ\text{C}$).

b: significatif à $P < 0,002$; c: significatif à $P < 0,01$; d: significatif à $P < 0,001$. ■ Témoin. ▨ Expérimental.

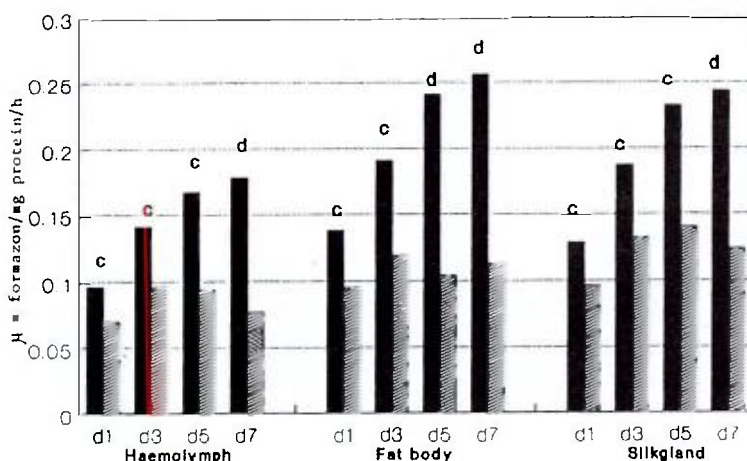


Fig. 2: Effect of high temperature on malate dehydrogenase (MDH) levels in the haemolymph, fat body and silk gland on day 1, day 3, day 5 and day 7 of the fifth instar of control ($23.5 \pm 1^\circ\text{C}$) and experimental ($33 \pm 1^\circ\text{C}$) silkworms.

c: significant at $P < 0.01$; d: significant at $P < 0.001$. ■ Control. ▨ Experimental.

Fig. 2 : Effet de la température élevée sur les niveaux de malate déshydrogénase (MDH) dans l'hémolymph, le corps adipeux et la glande séricigène aux 1er, 3e, 5e et 7e jours du cinquième âge chez les larves témoins ($23.5 \pm 1^\circ\text{C}$) et expérimentales ($33 \pm 1^\circ\text{C}$).

c: significatif à $P < 0,01$; d: significatif à $P < 0,001$. ■ Témoin. ▨ Expérimental.

disruption of mitochondrial organisation, indicating depression of oxidative metabolism at the mitochondrial level. These changes were in accordance with a previous report (Reddy and Benchamin, 1990) where the authors reported significant depletion in SDH and MDH levels in the testes of silkworms under high temperature conditions. Decreased levels of SDH and MDH indicate the reduction in aerobic metabolism due to high temperature. It is logical to assume that with the inhibition of oxidative enzymes, the metabolic pathway might have shifted towards the anaerobic side to meet the increased energy demand during high temperature conditions. An increase in LDH levels in all the tissues indicates increased anaerobic metabolism, which could correlate the energy to the decrease in SDH and MDH under high temperature conditions.

Increase in LDH activity in the haemolymph, fat body and silk gland (Fig. 3) on exposure to high temperature could be attributed to diminished enzyme activities of oxidative metabolism. This may suggest that the silkworms show a predominance of anaerobic metabolism under high temperature conditions. Since LDH activity is considered as an index of anaerobic metabolism, the results obtained in this investigation show a stepping-up of the anaerobic metabolism.

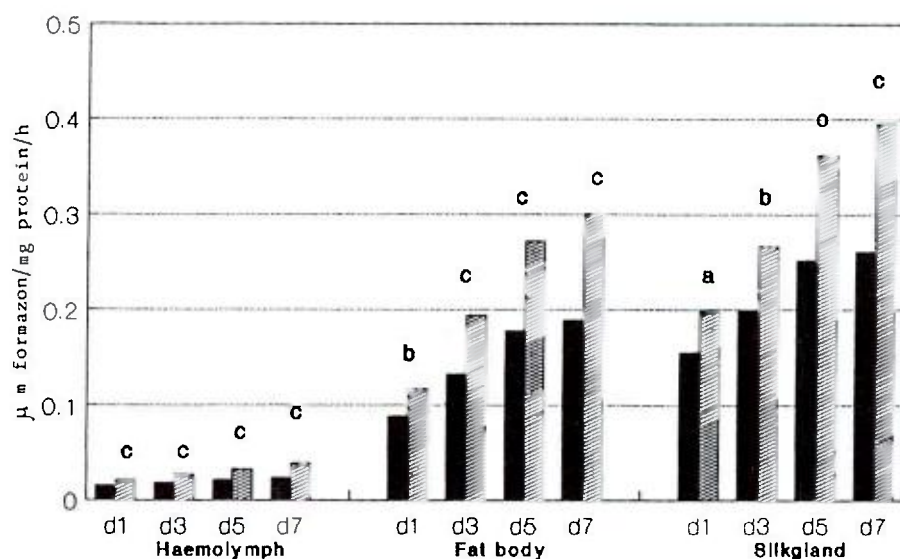


Fig. 3: Effect of high temperature on lactate dehydrogenase (LDH) levels in the haemolymph, fat body and silk gland on day 1, day 3, day 5 and day 7 of the fifth instar of control ($23.5 \pm 1^\circ\text{C}$) and experimental ($33 \pm 1^\circ\text{C}$) silkworms.

a: significant at $P < 0.05$; b: significant at $P < 0.02$; c: significant at $P < 0.01$. ■ Control. ▨ Experimental.

Fig. 3 : Effet de la température élevée sur les niveaux de lactate déshydrogénase (LDH) dans l'hémolymphe, le corps adipeux et la glande séricigène aux 1er, 3e, 5e et 7e jours du cinquième âge chez les larves témoins ($23.5 \pm 1^\circ\text{C}$) et expérimentales ($33 \pm 1^\circ\text{C}$).

a : significatif à $P < 0.05$; b : significatif à $P < 0.002$; c : significatif à $P < 0.01$. ■ Témoin. ▨ Expérimental.

The overall findings in the present study clearly demonstrate that mitochondrial oxidative metabolism is affected as a consequence of high temperature. The changes noticed in enzyme activities in this study may be directly related to temperature, indicating that high temperature could affect the synthesis of functional levels of oxidative enzymes directly or indirectly by altering the cytomorphology of the cells.

REFERENCES

- ALEXANDROV V.Y. (1977) Cells, Molecules and Temperature. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- BENCHAMIN K.V., REDDY K.V.R. (1989a) Heat shock effect on testicular differentiation and fertility in the silkworm (*Bombyx mori* L.) during spinning: A histological study. J. Reprod. Biol. Comp. Endocrinol., 1(1), 25-36.
- BENCHAMIN K.V., REDDY K.V.R. (1989b) Heat shock effect on testicular carbohydrate profiles in silkworm, *Bombyx mori*. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India, Newsletter, 4, 3.
- HOCHACHKA P.W., SOMERO G.N. (1973) Studies of Biochemical Adaptation. Saunders, Philadelphia.
- KRISHNASWAMI S. (1978) New technology of silkworm rearing. Bull. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India, 2, 1-24.
- NACHLAS M.M., MARGULIES S.P., SELIGMAN A.M. (1960) A colorimetric method for estimation of succinic dehydrogenase activity. J. Biol. Chem., 235, 499-503.
- PILLAI S.V., KRISHNASWAMI S. (1987) Adaptability of silkworm, *Bombyx mori* (L.) to tropical conditions. III. Studies on the effect of high temperature during later developmental stages of silkworm. Indian J. Seric., 26(2), 63-71.
- REDDY K.V.R., BENCHAMIN K.V. (1990) Effect of high temperature on testicular carbohydrate profiles in the silkworm, *Bombyx mori*, during spinning. J. Reprod. Biol. Comp. Endocrinol., 2(1), 31-36.
- REDDY K.V.R., BENCHAMIN K.V. (1992) Heat shock effect on testicular composition: A biochemical study in silkworm, *Bombyx mori*. Proc. Indian Nat. Sci. Acad., B 58(6), 329-332.
- SOMME L. (1972) The effect of acclimation and low temperatures on enzyme activities in larvae of *Ephestia kuehniella* Zell. (Lepidoptera: Pyralidae). Entomol. Scand., 3, 12-18.
- SRIKANTHAN T.N., KRISHNAMURTHY C.R. (1955) Tetrazolium test for dehydrogenases. J. Sci. Industrial Res., 14, 206-207.
- YAMAOKA K., HOSHINO M., HIRAO T. (1971) Role of sensory hairs on the anal papillae in oviposition behavior of *Bombyx mori*. J. Insect Physiol., 17, 897-911.

EFFET DE LA TEMPERATURE ELEVEE SUR LES DESHYDROGENASES DE L'HEMOLYMPHE, DU CORPS ADIPEUX ET DE LA GLANDE SERICIGENE DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L.

B. SURENDRA NATH*, A. SURESH, B. MAHENDRA VARMA,
Ch. SATHYANARAYANA RAJU** & R.P. SURENDRA KUMAR

Department of Zoology, Sri Krishnadevaraya University, Anantapur - 515 003, Inde.

*On a étudié les effets de la température élevée sur les déshydrogénases, à savoir la succinate déshydrogénase (SDH), la malate déshydrogénase (MDH) et la lactate déshydrogénase (LDH), dans l'hémolymphe, le corps adipeux et la glande séricigène aux premier, troisième, cinquième et septième jours du cinquième âge chez le ver à soie *Bombyx mori* exposé à une température élevée (33 ± 1 °C) de façon continue sur une période de sept jours (soit, approximativement, la durée du cinquième âge larvaire). On observe une diminution significative des quantités de SDH et de MDH et une augmentation de LDH dans les tissus. Ces variations indiquent clairement une anomalie de l'activité métabolique d'oxydation au niveau des mitochondries. L'amplitude de ces variations augmente avec l'âge ($1 < 3 < 5 < 7$).*

INTRODUCTION

L'Inde étant un pays tropical, la plupart des sites où sont effectués les élevages de vers à soie destinés à la production commerciale de soie grège et au grainage connaissent de fortes variations de température (Pillai et Krishnaswami, 1987 ; Benchamin et Reddy, 1989a, 1989b). La température non seulement affecte les réactions chimiques mais entraîne également une transition de la structure de différents substrats, enzymes etc. (Somme, 1972 ; Alexandrov, 1977 ; Reddy et Benchamin, 1992). Il a déjà été établi que l'augmentation de la température entraîne des besoins énergétiques supplémentaires pour répondre aux activités métaboliques (Hochachka et Somero, 1973). Aucune étude n'a été réalisée jusqu'à présent sur l'effet de la température élevée sur les enzymes d'importance vitale pour le métabolisme d'oxydation dans les tissus du ver à soie *Bombyx mori* dans les principales zones séricicoles comme les Etats de l'Andhra Pradesh et du Tamil Nadu où règnent des températures extrêmement élevées (31 °C à l'intérieur et 46 °C à l'extérieur) de la fin du mois de février au mois de juillet. Cette étude a donc été réalisée afin d'évaluer les effets de la température élevée sur certaines enzymes du métabolisme d'oxydation dans les tissus dont la fonction est importante chez le ver à soie *Bombyx mori*.

MATERIELS ET METHODES

Elevage des insectes :

Des insectes de taille et d'âge identique (5e âge) de la souche bivoltine pure populaire NB4D2 de *Bombyx mori* ont été utilisés comme matériel expérimental pour cette étude. Les larves néonates

* Adresse actuelle : Central Silk Board, 6th Floor, BTM Layout, Madivala, Bangalore - 560 068, Inde.

** Adresse actuelle : Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore - 570 008, Inde.

ont été levées et nourries jusqu'à la quatrième mue avec des feuilles de *Morus alba* (variété K2), suivant les méthodes d'élevage standard (Krishnaswami, 1978).

Protocole expérimental :

Dès la fin de la quatrième mue, des individus de taille et d'âge identiques ont été prélevés dans la claie d'élevage et répartis en six lots (chaque lot comprenant 100 larves) puis transférés en chambre climatique à $33 \pm 1^\circ\text{C}$ et $67 \pm 1\%$ d'humidité relative (taux d'humidité en été). Les larves ont été nourries quatre fois par jour jusqu'au filage. Un groupe témoin de six lots a été maintenu séparément selon les conditions d'élevage standard à $23,5 \pm 1^\circ\text{C}$ et $75 \pm 5\%$ d'humidité relative. Six larves prélevées dans chaque lot témoin et dans chaque lot expérimental ont été sacrifiées le premier jour (24 heures après la dernière exposition), le 3e jour (72 heures après la dernière exposition), le cinquième jour (120 heures après la dernière exposition) et le septième jour (168 heures après la dernière exposition) afin d'estimer les niveaux enzymatiques.

Prélèvement de l'hémolymph, du corps adipeux et de la glande séricigène :

L'hémolymph a été prélevée par incision de la première paire de fausses pattes les premier, troisième, cinquième et septième jours séparément chez des larves témoins et expérimentales. L'hémolymph prélevée chez six larves de chaque lot a été mélangée et déposée dans des bechers préalablement réfrigérés. L'hémolymph ainsi collectée a été utilisée pour l'analyse biochimique. Après prélèvement de l'hémolymph, les vers à soie témoins et expérimentaux ont été disséqués dans une solution saline glacée de *Bombyx* (Yamaoka et coll., 1971) après incision longitudinale de la partie ventrale sur toute la longueur du corps. Le sécréteur et les corps adipeux libres de la région intestinale de l'insecte ont été soigneusement excisés et séchés, puis le poids requis de tissu a été utilisé pour l'estimation des activités enzymatiques.

Détermination des activités enzymatiques :

Deux pour cent de broyats de corps adipeux et de glande séricigène ont été préparés dans une solution glacée de 0,25 M de saccharose pour l'estimation de la succinate déshydrogénase (E.C.1.3.99.1), de la malate déshydrogénase (E.C.1.4.1.3) et de la lactate déshydrogénase (E.C.1.1.1.27). Les broyats ont été centrifugés à 2 500 g pendant 10 minutes à 4°C pour éliminer les débris cellulaires. Les extraits acellulaires clairs ont été utilisés pour le dosage des enzymes. L'activité LDH a été déterminée en fonction de la quantité de formazon formée/mg protéine/h à 37°C d'incubation, selon la méthode de Srikanthan et Krishnamurthy (1955). Le volume du mélange réactionnel de 2 ml contient 100 μmoles de tampon phosphate (pH 7,4), 40 μmoles de lactate de sodium, 0,1 μmole de NAD et 4 μmoles de 2-(4-indophényl)3-(4-nitrophényl)5-chlorure phényltétrazolium (INT). Les activités SDH et MDH ont été mesurées en fonction de la quantité de formazon formée/mg protéine/h à 37°C d'incubation, selon la méthode de Nachlas et coll. (1960). Le mélange réactionnel pour la SDH contient 100 μmoles de tampon phosphate de sodium (pH 7,4), 40 μmoles de succinate de sodium et 4 μmoles de INT. Pour la MDH, le mélange réactionnel est identique à celui de la SDH, le succinate de sodium étant remplacé par du malate de sodium. Pour l'estimation de la LDH, de la SDH et de la MDH dans l'hémolymph, 0,2 ml d'hémolymph ont été ajoutés au mélange réactionnel et traités de la même façon.

Analyse statistique :

On a utilisé le test *t* de Student pour comparer les valeurs moyennes du groupe témoin avec celles obtenues pour le groupe expérimental. Une valeur $P < 0,05$ a été prise comme seuil de signification.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats obtenus dans cette étude sont présentés dans les figures 1 à 3. Les niveaux d'activité de la SDH et de la MDH dans l'hémolymph, le corps adipeux et la glande séricigène du ver à soie diminuent de manière significative les premier, troisième, cinquième et septième jours après exposition à une température élevée (Fig. 1 et 2). La SDH et la MDH sont des enzymes d'oxydation impliquées dans le cycle de Kreb dans les mitochondries et ces deux déshydrogénases sont considérées

comme des indices du métabolisme aérobie. Toute perturbation de l'activité de ces enzymes affecte le cycle TCA. Ce cycle constituant un passage d'oxydation majeur pour les hydrates de carbone, les graisses et la plupart des acides aminés, il est vraisemblable que le métabolisme soit affecté dans sa totalité. Nous estimons que la diminution progressive des niveaux de SDH et de MDH dans les tissus est due à la perturbation de l'organisation des mitochondries, indiquant une réduction du métabolisme d'oxydation au niveau des mitochondries. Ces modifications sont conformes à celles décrites dans une étude antérieure (Reddy et Benchamin, 1990) dans laquelle les auteurs font état d'une diminution significative des niveaux de SDH et de MDH dans les testicules de vers à soie exposés à une température élevée. La diminution des niveaux de SDH et de MDH indique que la réduction du métabolisme aérobie est due à la température élevée. Il est donc logique de penser que, du fait de l'inhibition des enzymes d'oxydation, la voie métabolique se soit déplacée vers la phase anaérobie pour répondre à l'augmentation des besoins énergétiques dans des conditions de température élevée. L'augmentation des niveaux de LDH dans tous les tissus indique un accroissement du métabolisme anaérobie, ce qui pourrait corrélérer l'énergie à la diminution de SDH et de MDH dans des conditions de fortes températures.

L'augmentation de l'activité de la LDH dans l'hémolymphe, le corps adipeux et la glande séricigène (Fig. 3) après exposition à une température élevée pourrait être attribuée à la diminution des activités enzymatiques du métabolisme d'oxydation. Ceci suggère que le ver à soie présente une tendance prédominante au métabolisme anaérobie dans des conditions de fortes températures. L'activité LDH étant considérée comme un indice du métabolisme d'anaérobie, les résultats obtenus dans cette étude font apparaître une accélération du métabolisme d'anaérobie.

Globalement, les résultats présentés dans cette étude montrent clairement que les températures élevées affectent le métabolisme d'oxydation des mitochondries. Les variations des activités enzymatiques observées dans cette étude sont directement liées à la température, ce qui indique que la température élevée affecte la synthèse des niveaux fonctionnels des enzymes d'oxydation directement ou indirectement en altérant la cytomorphologie des cellules.

CHARACTERIZATION OF A GEOGRAPHICAL ISOLATE NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* (L.)

K.K. SINGH¹, S.S. INGALHALLI¹, R.D. SANAKAL¹, S.B. HINCHIGERI²,
S. BASAVARAJAPPA¹ & C.J. SAVANURMATH^{1*}

1. Department of Sericulture, 2. Department of Biochemistry, Karnatak University,
Dharwad - 580 003, Karnataka, India.

Electron microscopic study of a geographical isolate nuclear polyhedrosis virus of the silkworm, Bombyx mori. (BmNPV-N) revealed variation in polyhedral size (ranging between 2.0 and 2.5 µm), shape (ranging from hexaoctahedral to octadecahedral), and the virion size was about 300 × 45 nm with membrane. Particularly, restriction endonuclease fragmentation patterns and sizes of bands suggested that it may be a genomic variant of BmNPV infecting the silkworm.

Keywords: *Bombyx mori*, *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, polyhedra, virion, restriction enzymes Hind III and Eco RI, genomic variant.

INTRODUCTION

Nuclear polyhedrosis viruses (NPVs) have been isolated from more than 350 insect species from seven different orders (Martignoni and Iwai, 1981). *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) is characterized by rod-shaped and enveloped virions containing a circular double-stranded DNA (Maeda and Majima, 1990). BmNPV has been a major pathogen of the silkworm, *B. mori*, causing great concern in sericulture (Horie and Watanabe, 1980; Samson *et al.*, 1990; Savanurmth *et al.*, 1994). While India ranks second in global silk production, Karnataka State alone contributes for about 60% of the mulberry silk production (Anonymous, 1991). However, farmers of this area experience hardship due to the incidence of the grasserie caused by BmNPV, especially in summer (Savanurmth *et al.*, 1994). To facilitate the study of the relative pathogeny of this isolate, it is necessary to characterize BmNPV-N. Therefore, the present studies have been undertaken.

Polyhedral inclusion bodies (PIBs) and virions of BmNPV occur in different shapes and sizes among geographical isolates (Aizawa, 1955; Kozlov and Alexeenko, 1967; Khosaka *et al.*, 1971; Piasecka and Payne, 1975; Smith, 1976; Godse, 1977; Satish and Govindan, 1987; Chishti and Schof, 1991; Somasekar, 1992). Extensive studies have revealed genotypic variation in field isolates of many types of baculoviruses (Lee and Miller, 1978; Smith and Summers, 1981; Getting and McCarthy, 1982; Crook *et al.*, 1985). The comparison of these viruses and their strains by site-specific restriction endonuclease analysis of DNA has revealed the heterogeneity. Such genomic diversity of the isolates is reflected in part in phenotype expression such as the morphology of virions (Kozlov and Alexeenko, 1967; Khosaka *et al.*, 1971; Piasecka and Payne, 1975; Ackermann and Smirnov, 1983; Satish and Govindan, 1987), composition of structural polypeptides (Summers and Smith, 1978; Monroe and McCarthy, 1984), the serological specificity (Smith and Summers, 1981; Knell *et al.*, 1983) and the basis for the variations in their biological properties. Iatrou *et al.* (1985) have shown the restriction endonuclease pattern and Maeda and Majima (1990) have estimated the size of BmNPV DNA of

* Corresponding author.

Japan isolate. However, such extensive studies have not been carried out on Indian counterparts especially with respect to Karnataka State, which is in the forefront of sericultural activities.

MATERIALS AND METHODS

The *BmNPV*-N isolate was collected from the haemolymph of field infected silkworms from the northern region of Karnataka, by cutting prolegs. The haemolymph was filtered through four layers of gauze and the polyhedra were pelleted by centrifugation at 5000 g for 10 min. at 4 °C. After repeated washings with water and then with 1M NaCl, the polyhedra were suspended in water, layered onto a cushion of 40% (w/w) sucrose and centrifuged at 100,000 g for 30 min. at 4 °C in a Hitachi RPS 28 SA rotor (Kobayashi and Nakagaki, 1984). The pellet was washed with double-distilled water, centrifuged at 5000 g and resuspended in a small volume of distilled water (0.5 ml per insect equivalent). At this stage, polyhedra were sufficiently pure for most purposes and stored at 4 °C. For long-term storage, polyhedra were freeze-dried and stored at 4 °C. A 10 µl drop of pure polyhedra suspension was placed on a slide, spread with a cover slip and the purity was examined under a compound microscope.

The polyhedra-derived virion particles were released from polyhedra by solubilizing the occlusion bodies in an alkaline solution. Lyophilized polyhedra (10 mg) were dissolved in 1 ml of dissolution buffer (0.1 M Na₂CO₃ and 0.05 M NaCl) or about 10¹⁰ polyhedra (several hundred µl as a packed volume) were pelleted and suspended in 4 ml of dissolution buffer. After incubation at 30 °C for 1 hr the clear opal coloured solution was centrifuged at 5000 g for 5 min. at room temperature to pellet the undissolved polyhedra and the supernatant was layered onto a 25% sucrose cushion containing 5 mM NaCl and 10 mM EDTA. Polyhedra-derived virions were pelleted by ultracentrifugation at 100,000 g (i.e., 27 K in Beckman SW 28 rotor) for 1 hr at 5 °C. The virion pellet was resuspended in Tris-EDTA buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 1 mM EDTA) and stored at 4 °C. The purified preparation was used for EM studies.

The virus envelope of NPV can be removed chemically by treatment with the detergent Nonidet P40 (NP40) (Harrap and Longworth, 1974). Routinely, nucleocapsids were prepared by incubating virus particles at 500 µg/ml in 1% NP 40 in 0.05 M Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride, pH 7.4, and 0.03 M NaCl (Tris buffer) for 30 min. at 30 °C. The nucleocapsids were separated from envelope components by centrifugation on a 10-50% (w/v) sucrose gradient in Tris-buffer at 45,000 g for 45 min.

For noting the size and shape of the polyhedra and virions, the samples were stained with neutral 2% phosphotungstic acid, air-dried on a collodion-coated copper grid and viewed at different magnifications (Summers and Paschke, 1970). Viral DNA was extracted from the virions after treatment with proteinase K (Merck) in the presence of 1% SDS (Maeda, 1989b). Concentration of the DNA was determined by using a UV spectrophotometer. The purity of the undigested DNA was ascertained by running a 0.7% agarose gel electrophoresis. Characterization of the DNA was carried out as suggested by Sambrook *et al.* (1989). The DNA was digested with Hind III and Eco RI endonucleases (Boehringer Mannheim, Indianapolis, USA) under the conditions specified by the supplier. The cleaved fragments were separated on 0.7% agarose gel using lambda phage (λ) DNA as a size marker. The relative migration of bands was measured by using Sequaid II computer programme.

RESULTS AND DISCUSSION

PIBs occur in different shapes and sizes and they may vary in different insects or even in the same insect (Smith, 1976). It was observed that the shape of polyhedra of *BmNPV*-N mostly ranged from hexaoctahedral to octadecahedral (Fig. 1 and 2). The sizes ranged from 2.0 to 2.5 µm. Aizawa (1955) reported a tetragonal shape and sizes ranging from 3 to 5 µm. Godse (1977) observed the average size of polyhedra as 2.03 µm. Satish and Govindan (1987) reported hexagonal and occasionally octogon shapes and sizes ranging from 1.64 to 2.11 µm among the *BmNPV* isolates of southern Karnataka. Chishti and Schof (1991) observed tetragonal and hexagonal shapes among the *BmNPV* isolates of Jammu and Kashmir. Likewise, Somasekar (1992) reported a hexagonal shape and sizes ranging from 2.8 to 4.60 µm in *BmNPV* from Tamil Nadu State.

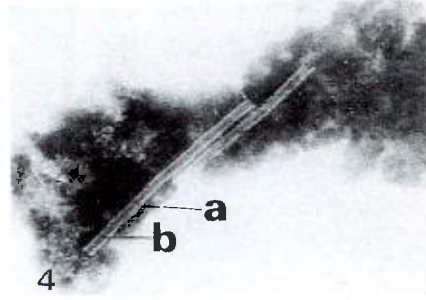
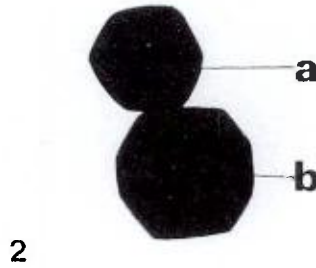
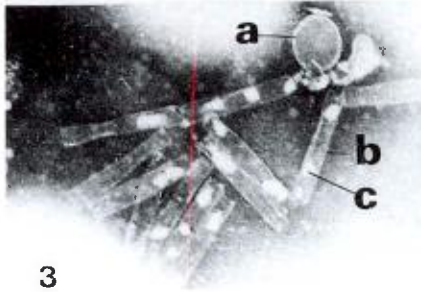
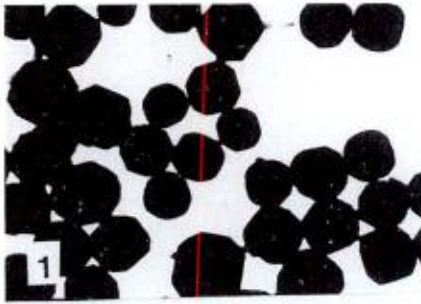


Fig. 1: *BmNPV-N* polyhedra $\times 6,400$.

Fig. 1 : *Polyèdres de BmNPV-N* $\times 6\ 400$.

Fig. 3: Empty virion, $300 \times 45\text{ nm}$, $\times 80,000$.

a: empty envelope. **b:** empty capsid. **c:** partial filling of the tube.

Fig. 3 : *Virion vide*, $300 \times 45\text{ nm}$, $\times 80\ 000$.

a : *enveloppe vide*. **b :** *capside vide*. **c :** *remplissage partiel du tube*

Fig. 2: *BMNPV-N* polyhedra $\times 17,800$.

a: hexaoctahedral. **b:** octadecahedral.

Fig. 2 : *Polyèdres de BmNPV-N* $\times 17\ 800$.

a : *hexaoctoèdrique*. **b :** *octodécédrique*.

Fig. 4: virus-associate cylinder.

a: envelope or intimate membrane. **b:** nucleocapsid.

Fig. 4 : *Cylindre associé au virus*.

u : *enveloppe ou membrane intime*. **b :** *nucléocapside*.

Moreover, there was not much information on the shape and size of the virions of Indian *BmNPV* isolates. However, presently it was observed that the virions are rod-shaped, measuring $300 \times 45\text{ nm}$ with a membrane (Fig. 3). A cylinder associated with the virus, measuring $400 \times 18\text{ nm}$, was also observed having an envelope and nucleocapsid (Fig. 4). It is reported that the virion nucleocapsid, which is compactly packed inside the outer envelope, gets elongated once it is peeled off. Similar observations were also made by Khosaka *et al.* (1971). They have reported the dimension of the virions as $330 \times 80\text{ nm}$ and $360 \times 60\text{ nm}$ with and without membrane, respectively. However, the observation made in the present study needs further investigation. Kozlov and Alexeenko (1967) reported the virion dimension as $400 \times 90\text{ nm}$. Piasecka and Payne (1975) observed a $280 \times 75\text{ nm}$ virion size while Satish and Govindan (1987) reported the size of the enveloped virion (virion with an outer developmental membrane) as $247 \times 96\text{ nm}$ while the inner core measured $215 \times 55\text{ nm}$ in intact condition.

Previous studies have shown that baculovirus isolates from separate populations of one host or closely related host species may vary considerably in pathogenicity for their hosts (Payne *et al.*, 1981; Hughes *et al.*, 1983) and this may be due to a genotypic variation (Hatfield and Entwistle, 1988; Mathad *et al.*, 1991).

Table I. Sizes (kilobase pairs) of *BmNPV*-N DNA isolate restriction fragments.

Tableau I. Taille (en kilopaires de bases) des fragments de restriction de l'isolat d'ADN du BmNPV-N.

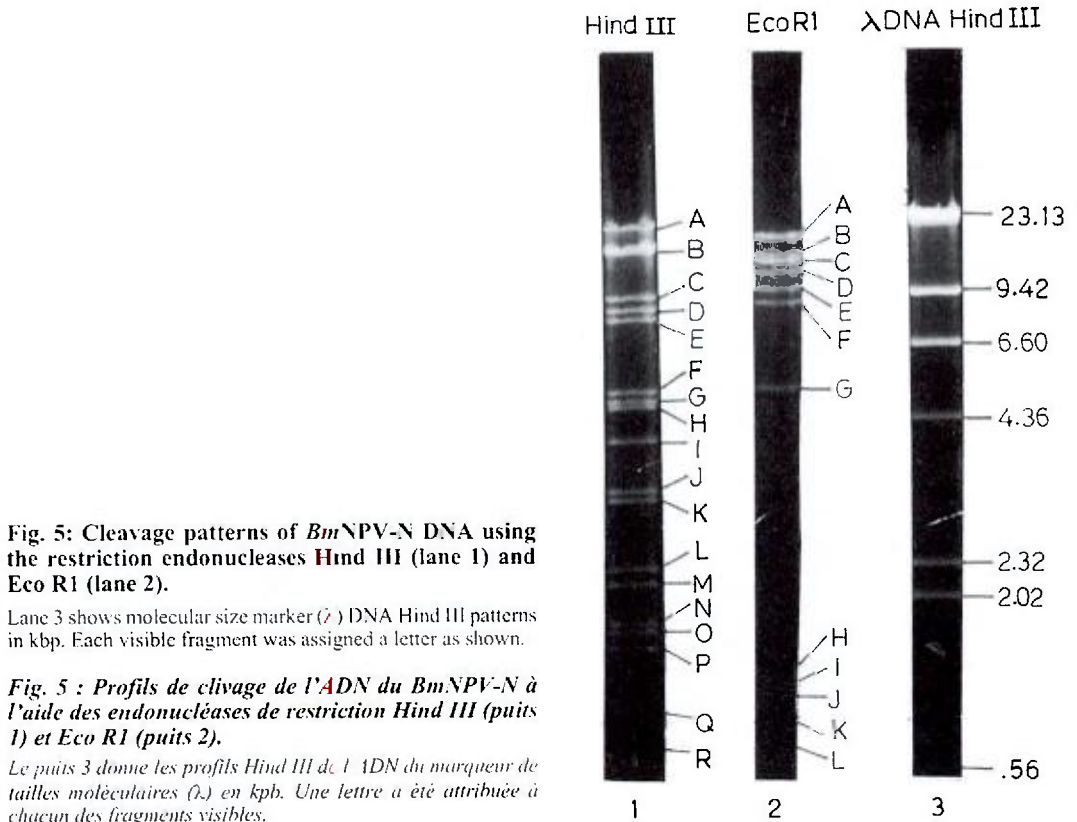
Fragments	Sizes (kbp) / Tailles (kpb)		
	Hind III	Eco R1	Hind III (marker) (marqueur)
A	24.06	17.50*	23.13
B	15.16	17.50	9.42
C	14.80	14.24	6.60
D	9.44	12.72*	4.36
E	8.56	12.72	2.32
F	8.20	12.08	2.02
G	5.16	10.26	.56
H	4.90	9.07	
I	4.70	5.23	
J	4.00	1.57	
K	3.18	1.47	
L	3.11	1.38	
M	2.29	1.23	
N	2.19	1.18	
O	1.90		
P	1.83		
Q	1.74		
R	1.23		
S	1.05		
	117.50 kbp	117.85 kbp	

* Bands are more intense than the regular single bands and are considered as two fragments of approximately same size.

* Ces bandes sont plus intenses que les bandes simples normales et sont considérées comme étant deux fragments de taille à peu près identique.

Restriction endonuclease analysis of a number of baculoviruses from different geographical regions has shown that each isolate has a unique set of DNA fragments, perhaps indicating the variation in the genomic DNA. Therefore, analysis of viral DNA by such methods is a useful tool in identification and classification of baculoviruses (Miller and Dawes, 1978; Smith and Summers, 1978, 1979; McIntosh and Ignoffo, 1983; Crook *et al.*, 1985). Iatrou *et al.* (1985) were the first to study the restriction endonuclease pattern of *BmNPV* DNA of Japan isolate. In the present study, Hind III and Eco R1 digestion of the *BmNPV*-N DNA demonstrated 19 and 14 fragments, respectively (Fig. 5, Table I). The total size of the genome measured, respectively, 117.50 and 117.85 kbp (say, approximately 118kbp). Somasekar (1992) has reported only 9 to 14 fragments, measuring between 109.09 and 139.62 kbp for the four different isolates from Tamil Nadu, using Hind III restriction endonuclease analysis, while Maeda and Majima (1990) have suggested 18 bands for each of the same enzymes and reported the size as measuring 130 kbp for an isolate from Japan. As compared to these observations, the *BmNPV*-N isolate appears to have a genome smaller in size than some of the Tamil Nadu and Japanese isolates and certainly larger in size than some of the other isolates from Tamil

Nadu. Therefore, the results of the morphological and genetic characterization of the *Bm*NPV enable us to conclude that this isolate from northern Karnataka is a distinct geographical isolate.



ACKNOWLEDGEMENTS

This work was undertaken by the research grants provided by the Central Silk Board, Bangalore, under the National Sericulture Project. The first author expresses his gratitude to Prof. K.P. Gopinathan, Chairman, Department of Microbiology and Cell Biology, Indian Institute of Science, Bangalore, for providing guidance and laboratory facilities as a short-term researcher in his lab.

REFERENCES

- ACKERMANN H.-W., SMIRNOFF W.A. (1983) A morphological investigation of 23 baculoviruses. *J. Invertebr. Pathol.*, 41, 269-280.
- AIZAWA K. (1955) A preliminary note on the tetragonal polyhedra in silkworm. *Sansikenkyu*, 14(4), 11-13.
- ANONYMOUS (1991) *Silk in India: Statistical Biennial*. Central Silk Board, Bangalore, India.
- CHISHTI M.Z., SCHOF K.A. (1991) Studies on the polyhedral disease of the silkworm, *Bombyx mori*, in Jammu and Kashmir State. *Indian J. Seric.*, 29(1), 155-157.

- CROOK N.E., SPENCER R.A., PAYNE C.C., LEISY D.J. (1985) Variation in *Cydia pomonella* granulosus virus isolates and physical maps of the DNA from three variants. *J. Gen. Virol.*, 66, 2423-2430.
- GETTING R.R., McCARTHY W.J. (1982) Genotypic variation among wild isolates of *Heliothis* spp. nuclear polyhedrosis viruses from different geographical regions. *J. Virology*, 117, 245-252.
- GODSE P.B. (1977) Studies on insect polyhedral viruses. Ph.D. Thesis, Univ. Agril. Sci., Bangalore, India.
- HATFIELD P.R., ENTWISTLE P.F. (1988) Biological and biochemical comparison of nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.*, 71, 1851-1855.
- HARRAP K.A., LONGWORTH J.F. (1974) An evaluation of purification methods for baculoviruses. *J. Invertebr. Pathol.*, 24, 55-62.
- HORIE Y., WATANABE H. (1980) Recent advances in sericulture. *Ann. Rev. Entomon.*, 25, 49-71.
- HUGHES P.R., GETTING R.R., McCARTHY W.J. (1983) Comparison of the time-mortality response of *Heliothis zea* to 14 isolates of *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.*, 41, 256-261.
- IATROU K., ITO K., WITKIEWICZ H. (1985) Polyhedrin gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virology*, 54, 436-445.
- KHOSAKA T., HIMENO M., ONODERA K. (1971) Separation and structure of components of nuclear polyhedrosis virus of the silkworm. *J. Virology*, 7, 263-273.
- KNELL D.C., SUMMERS M.D., SMITH G.E. (1983) Serological analysis of 17 baculoviruses from subgroups A and B using protein blot immunoassay. *J. Virology*, 125, 381-392.
- KOBAYASHI M., NAKAGAKI M. (1984) Effect of dissolution conditions of polyhedral inclusion bodies in sodium carbonate solution on the yield of nuclear polyhedrosis virus of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *J. Appl. Ent. Zool.*, 19, 280-287.
- KOZLOV E.A., ALEXEENKO I.P. (1967) Electron microscopic investigation of the structure of the nuclear polyhedrosis virus of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Invertebr. Pathol.*, 24, 196-200.
- LEE H.H., MILLER L.K. (1978) Isolation of genotypic variants of *AcMNPV*. *J. Virology*, 27, 754-767.
- MAEDA S. (1989b) Gene transfer vectors of a baculovirus *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and their use for expression of foreign genes in insect cells. *In Invertebrate Cell System And Applications*. Vol. 1, pp. 167-181. Ed. Mitsuhashi Boca Raton, CRC Press.
- MAEDA S., MAJIMA K. (1990) Molecular cloning and physical mapping of the genome of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.*, 71, 1851-1855.
- MARTIGNONI M.E., IWAJ P.J. (1981) A catalogue of the disease of insects, mites and ticks. *In Microbiol Control of Pest and Plant Diseases 1970-1980*. H.D.B. Academic Press, London, pp. 897-911.
- MATHAD S.B., HINCHIGERI S.B., SAVANURMATH C.J. (1991) Characterization of nuclear polyhedrosis virus of *Mythimna (Pseudaletia) separata*. *J. Biol. Control*, 5(1), 23-27.
- McINTOSH A.H., IGNOFFO C.M. (1983) Restriction endonuclease patterns of three baculoviruses isolated from species of *Heliothis*. *J. Invertebr. Pathol.*, 41, 27-32.
- MILLER L.K., DAWES K.P. (1978) Restriction endonuclease analysis to distinguish two closely related nuclear polyhedrosis viruses: *Autographica californica* MPNV and *Trichoplusia ni* MNPV. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 35, 1206-1210.
- MONROE J.E., McCARTHY W.J. (1984) Polypeptid analysis of genotypic variation of occluded *Heliothis* spp. baculoviruses. *J. Invertebr. Pathol.*, 43, 32-40.
- PAYNE C.C., TATCHELL G.M., WILLIAMS C.F. (1981) The comparative susceptibilities of *Pieris brassicae* and *P. rapae* to a granulosus virus from *P. brassicae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 38, 273-280.
- PIASECKA S.H., PAYNE G.C. (1975) Studies of a nuclear polyhedrosis virus from *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). *Bull. Acad. Pol. Sci. Biol.*, 23, 371-373.
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SAMSON M.V., BAIG M., SHARMA S.D., BALAVENKATASUBBAIAH M., SASIDHARAN T.O., JOLLY M.S. (1990) Survey on relative incidence of silkworm diseases in Karnataka, India. *Indian J. Seric.*, 29(2), 248-254.

- SATISH G., GOVINDAN R. (1987) Electron microscopy of nuclear polyhedrosis virus of silkworm *Bombyx mori*. Indian J. Seric., 26(2), 101-103.
- SAVANURMATH C.J., BASAVARAJAPPA S., HINCHIGERI S.B., INGALHALLI S.S., SINGH K.K., SANAKAL R.D. (1994) Relative incidence of the silkworm viral diseases in agroclimatic zones of northern Karnataka, India. Bull. Sericult. Res., 5, 51-55.
- SMITH K.M. (1976) Virus-Insect Relationships. Longman Group Limited, London, pp. 3-12.
- SMITH G.E., SUMMERS M.D. (1978) Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases. J. Virology, 89, 517-527.
- SMITH G.E., SUMMERS M.D. (1979) Restriction maps of five *Autographa californica* MNPV variants, *Trichoplusia ni* MNPV and *Galleria mellonella* MNPV DNAs with endonucleases Sma I, Kmp I, Bam HI, Sac I, Xho I and Eco RI. J. Gen. Virol., 30, 828-838.
- SMITH G.E., SUMMERS M.D. (1981) Application of a novel radio-immunoassay to identify baculovirus structural proteins that share interspecies antigenic determinants. J. Virology, 39, 125-137.
- SOMASEKAR S. (1992) Characterization of some baculoviruses. M.Sc. (Biotechnology) dissertation submitted to TNAU, Coimbatore, India
- SUMMERS M.D., PASCHKE J.E. (1970) Alkali-liberated granulosis virus of *Trichoplusia ni*. I. Density gradient purification and some of their *in vitro* chemical and physical properties. J. Invertebr. Pathol., 16, 227-240.
- SUMMERS M.D., SMITH G.E. (1978) Baculovirus structural polypeptides. J. Virology, 84, 390-402.

CARACTERISATION D'UN ISOLAT GEOGRAPHIQUE DU VIRUS DE LA POLYEDROSE NUCLEAIRE DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* (L.)

K.K. SINGH¹, S.S. INGALHALLI¹, R.D. SANAKAL¹, S.B. HINCHIGERI²,
S. BASAVARAJAPPA¹ & C.J. SAVANURMATH^{1*}

1. Department of Sericulture, 2. Department of Biochemistry, Karnatak University,
Dharwad - 580 003, Karnataka, Inde.

*L'étude au microscope électronique à balayage d'un isolat géographique du virus de la polyédrose nucléaire du ver à soie **Bombyx mori** (BmNPV-N) fait apparaître une variation de la taille (de 2,0 à 2,5 µm) et de la forme (d'hexaocédrique à octodécacédrique) des polyèdres ; la taille des virions est d'environ 300 × 45 nm avec la membrane. Les profils de restriction et les tailles des fragments obtenus par action des endonucléases suggèrent qu'il s'agit d'un variant génomique du BmNPV infestant le ver à soie.*

INTRODUCTION

Les virus de la polyédrose nucléaire (NPV) ont été isolés chez plus de 250 espèces appartenant à sept ordres différents (Martignoni et Iwai, 1981). Le virus de la polyédrose nucléaire de *Bombyx mori* (BmNPV) se caractérise par des virions enveloppés en forme de bâtonnets contenant un ADN circulaire bicaténaire (Maeda et Majima, 1990). Le BmNPV est un agent pathogène majeur du ver à soie *Bombyx mori* et occasionne des dommages importants en sériciculture (Horie et Watanabe, 1980 ; Samson et coll., 1990 ; Savanurmah et coll., 1994). L'Inde est le deuxième producteur mondial de soie et l'Etat du Karnataka contribue à lui seul à 80 % de la production de soie mûrier (Anonyme, 1991). Cependant, les fermiers de cette région connaissent des difficultés en raison de l'incidence de la grasserie causée par le BmNPV, en particulier en été (Savanurmah et coll., 1994). Pour faciliter l'étude de la pathogénie relative de cet isolat, il est nécessaire de caractériser le BmNPV-N ; ce qui fait l'objet des expériences décrites ici.

Les corps d'inclusion polyédriques (PIB) et les virions du BmNPV présentent des formes et des tailles différentes suivant les isolats géographiques (Aizawa, 1955 ; Kozlov et Alexeenko, 1967 ; Khosaka et coll., 1971 ; Piasecka et Payne, 1975 ; Smith, 1976 ; Godse, 1977 ; Satish et Govindan, 1987 ; Chishti et Schof, 1991 ; Somasekar, 1992). Des études approfondies ont permis de mettre en évidence la variation génotypique des isolats prélevés sur le terrain de nombreux types de baculovirus (Lee et Miller, 1978 ; Smith et Summers, 1981 ; Getting et McCarthy, 1982 ; Crook et coll., 1985). La comparaison de ces virus et de leurs souches par analyse des ADN à l'aide d'endonucléases de restriction spécifiques a fait apparaître une hétérogénéité. Cette diversité génomique des isolats se reflète partiellement dans l'expression phénotypique comme la morphologie des virions (Kozlov et Alexeenko, 1967 ; Khosaka et coll., 1971 ; Piasecka et Payne, 1975 ; Ackermann et Smirnov, 1983 ; Satish et Govindan, 1987), la composition des polypeptides structuraux (Summers et Smith, 1978 ; Monroe et McCarthy, 1984), la spécificité sérologique (Smith et Summers, 1981 ; Knell et coll., 1983) et forme la base des variations de leurs propriétés biologiques. Iatrou et coll. (1985) ont décrit le profil de restriction et Maeda et Majima (1990) ont évalué la taille de l'ADN d'un isolat japonais du BmNPV. Cependant, ce type d'études n'a pas été réalisé pour les isolats indiens, en particulier pour ce qui concerne l'Etat du Karnataka, qui est au premier plan pour ce qui concerne les activités séricoles.

MATERIELS ET METHODES

L'isolat de *BmNPV*-N a été prélevé, par incision des fausses pattes, dans l'hémolymphe de vers à soie infestés naturellement dans le nord du Karnataka. L'hémolymphe a été filtrée à travers quatre couches de gaze et les polyèdres ont été sédimentés par centrifugation à 5 000 g pendant 10 minutes à 4 °C. Après des lavages répétés à l'eau puis avec 1 M NaCl, les polyèdres ont été suspendus dans l'eau, étalés sur un coussin contenant du saccharose à 40 % (p/p) et centrifugés à 100 000 g pendant 30 minutes à 4 °C dans un rotor Hitachi RPS 28 SA (Kobayashi et Nakagaki, 1984). Le culot a été lavé dans de l'eau bi-distillée, centrifugé à 5 000 g et resuspendu dans un petit volume d'eau distillée (équivalent à 0,5 ml par insecte). A ce stade, les polyèdres étant suffisamment purs pour la plupart des expériences, ils ont été stockés à 4 °C. Pour la conservation à long terme, les polyèdres ont été lyophilisés et stockés à 4 °C. Une goutte de 10 µl de suspension de polyèdres purs a été déposée sur une lame, étalée avec une lamelle couvre-objet et la pureté a été examinée au microscope.

Les virions issus des polyèdres ont été obtenus par solubilisation des corps d'occlusion dans une solution alcaline. Les polyèdres lyophilisés (10 mg) ont été dissous dans 1 ml de tampon de dissolution (0,1 M Na₂CO₃ et 0,05 M NaCl) ou environ 10¹⁰ polyèdres (plusieurs centaines de µl en volume concentré) ont été sédimentés et suspendus dans 4 ml de tampon de dissolution. Après incubation à 30 °C pendant 1 heure, la solution, de couleur opale claire, a été centrifugée à 5 000 g pendant 5 minutes à température ambiante pour sédimenter les polyèdres non dissous et le surnageant a été étalé sur un coussin de saccharose à 25 % contenant 5 mM NaCl et 10 mM EDTA. Les virions issus des polyèdres ont été sédimentés par ultracentrifugation à 100.000 g (soit 27 K dans un rotor Beckman SW 28) pendant 1 heure à 5 °C. Le culot de virion a été resuspendu dans un tampon Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, pH 7,8, 1 mM EDTA) et stocké à 4 °C. La préparation purifiée a été utilisée pour les observations au microscope électronique à balayage.

L'enveloppe virale du NPV peut être ôtée par traitement chimique avec le détergent Nonidet P40 (NP40) (Harrap et Longworth, 1974). Les nucléocapsides ont été préparées de la manière habituelle en incubant les particules virales à 500 µg/ml dans du NP 40 à 1 % dans 0,05 M chlorhydrate Tris (hydroxyméthyl) aminométhane, pH 7,4, et 0,3 M NaCl (tampon Tris) pendant 30 minutes à 30 °C. Les nucléocapsides ont été séparées des composants de l'enveloppe par centrifugation à 45 000 g pendant 45 minutes sur gradient de saccharose à 10-50 % (p/v) dans un tampon Tris.

Pour l'observation de la taille et de la forme des polyèdres et des virions, les échantillons ont été colorés avec de l'acide phosphotungstique à 2 % neutre, séchés à l'air sur une grille en cuivre enrobée de collodion et observés à différents agrandissements (Summers et Paschke, 1970). L'ADN viral a été extrait des virions après traitement à la protéinase K (Merck) en présence de SDS à 1 % (Maeda, 1989b). La concentration d'ADN a été déterminée avec un spectrophotomètre à UV. La pureté de l'ADN non digéré a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,7 %. L'ADN a été caractérisé d'après la méthode de Sambrook et coll. (1989). L'ADN a été digéré avec les endonucléases Hind III et Eco RI (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Etats-Unis) dans les conditions spécifiées par le fabricant. Les fragments obtenus ont été séparés sur gel d'agarose à 0,7 % en utilisant un ADN de phage lambda (λ) comme marqueur de taille. La migration relative des bandes a été mesurée à l'aide du programme informatique Sequaid II.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les PIB présentent des tailles et des formes différentes et peuvent varier d'un insecte à l'autre ou chez un même insecte (Smith, 1976). La forme des polyèdres du *BmNPV*-N varie d'hexaoctédrique à octodécédrique (Fig. 1 et 2). Les tailles se situent entre 2,0 et 2,5 µm. Aizawa (1955) a observé une forme tétragonale et des tailles variant de 3 à 5 µm. Godsc (1977) a évalué la taille moyenne des polyèdres à 2,03 µm. Satish et Govindan (1987) ont observé des formes hexagonales ou parfois octogonales et des tailles variant de 1,64 à 2,11 µm chez des isolats de *BmNPV* du sud du Karnataka. Chishti et Schof (1991) ont observé des formes tétragonales et hexagonales chez des isolats de *BmNPV* du Jammu-et-Cachemire. De même, Somasekar (1992) a observé une forme hexagonale et des tailles variant de 2,8 à 4,60 µm chez des *BmNPV* de l'Etat du Tamil Nadu.

On connaît peu de choses sur la forme et la taille des virions des isolats indiens du *BmNPV*. Cependant, cette étude montre que les virions ont des formes de bâtonnets mesurant 300×45 nm avec une membrane (Fig. 3). On observe également un cylindre mesurant 400×18 nm et comportant une enveloppe et une nucléocapside (Fig. 4). La nucléocapside du virion, qui est tassée de manière compacte à l'intérieur de l'enveloppe externe, s'allonge lorsqu'on la libère. Des résultats similaires ont été obtenus par Khosaka et coll. (1971) qui ont observé que le virion mesurait 330×80 nm avec la membrane et 360×60 nm sans la membrane. Cependant, il conviendrait d'approfondir les résultats obtenus ici. Kozlov et Alexeenko (1967) ont observé que le virion mesurait 400×90 nm. D'après Piasecka et Payne (1975), la taille du virion est de 280×75 nm tandis que, d'après Satish et Govindan (1987), le virion enveloppé (virion avec une membrane de développement externe) mesure 247×96 nm tandis que le noyau interne mesure 215×55 nm lorsqu'il est intact.

Des études antérieures ont démontré que la pathogénicité des isolats de baculovirus issus de populations distinctes d'un hôte donné ou d'espèces hôtes étroitement apparentées peut varier fortement en fonction de l'hôte (Payne, 1981 ; Hughes et coll., 1983) ; ceci pourrait être dû à des variations phénotypiques (Hatfield et Entwistle, 1988 ; Mathad et coll., 1991).

L'analyse par endonucléases de restriction d'un certain nombre de baculovirus provenant de différentes zones géographiques montre que chaque isolat possède un ensemble unique de fragments d'ADN, ce qui suggère une variation de l'ADN génomique. L'analyse de l'ADN viral par cette méthode peut donc permettre d'identifier et de classer les baculovirus (Miller et Dawes, 1978 ; Smith et Summers, 1978, 1979 ; McIntosh et Ignoffo, 1983 ; Crook et coll., 1985). Iatrou et coll. (1985) ont été les premiers à étudier le profil de l'ADN du *BmNPV* après traitement par endonucléases de restriction chez un isolat japonais. Dans cette étude, la digestion par Hind III et Eco RI de l'ADN du *BmNPV*-N a permis de mettre en évidence 19 et 14 fragments, respectivement (Fig. 5, Tableau I). Les génomes mesurent respectivement 117,50 et 117,85 kpb au total (soit approximativement 118 kpb). Somasekar (1992) a observé seulement 9 à 14 fragments mesurant entre 109,09 et 139,62 pour les quatre isolats du Tamil Nadu, après analyse par l'endonucléase de restriction Hind III, tandis que Maeda et Majima (1990) ont observé 18 bandes pour chacune de ces enzymes et estimé la taille à 130 kpb pour un isolat du Japon. Par comparaison, l'isolat de *BmNPV*-N semble avoir un génome de plus petite taille que certains des isolats du Tamil Nadu et du Japon et certainement de plus grande taille que certains des autres isolats du Tamil Nadu. Les résultats obtenus pour la caractérisation morphologique et génétique du *BmNPV* nous permettent donc de conclure que l'isolat du nord du Karnataka est un isolat géographique distinct.

GROWTH AND PHOTOSYNTHESIS OF MULBERRY UNDER ULTRAVIOLET-B-ENHANCED SOLAR IRRADIANCES

A. PREMKUMAR, N. NEDUNCHEZHIAN & G. KULANDAIVELU

School of Biological Sciences, Madurai Kamaraj University, Madurai 625 021, India.

Mulberry (Morus alba L.) plants grown under two levels of ultraviolet-B (UV-B)-enhanced solar irradiances after 100 days of growth exhibited a large increase in leaf biomass and photosynthetic pigment levels. Soluble leaf protein and flavonoid contents were not affected, while the level of anthocyanin was marginally raised in $11.1 \text{ kJm}^{-2} \text{ d}^{-1}$ UV-B, but markedly reduced in $14.4 \text{ kJm}^{-2} \text{ d}^{-1}$ UV-B. The partial electron transport activities displayed a depressed rate. Variable fluorescence yield, a physiological indicator of quantum yield of photosynthetic light reaction, was also diminished by enhanced UV-B. Our field study clearly suggests that, although enhanced UV-B radiation did not affect leaf growth, significant reduction occurred in photosynthetic performance.

Keywords: Enhanced UV-B radiation, photosystems I and II, mulberry, fluorescence.

INTRODUCTION

Increase in solar ultraviolet radiation especially in the ultraviolet-B (UV-B, 280-320 nm) region due to gradual depletion of earth's protective stratospheric ozone layer has been found to be effective in producing detrimental photobiological consequences over plant growth and photosynthesis of several crops (Bormann, 1989; Lingakumar and Kulandaivelu, 1993; Predieri *et al.*, 1993). Most of the information regarding the potential effectiveness of enhanced UV-B radiation comes from field studies conducted using the temperate crops, while limited information is available about the field responses of tropical crops. Among the tropical plants, *Morus alba* is an important one as it is the chief food for silkworm rearing. Moreover, distinctive Indian geographical features provide a very good, favourable climate throughout the year for luxuriant growth of mulberry. Since production of mulberry leaves for silkworm rearing plays a vital role in Indian economy, the present study is aimed at investigating the growth and photosynthetic responses of mulberry to two levels of UV-B-enhanced solar regimes.

MATERIALS AND METHODS

Plant growth:

Cuttings of mulberry (*Morus alba* L.) were planted in natural field conditions in the University botanical garden and grown during the period February to May 1994. The average day and night temperatures were $32 \pm 4^\circ \text{C}$ and $26 \pm 3^\circ \text{C}$, respectively. Plants were watered regularly and kept free from nutrient and pest attack.

UV-B supplementation:

Enhanced UV-B was artificially provided by Philips sun lamps (type TL12/20 W, Philips Gloelampenfabriken, The Netherlands) through a UV-B modulation system which adds supplemental UV-B radiation to the natural solar radiation. Thus cuttings grown beneath the lamps received a daily dose of 11.1 and 14.4 kJm^{-2} , which are equivalent to the doses respectively after 10 and 40% ozone reduction at Madurai (10°N). These two levels of O_3 depletion simulation and daily UV-B doses were computed according to the empirical model of Green *et al.* (1980). Cuttings were exposed to

enhanced UV-B radiation only between 9 a.m. and 3 p.m., centred around solar noon, for a total period of 100 days. Control seedlings were grown under normal solar radiation whose daily ambient solar UV-B level was 10.0 kJ m^{-2} . After 100 days of growth under enhanced UV-B radiation, leaves were harvested for various analyses.

Biochemical analyses:

The levels of leaf photosynthetic pigments (Wellburn and Lichtenthaler, 1984), flavonoids (Mirecki and Teramura, 1984), anthocyanins (Mancinelli *et al.*, 1975) and total soluble leaf proteins (Lowry *et al.*, 1951) were quantified immediately after harvest.

Measurement of electron transport:

The methods of chloroplast isolation and analysis of photosynthetic partial reactions mediated by photosystem II (PSII) and photosystem I (PSI) were adopted as described previously (Noorudeen and Kulandaivelu, 1982).

Fluorescence measurement:

The variable part of Chl *a* fluorescence of dark-adapted leaves (10 min. at 28°C) was analysed in intact leaves after excitation with broad band blue light (100 W m^{-2} , 400-460 nm, Corning 5113). The fluorescent signal was measured at $680 \pm 5 \text{ nm}$ by a photomultiplier and stored in a digital oscilloscope (Iwatsu SS-5802) and later transferred to a Hitachi (056) recorder.

RESULTS AND DISCUSSION

Mulberry plants grown under two levels of enhanced UV-B solar irradiances for 100 days showed a significant increase in leaf biomass (Fig. 1). UV-B induced increase in leaf biomass was previously reported by some workers (Biggs and Kossuth, 1978; Teramura, 1983). Such an increase in growth was paralleled by the increase in photosynthetic pigments (Fig. 2). This inductive influence of UV-B radiation under field conditions is in agreement with Esser (1980) who found an increase in chlorophyll contents of spinach leaves developed under high UV-B radiation. In comparison, carotenoids showed a greater degree of induction than chlorophylls and this indicates a disproportionate impact of UV-B on pigment synthesis. No significant increase in the levels of flavonoids was observed. However, simulation of 10% ozone reduction condition induced the anthocyanin level by 28% and a significant reduction occurred under doses equivalent to 40% ozone depletion (Fig. 3). These results indicate that the accumulation of UV-B-attenuating components (chiefly flavonoids) depends on UV-B fluence rates (Tevini *et al.*, 1991).

Fig. 1: Changes in the leaf biomass of mulberry grown under two different levels of enhanced UV-B solar regimes.

Leaf samples were collected after 100 days of plant growth under control and UV-enhanced solar radiation. Mean $\pm$ standard error, $n = 15$. For other details see Materials and Methods. FW: Fresh weight. DW: Dry weight.

Fig. 1 : Variations de la masse foliaire de mûriers exposés à deux régimes solaires différents enrichis en UVB.

Les échantillons de feuilles ont été prélevés après 100 jours de croissance chez les témoins et les lots exposés à un rayonnement solaire enrichi en UVB. Moyenne $\pm$ écart type, $n = 15$. Pour de plus amples détails, se reporter aux Matériels et Méthodes. FW: Poids frais. DW: Poids sec.

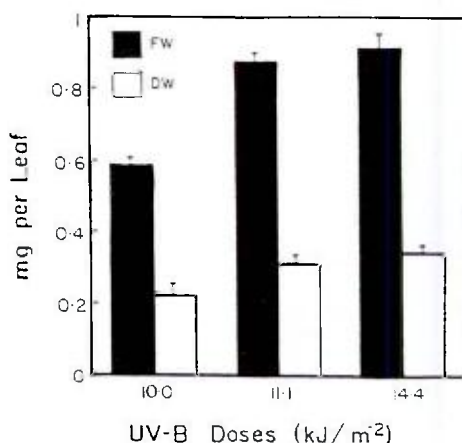


Fig. 2: Changes in the photosynthetic pigment contents of mulberry grown under two different levels of enhanced UV-B regimes.

Mean $\pm$ standard error, $n = 5$. Details of growth conditions as in Fig. 1.

■ Chl *a*, □ Chl *b*, ▨ Total Chl, ▩ Carotene, FW: Fresh weight.

Fig. 2 : Variations des teneurs en pigments photosynthétiques de mûriers exposés à deux régimes solaires différents enrichis en UVB.

Moyenne $\pm$ écart type, $n = 5$. Les conditions de croissance sont décrites dans la figure 1.

■ Chl *a*, □ Chl *b*, ▨ Chl totale, ▩ Carotène, FW: Poids frais.

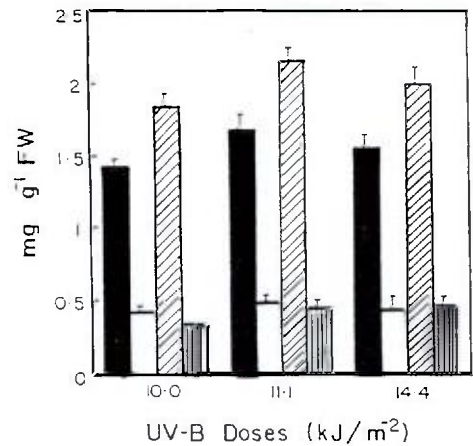


Fig. 3: Changes in the non-photosynthetic pigment levels of mulberry grown under two different levels of enhanced UV-B regimes.

Mean $\pm$ standard error, $n = 5$. Other details are as in Fig. 1.

■ Flavonoids, □ Anthocyanins, FW: Fresh weight.

Fig. 3 : Variations des teneurs en pigments non photosynthétiques de mûriers exposés à deux régimes solaires différents enrichis en UVB.

Moyenne $\pm$ écart type, $n = 5$. Les autres éléments sont identiques à ceux décrits dans la figure 1.

■ Flavonoïdes, □ Anthocyanes, FW: Poids frais.

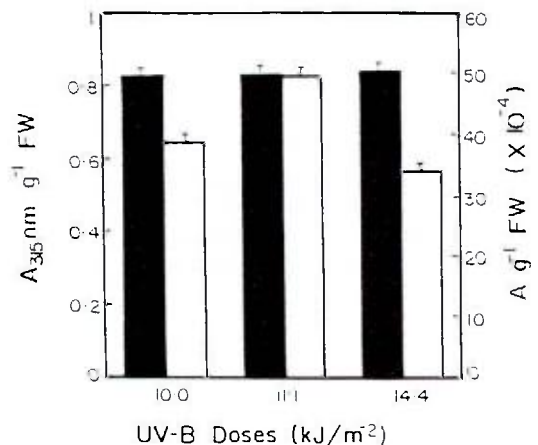


Figure 4 shows the changes in soluble leaf protein levels in the control and under different UV-B levels. Under both UV-B radiation levels the protein level remained marginally higher over the control, indicating that enhanced UV-B radiation has no inhibitory role on protein biosynthesis in mulberry leaves. In contrast to this, the photosynthetic light reactions showed a significant decrease when expressed on a unit chlorophyll basis (Fig. 5). The PSII-mediated electron transfer from water to benzoquinone (BQ) and PSI-mediated methyl viologen (MV) reduction were inhibited by enhanced UV-B treatments. Reduction in photochemical activities by enhanced UV-B radiation without affecting the chlorophyll content was already reported by Takeuchi *et al.* (1989). The inability of mulberry leaves under enhanced UV-B radiation to synthesise more UV-B filtering pigments appears to correspond to higher UV-B transmittance. Therefore, the photosynthetic apparatus was maximally impacted by large absorption of UV-B and exhibited a diminished photosynthetic performance (Tevini *et al.*, 1991).

Loss of photosynthetic activity under enhanced UV-B radiation is also evidenced by the fast Chl *a* fluorescence induction kinetics of mulberry leaves. With the increase in the UV-B level a progressive reduction in variable fluorescence level (*F_v*) was observed (Fig. 6). A similar observation was also made by Tevini and Iwanzik (1983). The reduction in the variable fluorescence (*F_v*) indicates possible inhibition of energy transfer within the PSII reaction centre (Kulandaivelu and Noorudeen, 1983).

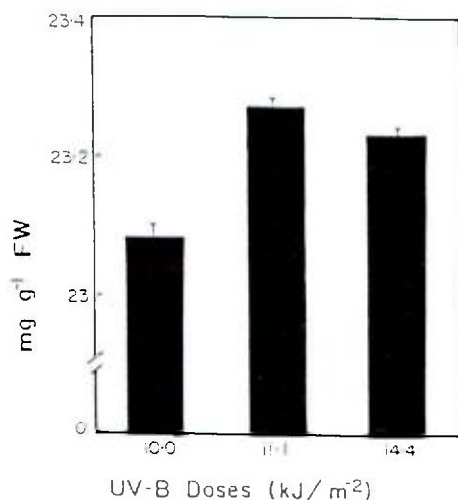


Fig. 4: Effect of different levels of UV-B-enhanced solar irradiance on the total leaf soluble protein content of mulberry.

Mean $\pm$ standard error, $n = 5$. For other details, see Materials and Methods. FW: Fresh weight.

Fig. 4 : Effet de différentes doses de rayonnement solaire enrichi en UVB sur la teneur en protéines solubles totales des feuilles de mûrier.

Moyenne $\pm$ écart type, $n = 5$. Pour les autres éléments, se reporter aux Matériels et Méthodes. FW: Poids frais.

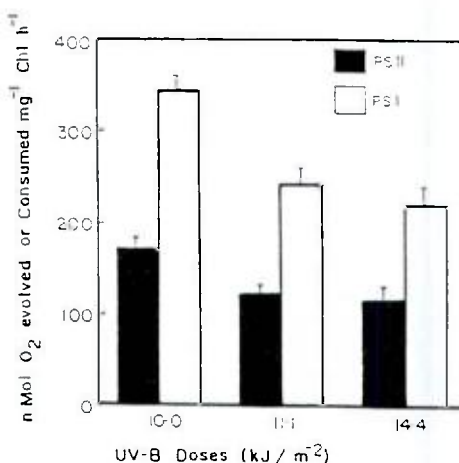


Fig. 5: Changes in the photochemical activities of chloroplasts isolated from mulberry leaves grown under two different levels of enhanced UV-B regimes.

Mean $\pm$ standard error, $n = 5$. Other details are as in Materials and Methods.

Fig. 5 : Variations des activités photochimiques des chloroplastes isolés à partir de feuilles de mûriers exposés à deux régimes solaires différents enrichis en UVB.

Moyenne $\pm$ écart type, $n = 5$. Les autres éléments sont décrits dans les Matériels et Méthodes.

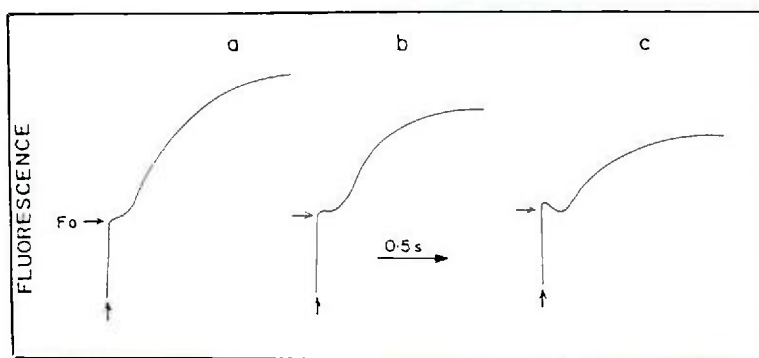


Fig. 6: Changes in fast fluorescence kinetics of pre-darkened leaves of mulberry grown under two different levels of enhanced UV-B regimes.

Growth and measurement conditions are as in Materials and Methods.

a. control (10 kJm⁻²); b and c. enhanced UV-B regimes (11.1 and 14.4 kJm⁻², respectively).

Fig. 6 : Variations de la cinétique de fluorescence rapide des feuilles préalablement stockées à l'obscurité issues de mûriers exposés à deux régimes solaires différents enrichis en UVB.

Les conditions de croissance et de mesure sont décrites dans les Matériels et Méthodes.

a : témoin (10 kJm⁻²) ; b : régime UVB à 11.1 kJm⁻² ; c : régime UVB à 14.4 kJm⁻².

CONCLUSIONS

The observations reported here point out that mulberry plants exhibited a pronounced sensitivity to even low levels of increased solar UV-B environments at tropical latitudes. The negative correlation between vegetative growth and photosynthesis is presently not known and requires further work on the analysis of the thylakoid pigment-protein components.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors AP and NN thank the Council of Scientific and Industrial Research for their Senior Research Fellowship and Research Associateship, respectively.

REFERENCES

- BIGGS R.H., KOSSUTH S.V. (1978) Effects of ultraviolet-B radiation enhancement under field conditions on potatoes, tomatoes, corn, rice, southern peas, peanuts, squash, mustard and radish. *In* UV-B Biological and Climatic Effects Research (BACER). Final Report, US EPA, Washington, D.C.
- BORNMAN J.F. (1989) Target sites of UV-B radiation in photosynthesis of higher plants. *J. Photochem. Photobiol., B, Biology*, 4, 145-158.
- ESSER G. (1980) Einfluss einer nach Schadstoffimmission vermehrten Einstrahlung von UV-B Light auf Kulturpflanzen. 2. Versuchjahr, Bericht Battelle Institut E.V. Frankfurt, BF-R-63, 984-1.
- GREEN A.E.S., CROSS K.R., SMITH L.A. (1980) Improved analytical characterization of ultraviolet skylight. *Photochem. Photobiol.*, 31, 59-65.
- KULANDAIVELU G., NOORUDEEN A.M. (1983) Comparative study of the action of ultraviolet-C and ultraviolet-B radiation on photosynthetic electron transport. *Physiol. Plant.*, 58, 389-394.
- LINGAKUMAR K., KULANDAIVELU G. (1993) Changes induced by ultraviolet-B radiation in vegetative growth, foliar characteristics and photosynthetic activities in *Vigna unguiculata*. *Aust. J. Plant Physiol.*, 20, 299-308.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- MANCINELLI A.L., YANG C.P., LINQUIST P., ANDERSON O.R., RABINO J. (1975) Photocontrol of anthocyanin synthesis. III. The action of streptomycin on the synthesis of chlorophyll and anthocyanin. *Plant Physiol.*, 55, 251-257.
- MIRECKI R.M., TERAMURA A.H. (1984) Effects of ultraviolet-B irradiance on soybean. V. The dependence of plant sensitivity on the photosynthetic photon flux density during and after leaf expansion. *Plant Physiol.*, 74, 475-480.
- NOORUDEEN A.M., KULANDAIVELU G. (1982) On the possible site of inhibition of photosynthetic electron transport by ultraviolet-B (UV-B) radiation. *Physiol. Plant.*, 55, 161-166.
- PREDIERI S., KRIZEK D.T., WANG C.Y., MIRECKI R.M., ZIMMERMAN R.H. (1993) Influence of UV-B radiation on developmental changes, ethylene, CO₂ flux and polyamines in CV Doyenne d'Hiver pear shoots grown *in vitro*. *Physiol. Plant.*, 87, 109-117.
- TAKEUCHI Y., AKIZUKI M., SIMIZU H., KONDO N., SUGAHARA K. (1989) Effect of UV-B (290-320 nm) irradiation on growth and metabolism of cucumber seedlings. *Physiol. Plant.*, 76, 425-430.
- TERAMURA A.H. (1983) Effects of ultraviolet-B radiation on the growth and yield of crop plants. *Physiol. Plant.*, 58, 415-427.
- TEVINI M., IWANZIK W. (1983) Inhibition of photosynthetic activity by UV-B radiation in radish seedlings. *Physiol. Plant.*, 58, 395-400.
- TEVINI M., BRAUN J., FIESER G. (1991) The protective function of the epidermal layer of rye seedlings against ultraviolet-B radiation. *Photochem. Photobiol.*, 53, 329-333.
- WELLBURN A.R., LICHTENTHALER H. (1984) Formulae and program to determine total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *In* Advances in Photosynthesis Research. Vol. II, Ed. C. Sybesma, Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Pub., The Hague/Boston/Cancerter, pp. 9-12.

CROISSANCE ET PHOTOSYNTHESE DU MURIER EXPOSE A UN RAYONNEMENT SOLAIRE ENRICHI EN ULTRAVIOLETS B

A. PREMKUMAR, N. NEDUNCHEZHIAN & G. KULANDAIVELU

School of Biological Sciences, Madurai Kamaraj University, Madurai 625 021, Inde.

*Les plants de mûrier (*Morus alba* L.) exposés à deux régimes de rayonnements solaires enrichis en ultraviolets B (UV B) présentent une augmentation importante de la biomasse foliaire et du pigment photosynthétique après 100 jours de croissance. Les teneurs en protéines solubles et en flavonoïdes ne sont pas affectées tandis que le niveau d'anthocyanes augmente légèrement après exposition à $11,1 \text{ kJ m}^{-2} \text{ j}^{-1}$ UV B mais diminue de manière sensible après exposition à $14,4 \text{ kJ m}^{-2} \text{ j}^{-1}$ UV B. Les activités partielles de transport des électrons diminuent. Le rendement en fluorescence variable, indice physiologique du rendement quantique de la réaction photosynthétique à la lumière, diminue également après exposition aux UV B. Notre étude sur le terrain suggère que, bien que l'exposition à un rayonnement enrichi en UV B n'a pas d'effet négatif sur la croissance des feuilles, on observe une réduction significative de l'activité photosynthétique.*

INTRODUCTION

L'augmentation des rayonnements solaires ultraviolets, en particulier dans la région des ultraviolets B (UV B, 280 à 320 nm), due à la diminution progressive de la couche d'ozone protectrice dans la stratosphère de la terre a des conséquences photobiologiques préjudiciables sur la croissance et la photosynthèse des végétaux pour de nombreuses cultures (Bornman, 1989 ; Lingakumar et Kulandaivelu, 1993 ; Predieri et coll., 1993). Les informations concernant l'efficacité potentielle de l'exposition aux UV B proviennent, pour la majeure partie, d'études sur le terrain réalisées sur des cultures tempérées et on dispose de peu de renseignements sur les réactions des cultures tropicales. *Morus alba* est l'une des cultures tropicales importantes car c'est la principale nourriture du ver à soie. De plus, les caractéristiques géographiques spécifiques de l'Inde forment un climat propice à la croissance de mûriers luxuriants tout au long de l'année. La production de feuilles de mûrier destinées à l'élevage du ver à soie jouant un rôle vital dans l'économie indienne, cette étude a pour objet d'étudier les réactions du mûrier exposé à deux régimes solaires enrichis en UV B pour ce qui concerne la croissance et la photosynthèse.

MATERIELS ET METHODES

Croissance des plants :

Des boutures de mûrier (*Morus alba* L.) ont été plantées en milieu naturel au jardin botanique de l'Université et cultivées de février à mai 1994. Les températures diurnes et nocturnes moyennes étaient respectivement de $32 \pm 4^\circ \text{C}$ et $26 \pm 3^\circ \text{C}$. Les plants ont été arrosés régulièrement et maintenus à l'abri des parasites et des éléments nutritifs.

Exposition aux UV B :

Des rayons enrichis en UV B ont été appliqués artificiellement à l'aide de lampes à ultraviolets Philips (type TL12/20 W, Philips Gloelampenfabriken, Pays-Bas) par un système de modulation des UV B ajoutant des rayons UV B aux rayons solaires naturels. Les boutures cultivées sous les lampes ont ainsi reçu des doses journalières de 11,1 et 14,4 kJ m^{-2} , doses équivalentes à des réductions de

10 et 40 % de la couche d'ozone à Madurai (10° N). Ces deux niveaux de simulation de la diminution d'O₃ et de doses journalières d'UV B ont été évalués selon le modèle empirique de Green et coll. (1980). Les boutures ont été exposées à un rayonnement enrichi en UV B uniquement de 9h00 à 15h00, période centrée sur midi heure solaire, pendant 100 jours. Des plantules témoins ont été cultivées sous rayonnement solaire normal, soit un niveau d'UV B journalier de 10,0 kJm⁻². Après 100 jours de croissance sous UV B enrichis, les feuilles ont été récoltées et soumises à plusieurs analyses.

Analyses biochimiques :

Les teneurs en pigments photosynthétiques des feuilles (Wellburn et Lichtenthaler, 1984), en flavonoïdes (Mirecki et Teramura, 1984), en anthocyanes (Mancinelli et coll., 1975) et en protéines solubles totales (Lowry et coll., 1951) ont été mesurées immédiatement après la récolte.

Mesure du transport des électrons :

Pour l'isolement des chloroplastes et l'analyse des réactions partielles de la photosynthèse modulées par le photosystème II (PSII) et le photosystème I (PSI), on a adopté les méthodes décrites précédemment (Noorudeen et Kulandaivelu, 1982).

Mesure de la fluorescence :

La partie variable de la fluorescence de la Chl *a* des feuilles adaptées à l'obscurité (10 minutes à 28 °C) a été analysée sur des feuilles intactes après excitation sous lumière bleue à large bande (100 Wm⁻², 400 à 460 nm, Corning 5113). Le signal de fluorescence a été mesuré à 680 ± 5 nm à l'aide d'un photomultiplicateur et stocké dans un oscilloscope digital (Iwatsu) : il a ensuite été transféré sur un enregistreur Hitachi (056).

RESULTATS ET DISCUSSION

Les plants de mûrier exposés à deux régimes de rayonnement solaire enrichi en UV B pendant 100 jours présentent une augmentation significative de leur masse foliaire (Fig. 1). Une augmentation de la masse foliaire induite par les UV B a déjà été observée par certains chercheurs (Biggs et Kossuth, 1978 ; Teramura, 1983). Cette augmentation de la croissance s'accompagne d'une augmentation des pigments photosynthétiques (Fig. 2). L'influence inductive des rayons UV B en milieu naturel observée ici est conforme avec les résultats d'Esser (1980) qui a observé une augmentation des teneurs en chlorophylle des feuilles d'épinard cultivées sous rayons UV B intenses. Par comparaison, les caroténoïdes présentent un degré d'induction plus élevé que les chlorophylles : ce qui indique que les UV B ont un impact disproportionné sur la synthèse des pigments. On n'a observé aucune augmentation significative des teneurs en flavonoïdes. Cependant, une simulation de réduction de 10 % de la couche d'ozone induit un niveau d'anthocyanes de 28 % et on observe une diminution significative avec des doses équivalentes à 40 % de réduction de la couche d'ozone (Fig. 3). Ces résultats indiquent que l'accumulation de composants atténuant les UV B (principalement les flavonoïdes) dépend du taux de flux des UV B (Tevini et coll., 1991).

La figure 4 représente les variations des teneurs en protéines solubles chez le témoin et chez les lots soumis aux différents régimes d'UV B. Chez les lots exposés aux deux régimes d'UV B, la teneur en protéines reste légèrement supérieure à celle du témoin, ce qui indique que l'exposition aux UV B renforcés n'a pas d'effet inhibiteur sur la biosynthèse des protéines dans les feuilles de mûrier. En revanche, les réactions à la lumière de la photosynthèse, exprimées sur la base de la chlorophylle, diminuent de manière significative (Fig. 5). Le transfert des électrons modulé par le PSII de l'eau à la benzoquinone (BQ) et la réduction du méthyl viologène (MV) modulée par le PSI sont inhibés par les traitements aux UV B renforcés. Takeuchi et coll. (1989) ont déjà observé que les activités photochimiques diminuaient après exposition aux UV B renforcés sans que cela affecte la teneur en chlorophylle. L'incapacité des feuilles de mûriers exposées aux UV B renforcés à synthétiser les pigments filtrant les UV B semble correspondre à une augmentation de la transmission des UV B. L'appareil photosynthétique est donc fortement affecté par des absorptions importantes d'UV B et présente une diminution d'activité.

La réduction des activités photosynthétiques après exposition aux UV B renforcés est également démontrée par la cinétique rapide d'induction de la fluorescence de la Chl *a* dans les feuilles de mûrier. Lorsque la quantité d'UV B augmente, on observe une diminution progressive du niveau de fluorescence variable (Fig. 6). Tevini et Iwanzik (1983) ont obtenu des résultats similaires. La diminution de la fluorescence variable indique une inhibition possible du transfert de l'énergie au centre de la réaction PSII (Kulandaivelu et Noorudeen, 1983).

CONCLUSIONS

Les observations décrites ici montrent que le mûrier présente une sensibilité marquée à des niveaux même faibles de rayons UV B renforcés en zone tropicale. La corrélation négative entre la croissance végétative et la photosynthèse n'est pas expliquée et des compléments d'étude sont nécessaires pour analyser les composants protéines-pigments thylakoïdes.

DIFFERENTIATION OF ADVENTITIOUS BUDS AND PLANT REGENERATION BY *IN VITRO* LEAF CULTURE IN MULBERRY*

C.-F. LOU¹, J.-Z. TAN², J.-M. ZHOU¹ & M.-J. HU¹

1. Department of Sericulture, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou, 310029, China.

2. Biotechnics College of Suzhou University, Suzhou, 215151, China.

The influences of explants derived from various leaf orders of in vitro plants of Shinichinose (Morus alba L.), pH value of media, concentration of benzyladenine (BA) and different sources of sugar (fructose and sucrose) on the differentiation of adventitious buds were studied, with Murashige and Skoog (MS) as basic medium. Culturing the explants excised from incompletely expanded young leaves yielded the highest differentiation rate of adventitious buds in the MS medium supplemented with 5 mg l⁻¹ benzyladenine (BA), 0.2 mg l⁻¹ naphthalene (NAA), 3% sucrose with its pH adjusted to 5.6 prior to autoclave. Meanwhile, the differentiation rate of adventitious buds was substantially increased by culturing the explants in the MS medium containing 2.0 mg l⁻¹ BA and 0.001-0.01 mg l⁻¹ brassinolide (BR), or by soaking the explants in the solution of 20 mg l⁻¹ BA or 1.0 mg l⁻¹ BR for 3 seconds prior to being cultured in the MS medium reached the maximum of 91.6%. The adventitious buds were mostly differentiated in the parts of the main leaf vein, leaf base and leaf stalk, and succeeded in developing into regenerated plantlets by subculture.

Keywords: Mulberry, leaf culture, adventitious bud, differentiation.

INTRODUCTION

There are only a few reports on the techniques for obtaining regenerated plantlets by leaf culture, which are the base for introducing exogenous genes into plants through leaf-disc transformation to conduct plant genetic transformation (Machii, 1990; Guan *et al.*, 1994; Lou, 1994). But little progress has been made up to now due to the unperfected leaf culture techniques, and so on. In the recent years, however, there has been several successful cases in inducing adventitious buds and regenerating plantlets by leaf culture in mulberry (Saito and Katagiri, 1989; Saito, 1993; Kong *et al.*, 1990, 1995; Wang and Chen, 1995). But the test materials were mostly excised from young leaves within buds or cotyledons which brought about delicate manipulation and gave low differentiation rate of adventitious buds. In order to improve the mulberry leaf culture and plant regeneration system, the factors affecting the differentiation of adventitious buds by mulberry leaf culture were studied, ensuring a successful conduct of introducing exogenous genes into mulberry plants by Agrobacterium Ti plasmid.

MATERIALS AND METHODS

The explants were excised from evenly grown leaves of the first to third order of *in vitro* plantlets of Shinichinose (*Morus alba* L.). They were directly cultured in various differentiation media or treated by soaking in a solution of brassinolide (BR 1.0 mg l⁻¹) or benzyladenine (BA 20 mg l⁻¹) for three seconds prior to being cultured in differentiation media, after surface disinfection.

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China.

Using MS (Murashige and Skoog, 1962) as a basic medium, the media were supplemented with various concentrations of BA (2 mg l^{-1} or 5 mg l^{-1}), BR ($0.0001\text{-}1.0 \text{ mg l}^{-1}$), fructose (3% or 4%) or sucrose (3% or 4%), and solidified with 0.7% agar, in line with the experimental requirements. Their pH was adjusted to 5.6 prior to autoclave. All cultures were grown at $26 \pm 1^\circ\text{C}$ and provided with 12 h white fluorescent light per day at an intensity of 1 500 lux in a greenhouse. The differentiation rate of adventitious buds of explants was investigated in 4 weeks, and the cultures in which the adventitious buds were induced were subcultured to fresh medium. Their development and leaf growth were observed.

RESULTS AND DISCUSSION

The differentiation rate of adventitious buds derived from various leaf orders showed that the cultures from the incompletely expanded young leaves gave a higher differentiation rate of 59.6%, it decreased with the leaf age and leaf enlargement (Table I). Leaves collected from mulberry trees grown in the field exhibited a similar tendency. This probably related with the vigorous physiological metabolism in the cells of young leaves where tissue differentiation is easy to be induced. Therefore, it is preferable for mulberry leaf culture to take young leaves as explants. Although the size of the explants excised in this experiment was larger than that reported by Kong *et al.*, the differentiation rate was approximately doubled.

Table I. Differentiation rate of adventitious buds of the cultures excised from various leaf orders.

Tableau I. Taux de différenciation des bourgeons adventifs à partir de cultures de feuilles de différents niveaux.

Sources of explants	Number of cultures	Differentiation rate (%)
Sources des explants	Nombre de cultures	Taux de différenciation (%)
Unexpanded leaf / Feuille non déployée (0.5-0.8 cm)	37	59.5
Expanded leaf / Feuille déployée (1.0-1.4 cm)	45	42.2
Expanded leaf / Feuille déployée (1.5-2.0 cm)	30	13.3

Note: BA 5.0 mg l^{-1} , NAA 0.2 mg l^{-1} , sucrose 3%.

Note : BA 5.0 mg/l , ANA 0.2 mg/l , saccharose 3 %.

The pH value in the medium imposed great influences on inducing adventitious buds from the leaf. Table II showed that a pH value lower or higher than 5.6 decreased the differentiation rate. It confirmed that the optimum pH value of the medium is 5.6 (Kong *et al.*, 1990).

Comparative effects of fructose and sucrose on adventitious bud formation are presented in Table III. Both differentiation rates of adventitious buds in the medium added with 3% or 4% sucrose were higher than in those added with 3% or 4% fructose, which was contrary to the result reported by Kong *et al.* (1990). Since the price of sucrose is much lower than that of fructose, we consider it is more acceptable to add 3-4% sucrose to mulberry leaf culture medium.

The medium containing BA and BR at one time promoted the differentiation rate of adventitious buds about 10% higher than the medium containing BA alone (Table IV). But the leaves of the cultures became blanched and grew deformedly when the concentration of BR exceeded 0.01 mg l^{-1} , and the

induced bud-like or tubercular prominence failed to develop into shoots through subculture. Moreover, leaves soaked in the solution of high concentration of BA or BR rapidly for three seconds prior to being cultured in medium gave a 30-54% higher differentiation rate of adventitious buds than the control (BA, 2.0 mg l⁻¹) (Table V). So that a rapid soaking treatment with BA or BR solution of high concentration can be adopted for some materials whose adventitious bud formation is difficult to be induced to increase the differentiation rate in leaf culture. Although BR has the function of promoting cell division and rooting, and delaying the onset of senescence of leaf blades, there are no

Table II. Effects of the pH value of media on the differentiation rate of adventitious buds.

Tableau II. Effets de la valeur du pH des milieux sur le taux de différenciation des bourgeons adventifs.

pH value	Number of cultures	Differentiation rate (%)
<i>Valeur du pH</i>	<i>Nombre de cultures</i>	<i>Taux de différenciation (%)</i>
4.8	30	34.5
5.2	30	33.3
5.6	30	70.0
6.0	30	36.7
6.4	30	40.0

Note: BA 5.0 mg l⁻¹, NAA 0.2 mg l⁻¹, sucrose 3%.

Note : BA 5,0 mg/l, ANA 0,2 mg/l, saccharose 3 %.

Table III. Comparative effects of fructose and sucrose on inducing adventitious bud formation.

Tableau III. Effets comparés du fructose et du saccharose sur l'induction de bourgeons adventifs.

Sources of sugar	Number of cultures	Differentiation rate (%)
<i>Sources de sucre</i>	<i>Nombre de cultures</i>	<i>Taux de différenciation (%)</i>
Sucrose / Saccharose 3%	36	58.3
Fructose 3%	36	22.2
Sucrose / Saccharose 4%	36	66.7
Fructose 4%	36	48.0

Note: BA 5.0 mg l⁻¹, NAA 0.2 mg l⁻¹.

Note : BA 5,0 mg/l, ANA 0,2 mg/l.

reports on its application in mulberry culture. In the light of the result from this experiment, it is suitable for the concentration of BR to be lower than 0.1 mg l^{-1} .

Cytokinin is a decisive factor for controlling adventitious bud formation in the leaf. As one sort of cytokinin, BA showed great effects on the differentiation of adventitious buds in mulberry leaves. But the rate of it differed considerably with different sources of explants, types of sugar and their concentration. Generally, the optimum concentration of BA in a differentiating medium ranged from 3 to 5 mg l^{-1} .

Table IV. Effects of brassinolide (BR) on the differentiation rate of adventitious buds.

Tableau IV. Effets du brassinolide (BR) sur le taux de différenciation des bourgeons adventifs.

	Number of cultures	Differentiation rate (%)
	<i>Nombre de cultures</i>	<i>Taux de différenciation (%)</i>
BA + BR 0.0001 mg l^{-1}	30	46.7
BA + BR 0.001 mg l^{-1}	36	47.2
BA + BR 0.01 mg l^{-1}	36	47.2
BA + BR 0.1 mg l^{-1}	30	36.7
BA + BR 1.0 mg l^{-1}	36	44.4
BA 2.0 mg l^{-1} (control / témoin)	48	37.5

Note: BA 2.0 mg l^{-1} , NAA 0.2 mg l^{-1} , sucrose 3%.

Note : BA 2.0 mg/l , ANA 0.2 mg/l , saccharose 3%.

Table V. Effects of the soaking treatment with benzyladenine (BA) or brassinolide (BR) on the differentiation rate of adventitious buds.

Tableau V. Effets du traitement par trempage dans la benzyladénine (BA) ou le brassinolide (BR) sur le taux de différenciation des bourgeons adventifs.

	Number of cultures	Differentiation rate (%)
	<i>Nombre de cultures</i>	<i>Taux de différenciation (%)</i>
BR* 1.0 mg l^{-1}	12	91.6
BA* 20.0 mg l^{-1}	18	66.7
BA 2.0 mg l^{-1} (control / témoin)	48	37.5

* The cultures of leaves were soaked in a solution of BR or BA for 3 seconds prior to being cultured in media which contained BA 2.0 mg l^{-1} , NAA 0.2 mg l^{-1} , sucrose 3%, same as control.

* Les cultures foliaires ont été trempées dans une solution de BR ou de BA pendant 3 secondes avant piquage dans des milieux contenant BA 2.0 mg/l , ANA 0.2 mg/l , saccharose 3 % (identique au témoin).

The adventitious buds induced by mulberry leaf culture were probably concentrated in the parts of the main vein, leaf stalk and leaf base, especially in the boundary of stalk and main vein, growing in singles or clumps, mostly in clumps (Fig. 1: a, b and c). The cut portion of the main vein or leaf stalk also gave rise to adventitious bud formation. The induced bud-like prominence or adventitious buds (clumps) succeeded in developing into tube plantlets by subculture (Fig. 1: d and e).

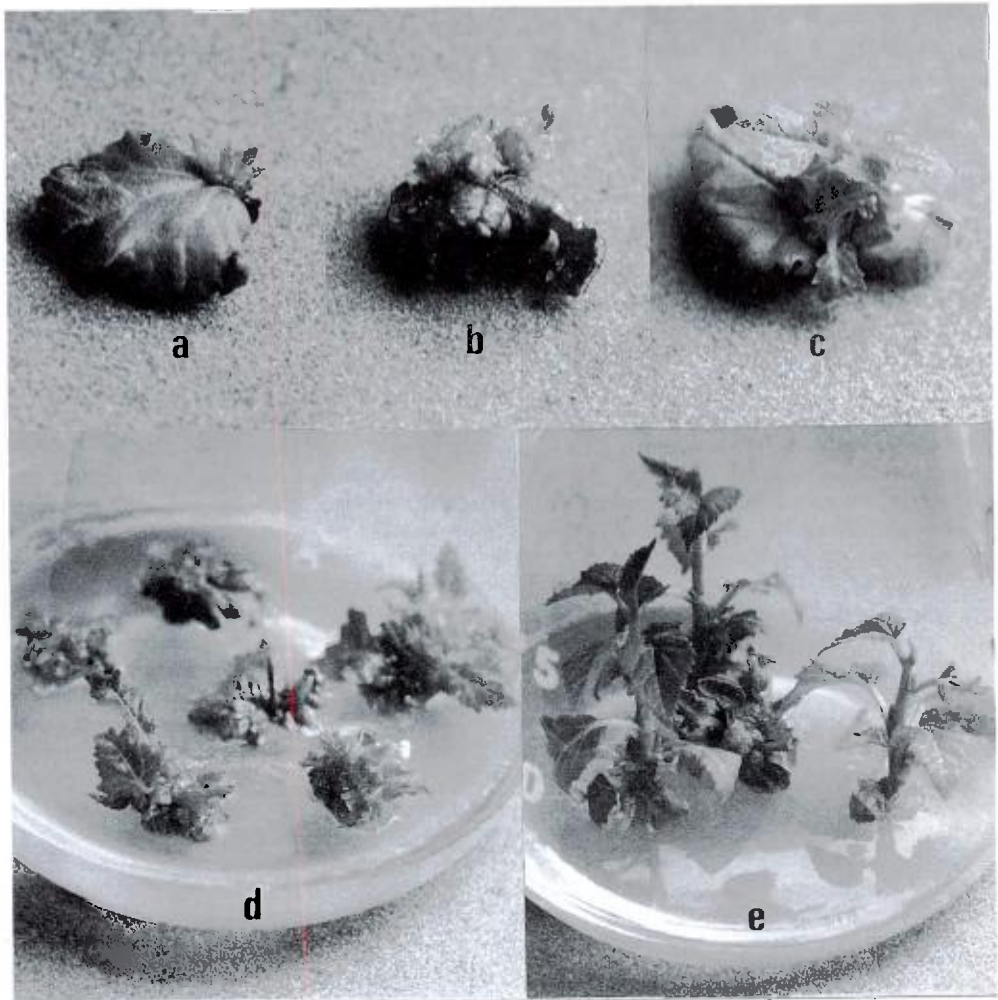


Fig. 1: Differentiation of adventitious buds and plant regeneration by mulberry leaf culture.

a, b, c: Adventitious buds (clumps) formed in the base part of the main leaf veins.
 d: Adventitious buds differentiating.
 e: Growth of shootlets after subculture.

Fig. 1 : Différenciation des bourgeons adventifs et régénération des plants par culture des feuilles de mûrier.

a, b, c : Bourgeons (amas) adventifs se formant dans la partie basale des nervures principales de la feuille.
 d : Bourgeons adventifs en cours de différenciation.
 e : Croissance des pousses après repiquage.

CONCLUSION

An optimized combination of pH value, type of sugar and their concentration, type of hormones and their concentration in medium, plus sources of explants can ensure a stable differentiation rate of adventitious buds of 50-60%, maximum of 90%, in mulberry leaf culture.

REFERENCES

- MACHII H. (1990) Leaf disc transformation of mulberry plant (*Morus alba* L.) by *Agrobacterium* Ti plasmid. J. Sericult. Sci. Japan, 59, 105-110.
- GUAN Z.-W., ZHANG Q.-J., ZHUANG C.-X., HUANG Z.-T. (1994) Transferring synthetic antibacterial peptide gene from Chinese oak silkworm into mulberry plant by using Ti plasmid from *Agrobacterium tumefaciens*. Science of Sericulture, China, 20, 1-6.
- KONG L.-W., ZHENG S.-X., BIAN Y.-S. (1990) Leaf culture and plant regeneration of different mulberry varieties. Science of Sericulture, China, 16(4), 198-202.
- KONG L.-W., TAN Z.-D., BIAN Y.-S. (1995) Studies on the main factors influencing differentiation of adventitious buds from mulberry leaves. Science of Sericulture, China, 21, 67-71.
- LOU C.-F. (1994) A survey on the mulberry gene engineering. Bulletin of Sericulture, China, 25, 20-21.
- MURASHIGE T., SKOOG F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant., 15, 473-497.
- SAITO H., KATAGIRI K. (1989) Adventitious bud induction in leaves isolated from winter buds of mulberry. J. Sericult. Sci. Japan, 58, 197-202.
- SAITO H. (1993) Relationship between leaf age and adventitious bud formation in immature leaf of mulberry. J. Sericult. Sci. Japan, 62, 435-436.
- WANG Y., CHEN A.-Y. (1995) Adventitious bud formation and plant regeneration from mulberry cotyledons. Science of Sericulture, China, 21, 122-123.

DIFFERENCIATION DES BOURGEONS ADVENTIFS ET REGENERATION DES PLANTS PAR CULTURE *IN VITRO* DES FEUILLES CHEZ LE MURIER*

C.-F. LOU¹, J.-Z. TAN², J.-M. ZHOU¹ & M.-J. HU¹

1. Department of Sericulture, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou, 310029, Chine.

2. Biotechnics College of Suzhou University, Suzhou, 215151, Chine.

*On a étudié les effets des explants obtenus à partir de feuilles de différents rangs sur des plants de Shinichinose (*Morus alba* L.) cultivés in vitro, en fonction de la valeur du pH des milieux, de la concentration en benzyladenine (BA) et de différentes sources de sucre (fructose et saccharose) sur la différenciation des bourgeons adventifs, en utilisant le milieu Murashige et Skoog (MS) comme milieu de base. La culture des explants dérivés de jeunes feuilles partiellement déployées donne le taux le plus élevé de différenciation des bourgeons adventifs dans le milieu MS additionné de 5 mg l⁻¹ de benzyladenine (BA), 0,2 mg l⁻¹ de naphthalène (ANA), 3 % de saccharose et un pH ajusté à 5,6 avant la stérilisation à l'autoclave. Parallèlement, le taux de différenciation des bourgeons adventifs augmente fortement chez les explants cultivés dans un milieu MS contenant 2,0 mg l⁻¹ BA et 0,001-0,01 mg l⁻¹ brassinolide (BR) ; en trempant les explants dans une solution contenant 20 mg l⁻¹ BA ou 1,0 mg l⁻¹ BR pendant 3 secondes avant la mise en culture dans le milieu MS, le taux de différenciation atteint une valeur maximale de 91,6 %. Les bourgeons adventifs se différencient surtout dans les parties principales de la nervure centrale, à la base et sur le pétiole de la feuille ; ils parviennent à se développer en plantules régénérées par repiquage.*

INTRODUCTION

Il existe peu de publications sur les techniques concernant l'obtention de plantules régénérées par culture des feuilles, techniques de base pour l'introduction de gènes exogènes dans les plants par transformation du disque foliaire aboutissant à une transformation génétique des plants (Machii, 1990 ; Guan et coll., 1994 ; Lou, 1994). Peu de progrès ont été faits jusqu'à présent, les techniques de culture des feuilles n'étant pas encore au point. Au cours des dernières années, on a observé plusieurs cas d'induction réussie de bourgeons adventifs et de régénération de plantules par culture des feuilles chez le mûrier (Saito et Katagiri, 1989 ; Saito, 1993 ; Kong et coll., 1990, 1995 ; Wang et Chen, 1995). Cependant, les matériels expérimentaux étaient, dans la plupart des cas, excisés à partir de jeunes feuilles à l'intérieur des bourgeons ou des cotylédons, impliquant des manipulations délicates et donnant des taux faibles de différenciation des bourgeons adventifs. Afin d'améliorer la culture des feuilles de mûrier et le système de régénération des plants, on a étudié les facteurs qui affectent la différenciation des bourgeons adventifs par culture de feuilles de mûrier et qui permettent de réussir l'introduction de gènes exogènes dans les plants de mûrier avec le plasmide Ti d'*Agrobacterium*.

MATERIELS ET METHODES

Les explants ont été excisés sur des feuilles du premier au troisième rang issues de plantules *in vitro* de Shinichinose (*Morus alba* L.). Ils ont été mis immédiatement en culture dans différents

* Projet financé par la Fondation chinoise pour les sciences naturelles.

milieux de différenciation ou traités par trempage dans une solution de brassinolide (BR 1,0 mg l⁻¹) ou de benzyladénine (BA 20 mg l⁻¹) pendant 3 secondes avant la mise en culture dans les milieux de différenciation, après désinfection de surface.

On a utilisé le milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) comme milieu de base ; les milieux ont été enrichis avec différentes concentrations de BA (2 mg l⁻¹ ou 5 mg l⁻¹), BR (0,0001-1,0 mg l⁻¹), fructose (3 % ou 4 %) ou saccharose (3 % ou 4 %) et solidifiés avec de l'agar à 7 %, conformément aux protocoles expérimentaux. Le pH a été ajusté à 5,6 avant la stérilisation à l'autoclave. Toutes les cultures ont été effectuées sous serre à 26 ± 1 °C et maintenues sous éclairage fluorescent blanc de 12 heures par jour à une intensité de 1 500 lux. Le taux de différenciation des bourgeons adventifs des explants a été observé après 4 semaines et les cultures sur lesquelles les bourgeons adventifs ont été induits ont été repiquées dans un nouveau milieu. On a observé leur développement et la croissance des feuilles.

RESULTATS ET DISCUSSION

Le taux de différenciation des bourgeons adventifs en fonction du type de feuille montre que les cultures effectuées avec des jeunes feuilles partiellement déployées donnent un taux de différenciation élevé de 59,6 % ; ce taux diminue à mesure que la feuille se développe et s'agrandit (Tableau I). Les feuilles prélevées sur des mûriers cultivés en plantation présentent la même tendance. Ceci est probablement lié au métabolisme physiologique actif dans les cellules des jeunes feuilles, chez lesquelles il est facile d'induire la différenciation des tissus. Il est donc préférable d'utiliser de jeunes feuilles comme explants pour la culture des feuilles de mûrier. Bien que les explants excisés dans cette expérience soient plus grands que ceux utilisés par Kong et coll., le taux de différenciation obtenu est presque deux fois plus élevé.

La valeur du pH du milieu influence fortement l'induction de bourgeons adventifs à partir de la feuille. Le tableau II montre qu'un pH inférieur ou supérieur à 5,6 entraîne une diminution du taux de différenciation. Il a déjà été déterminé que la valeur optimale du pH du milieu est de 5,6 (Kong et coll., 1990).

Les effets comparés du fructose et du saccharose sur la formation des bourgeons adventifs sont présentés dans le tableau III. Les taux de différenciation des bourgeons adventifs sur les milieux contenant 3 ou 4 % de saccharose sont plus élevés que sur les milieux contenant 3 ou 4 % de fructose, ce qui contredit les observations de Kong et coll. (1990). Le coût du saccharose étant nettement inférieur à celui du fructose, nous pensons qu'il est préférable d'ajouter 3 à 4 % de saccharose au milieu de culture des feuilles de mûrier.

Le milieu contenant à la fois de la BA et du BR donne un taux de différenciation des bourgeons adventifs supérieur d'environ 10 % à celui obtenu avec le milieu contenant de la BA seule (Tableau IV). Néanmoins, les feuilles de ces cultures blanchissent et présentent des anomalies de croissance lorsque la concentration en BR dépasse 0,01 mg l⁻¹ et la protubérance ressemblant à un bourgeon ou de type tuberculeux ne se transforme pas en pousse après repiquage. De plus, les feuilles trempées dans une solution fortement concentrée de BA ou de BR pendant trois secondes avant la mise en culture donnent un taux de différenciation des bourgeons adventifs supérieur de 30 à 54 % à celui obtenu chez le témoin (BA, 2,0 mg l⁻¹) (Tableau V). Aussi, pour améliorer le taux de différenciation dans les cultures de feuilles, un traitement bref par trempage dans une solution de BR ou de BA fortement concentrée est conseillé pour certains matériels chez lesquels il est difficile d'induire la formation de bourgeons adventifs. Bien que le BR ait pour fonction de favoriser la division des cellules et l'enracinement et de retarder le début de la sénescence des feuilles, il n'existe pas de publication sur son utilisation dans la culture du mûrier. D'après les résultats de cette expérience, il apparaît que la concentration en BR ne doit pas être inférieure à 0,1 mg l⁻¹.

La cytokinine est un facteur déterminant pour la formation des bourgeons adventifs dans la feuille. La BA, qui fait partie des cytokinines, a des effets marqués sur la différenciation des bourgeons adventifs chez les feuilles de mûrier mais le taux de différenciation varie fortement en fonction des sources d'explants, des types de sucre et de leur concentration. En général, la concentration optimale en BA dans un milieu de différenciation se situe entre 3 et 5 mg l⁻¹.

Les bourgeons adventifs induits par culture de feuilles de mûrier sont concentrés dans les parties de la nervure principale, du pétiole et de la base de la feuille, principalement à la limite entre le pétiole et la nervure principale ; ils poussent de manière isolée ou en amas, la plupart du temps en amas (Fig. 1 : a, b et c). La partie coupée de la nervure principale ou du pétiole de la feuille donne également des bourgeons adventifs. La protubérance ressemblant à un bourgeon et les bourgeons adventifs se transforment en plantules en éprouvette par repiquage (Fig. 1 : d et e).

CONCLUSION

La combinaison optimale de la valeur du pH, du type et de la concentration de sucre, le type et la concentration d'hormones dans le milieu ainsi que les sources d'explants permettent d'assurer un taux stable de différenciation des bourgeons adventifs de 50 à 60 %, avec un taux maximal de 90 %, par culture des feuilles de mûrier.

STUDIES ON THE HIBERNATION SCHEDULE FOR BIVOLTINE PURE AND HYBRID SILKWORM EGGS, *BOMBYX MORI* (LEPIDOPTERA: BOMBYCIDAE), AESTIVATED FOR TWENTY DAYS UNDER TROPICAL CONDITIONS

A. MANJULA* & H.K. HURKADLI

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

Silkworm eggs of bivoltine pure races and their hybrids (bivoltine × bivoltine) were used for the present studies. The silkworm eggs after 20 days of aestivation at 24 ± 1 °C, relative humidity of $75 \pm 5\%$, were subjected to cold storage at low temperature of 5 °C for different durations from 50 to 200 days and released at an interval of 10 days. The schedule for preservation of bivoltine silkworm eggs has been studied for programming the laying release any time from three months to seven months under tropical conditions.

Keywords: *Bombyx mori*, bivoltine, pure race, hybrid eggs, cold storage, hatching performance.

INTRODUCTION

The bivoltine silkworms complete only two generations in a year under temperate conditions. The silkworm lays diapausing and non-diapausing eggs, depending on the environmental conditions such as temperature, relative humidity and photoperiod during the various stages of development. Insect diapause is an adaptation for survival in unfavourable environments, the insect enters into a dormant state characterised by low physiological activities such as respiration and metabolism (Lees, 1955; Wang, 1983). Diapause is a programmed developmental arrest which may occur during the life span of an insect, this state is associated with the physiological adaptation which enables the embryo to tolerate very low temperatures in winter (Yamashita *et al.*, 1988), and the genetic characters and their expression are mediated by the environmental stimuli (Denlinger, 1985; Yamashita and Hasegawa, 1985).

Introduction of bivoltine has paid a very high dividend as a potential male parent, unlike in the temperate countries, bivoltines are required throughout the year in tropical conditions, necessitating to prevent the eggs from entering into diapause. On a commercial scale this is done through acid treatment of eggs. In the tropical conditions, rearing of bivoltine silkworm larvae cannot be taken up during adverse conditions. The eggs are to be prepared during the favourable season of the year (September to March) and by programming the silkworm eggs either by following chilling (Manjula and Hurkadli, 1995) or by hibernation schedule, the eggs can be made to hatch whenever it is needed in a year. Hence, the present study was taken up to i) find out the suitable period of preservation at 23-25 °C, ii) at 5 °C for practical use of artificially hibernated bivoltine eggs and iii) to prepare a ready reckoner for three- to seven-month hibernation schedules by preserving the eggs at 20 days of aestivation period to obtain a hatching rate of above 90% under tropical conditions.

MATERIALS AND METHODS

Popular bivoltine race cocoons were raised in the Seed Technology Laboratory, they were processed and preserved at a temperature of 24 ± 1 °C, relative humidity of $75 \pm 5\%$, 16 hours of light and 8 hours of darkness for preparation of the pure race, i.e., NB7, KA, NB4D₂, NB18, and hybrid

* To whom correspondence should be sent. Address: Silkworm Seed Technology Laboratory, Central Silk Board, Kodathi, Bangalore 560 035, India.

eggs, NB₇ × NB₁₈, KA × NB₄D₂, NB₁₈ × NB₇ and NB₄D₂ × KA. The emerged male and female moths were allowed to mate for three and a half hours. The female moths after depairing were allowed to oviposit in semidark conditions. The disease-free silkworm eggs were subjected to an aestivation period of 20 days at a temperature of 24 ± 1 °C, relative humidity of $75 \pm 5\%$, light for 16 hours and darkness of 8 hours. The detailed procedure of aestivation and hibernation schedule followed is as follows,

Temperature (°C)	24	20	15	10	05	15	20	24
Duration (days)	20	03	03	03	50-200	03	01	*

* Incubation.

The layings cold-stored at 5 °C were released from 50 days onwards with a gap of 10 days interval for up to 200 days. The released layings were subjected to acid treatment at a temperature of 46.1 °C, specific gravity of 1.075 at 15 °C. The layings of oval cocoon race and their hybrids were divided into four batches of 5 layings each and treated with acid for durations of 3, 4 and 5 minutes. The dumbbell cocoon pure race and their hybrid layings after release from cold storage were divided into four batches and three batch layings were treated with acid for 4, 5 and 6 minutes. The fourth batch of layings was kept for incubation without acid treatment and served as control.

All the layings released were incubated at a temperature of 24 ± 1 °C, relative humidity of $75 \pm 5\%$, 16 hours of light and 8 hours of darkness. These layings were black-boxed when the embryo attained head pigmentation stage and were exposed to light on the second day of black-boxing. The hatched, unhatched, unfertilised and dead eggs were counted and the percentage of hatching was calculated. The experiment was conducted five times and studies were extended to mass layings to observe the hatching performance. The results were subjected to statistical analysis using the 't' test.

RESULTS AND DISCUSSION

The effect of the 20 days' aestivation period on bivoltine silkworm eggs and preservation at low temperature for different durations from 50 to 170 days is shown in Tables I and II for pure races and in Tables III and IV for hybrids. The results indicate that for the layings cold-stored at 5 °C for durations of 70 to 170 days the hatching was above 90%; the details of the safest period and the schedule to be followed are indicated below.

Hibernation schedule for bivoltine silkworm eggs

Race / Temperature (°C)	Duration in days							
	24	20	15	10	5	15	20	24
NB ₇	20	03	03	03	70-150	03	01	*
KA	20	03	03	03	90-170	03	01	*
NB ₁₈	20	03	03	03	90-160	03	01	*
NB ₄ D ₂	20	03	03	03	90-150	03	01	*
NB ₇ × NB ₁₈	20	03	03	03	100-170	03	01	*
KA × NB ₄ D ₂	20	03	03	03	80-160	03	01	*
NB ₁₈ × NB ₇	20	03	03	03	90-160	03	01	*
NB ₄ D ₂ × KA	20	03	03	03	100-160	03	01	*

* Incubation

Table I. Effect of aestivation period for 20 days on preservation of bivoltine silkworm eggs at low temperature for different durations on the hatching performance.

Tableau I. Effet de l'estivation pendant 20 jours des oeufs de vers à soie et de la durée de conservation à basse température sur la performance d'éclosion.

Duration at 5 °C (days)	Treatment (minutes)	Mean ± SE	t cal	t table	Mean ± SE	t cal	t table
<i>Durée de conservation à 5 °C (jours)</i>	<i>Traitement (minutes)</i>	<i>Moyenne ± SE</i>	<i>t cal</i>	<i>Tableau t</i>	<i>Moyenne ± SE</i>	<i>t cal</i>	<i>Tableau t</i>
Race: NB ₇				Race: KA			
50	3	63.63 ± 6.69	0.889	2.306	70.00 ± 4.70	0.230	2.365
	4	71.00 ± 8.23	1.477		67.60 ± 6.74	0.420	2.365
	5	72.62 ± 8.63	1.580		79.52 ± 4.96	0.705	2.447
	C	54.20 ± 7.83			72.27 ± 9.01		
60	3	79.36 ± 5.60	0.310	2.306	89.62 ± 2.83	1.441	2.365
	4	91.66 ± 1.14	2.046		89.80 ± 3.74	1.326	
	5	89.62 ± 2.26	1.511		89.60 ± 2.52	1.486	
	C	81.68 ± 4.74			83.40 ± 3.12		
70	3	83.77 ± 4.57	0.708	2.571	93.80 ± 1.24	1.731	2.365
	4	85.62 ± 2.69	1.042		89.92 ± 2.20	0.030	2.447
	5	86.25 ± 1.98	1.165		89.93 ± 2.67	0.020	2.447
	C	77.36 ± 8.67			90.02 ± 1.90		
80	3	88.40 ± 1.70*	2.810	2.447	93.16 ± 1.04	0.530	2.305
	4	92.85 ± 0.63	0.760		90.87 ± 1.40	1.840	2.365
	5	88.95 ± 2.33	1.890		95.46 ± 1.01	1.096	2.306
	C	93.40 ± 0.36			93.92 ± 0.97		
90	3	85.70 ± 1.09*	2.840	2.447	91.32 ± 1.25	2.240	2.306
	4	92.90 ± 1.85	0.486		92.64 ± 1.52	1.140	2.306
	5	93.72 ± 1.57	0.872		91.84 ± 1.45	1.180	2.365
	C	91.65 ± 1.79			94.58 ± 0.74		
100	3	92.37 ± 1.64	0.712	2.447	92.22 ± 1.33	0.800	2.365
	4	90.85 ± 1.90	0.224		94.10 ± 1.23	0.070	2.306
	5	90.20 ± 1.25	0.033		92.34 ± 1.34	0.800	2.306
	C	93.47 ± 0.76			94.28 ± 2.00		
110	3	95.33 ± 0.79	1.664	2.571	94.03 ± 1.24	0.529	2.571
	4	91.02 ± 1.74	1.280	2.447	95.20 ± 1.01	1.264	2.447
	5	92.03 ± 2.07	0.730	2.571	94.05 ± 0.71	0.667	2.447
	C	93.47 ± 0.76			92.97 ± 1.44		

Continued overleaf / Suite page suivante

Table I (continued) / Tableau I (suite).

Duration at 5 °C (days)	Treatment (minutes)	Mean ± SE	t cal	t table	Mean ± SE	t cal	t table
<i>Durée de conservation à 5 °C (jours)</i>	<i>Traitement (minutes)</i>	<i>Moyenne ± SE</i>	<i>t cal</i>	<i>Tableau t</i>	<i>Moyenne ± SE</i>	<i>t cal</i>	<i>Tableau t</i>
Race: NB7				Race: KA			
120	3	95.57 ± 0.47	0.140	2.447	94.52 ± 0.84	2.570	2.306
	4	96.22 ± 0.64	0.314	2.447	93.40 ± 1.09	3.030	
	5	90.80 ± 2.99	1.690	2.571	94.92 ± 0.94	1.950	
	C	95.77 ± 1.28			96.90 ± 0.38		
130	3	94.62 ± 0.82	1.281	2.365	95.78 ± 0.94	0.480	2.306
	4	91.32 ± 1.45	0.640		92.38 ± 1.07	1.860	
	5	91.84 ± 1.87	0.320		91.96 ± 0.59	2.720	
	C	92.56 ± 1.27			95.12 ± 1.00		
140	3	91.50 ± 1.54	1.330	2.365	93.40 ± 1.55	0.630	2.306
	4	88.95 ± 1.31	3.210		94.64 ± 0.98	0.093	
	5	94.05 ± 1.84	0.198		94.20 ± 0.68	0.460	
	C	93.68 ± 0.81			94.52 ± 0.82		
150	3	92.20 ± 2.65	0.330	2.776	90.87 ± 1.34	0.840	2.571
	4	92.50 ± 1.94	0.300		93.02 ± 0.48	0.129	2.571
	5	89.70 ± 1.54	1.750		92.76 ± 1.81	0.010	2.776
	C	93.20 ± 1.27			92.80 ± 1.96		
160	3	91.83 ± 1.63	0.740	2.776	91.92 ± 1.82	0.100	2.571
	4	92.86 ± 1.37	0.270		95.23 ± 1.15	1.019	2.776
	5	91.70 ± 1.97	0.710		93.76 ± 1.06	0.765	2.447
	C	93.40 ± 1.55			91.56 ± 3.41		
170	3	90.36 ± 3.06	1.658	2.776	92.90 ± 1.90	1.510	2.571
	4	89.36 ± 1.95	1.900		90.13 ± 2.94	2.080	2.776
	5	74.13 ± 4.78	2.130		88.76 ± 3.79	1.980	2.776
	C	84.76 ± 1.43			96.40 ± 0.61		
180	3	94.10 ± 2.76	1.271	4.303	88.25 ± 3.92	0.916	4.303
	4	76.50 ± 13.79	0.150		67.75 ± 20.12	0.210	
	5	87.75 ± 6.82	0.825		80.50 ± 5.09	0.432	
	C	73.30 ± 16.12			73.30 ± 15.84		

Treatment: acid / Traitement : acide - C: Control / Témoin. t cal: t calculated / t calculé. SE: Standard error / Ecart type.

* Significant / Significatif.

Table II. Effect of aestivation period for 20 days on preservation of bivoltine silkworm eggs at low temperature for different durations on the hatching performance.

Tableau II. Effet de l'estivation pendant 20 jours des oeufs de vers à soie et de la durée de conservation à basse température sur la performance d'éclosion.

Duration at 5 °C (days)	Treatment (minutes)	Mean ± SE	t cal	t table	Mean ± SE	t cal	t table
<i>Durée de conservation à 5 °C (jours)</i>	<i>Traitement (minutes)</i>	<i>Moyenne ± SE</i>	<i>t cal</i>	<i>Tableau t</i>	<i>Moyenne ± SE</i>	<i>t cal</i>	<i>Tableau t</i>
Race: NB ₁₈				Race: NB ₄ D ₂			
50	4	70.58 ± 8.09	1.856	2.365	63.18 ± 5.99	1.263	2.365
	5	80.78 ± 6.64*	2.923		64.86 ± 7.66	1.226	
	6	75.62 ± 7.31*	2.371		63.32 ± 6.69	1.200	
	C	47.07 ± 9.94			49.20 ± 9.90		
60	4	81.82 ± 3.11	1.320	2.306	77.18 ± 5.85	1.090	2.365
	5	85.94 ± 2.36	0.340		78.00 ± 2.83	1.528	
	6	73.34 ± 4.69*	2.580		86.17 ± 1.73*	2.577	
	C	87.14 ± 2.53			67.22 ± 7.15		
70	4	85.56 ± 3.69	0.581	2.776	77.66 ± 2.57	0.630	2.776
	5	88.42 ± 2.50	1.483	2.447	82.43 ± 2.94	0.737	
	6	88.16 ± 0.12*	4.450	2.776	84.20 ± 1.84	1.584	
	C	83.33 ± 1.08			79.76 ± 2.11		
80	4	92.30 ± 1.52	1.009	2.447	81.85 ± 2.39	0.700	2.447
	5	89.42 ± 1.56	0.016	2.447	82.75 ± 3.85	0.460	
	6	87.40 ± 2.98	0.710	2.571	85.22 ± 1.35	0.056	
	C	89.82 ± 1.92			85.55 ± 4.64		
90	4	93.80 ± 0.80	1.965	2.365	87.00 ± 0.74	0.230	
	5	92.54 ± 1.37	0.905		81.50 ± 2.14	1.630	
	6	94.22 ± 1.19	1.881		89.75 ± 3.14	0.521	
	C	90.72 ± 1.45			87.62 ± 2.60		
100	4	93.65 ± 1.16	0.740	2.365	90.36 ± 2.26	0.680	2.776
	5	92.50 ± 1.60	1.210	2.306	93.83 ± 1.01	2.289	
	6	92.42 ± 1.56	1.320	2.365	95.23 ± 1.22	2.752	
	C	94.80 ± 1.01			88.20 ± 2.24		
110	4	91.42 ± 1.10	0.870	2.365	91.06 ± 1.11	1.820	2.776
	5	92.25 ± 1.57	0.330	2.445	91.20 ± 2.19	1.110	
	6	94.48 ± 0.91	0.918	2.365	91.20 ± 1.77	1.300	
	C	92.97 ± 1.44			93.92 ± 1.11		

Continued overleaf / Suite page suivante

Table II (continued) / *Tableau II (suite)*.

Duration at 5 °C (days)	Treatment (minutes)	Mean $\pm$ SE	t cal	t table	Mean $\pm$ SE	t cal	t table
<i>Durée de conservation à 5 °C (jours)</i>	<i>Traitement (minutes)</i>	<i>Moyenne $\pm$ SE</i>	<i>t cal</i>	<i>Tableau t</i>	<i>Moyenne $\pm$ SE</i>	<i>t cal</i>	<i>Tableau t</i>
Race: NB₁₈							
120	4	94.90 $\pm$ 0.55	0.466	2.306	92.43 $\pm$ 2.00	0.313	2.776
	5	90.62 $\pm$ 0.75	2.400		91.86 $\pm$ 1.57	0.084	
	6	96.96 $\pm$ 0.80	0.180		92.99 $\pm$ 1.94	0.564	
	C	94.24 $\pm$ 1.30			91.70 $\pm$ 1.20		
130	4	93.54 $\pm$ 0.65	1.680	2.306	91.00 $\pm$ 0.87	2.010	2.776
	5	92.68 $\pm$ 0.90	2.160	2.306	90.96 $\pm$ 0.78	2.140	
	6	92.24 $\pm$ 2.02	1.470	2.365	93.20 $\pm$ 1.98	0.160	
	C	95.10 $\pm$ 0.67			93.56 $\pm$ 0.92		
140	4	93.58 $\pm$ 1.32	0.710	2.306	93.85 $\pm$ 1.13	2.170	2.447
	5	90.50 $\pm$ 1.95	2.000	2.365	91.06 $\pm$ 0.64*	7.830	
	6	92.45 $\pm$ 1.26	1.380	2.365	94.97 $\pm$ 0.80	1.650	
	C	94.86 $\pm$ 1.19			96.42 $\pm$ 0.36		
150	4	92.10 $\pm$ 1.86	0.790	2.447	91.10 $\pm$ 2.27	1.400	2.776
	5	92.10 $\pm$ 2.20	0.730	2.447	86.40 $\pm$ 1.54*	3.680	
	6	90.45 $\pm$ 0.91	2.110	2.365	89.20 $\pm$ 4.15	1.310	
	C	93.76 $\pm$ 1.19			95.16 $\pm$ 1.81		
160	4	90.77 $\pm$ 1.89	0.430	2.571	89.26 $\pm$ 3.28	1.240	2.776
	5	86.86 $\pm$ 2.51	1.860	2.776	87.70 $\pm$ 5.42	1.080	
	6	88.40 $\pm$ 2.17	1.450	2.776	88.66 $\pm$ 2.91	1.550	
	C	91.80 $\pm$ 0.86			93.86 $\pm$ 1.67*		
170	4	91.86 $\pm$ 1.24	0.049	2.571	89.35 $\pm$ 1.16	1.870	2.571
	5	86.60 $\pm$ 2.73	1.880		88.66 $\pm$ 2.30	1.490	
	6	89.93 $\pm$ 0.29	1.190		85.60 $\pm$ 1.67	3.370	
	C	91.77 $\pm$ 1.29			92.53 $\pm$ 1.19		
180	4	87.70 $\pm$ 1.13	2.043	4.303	88.76 $\pm$ 0.59	2.725	4.303
	5	70.90 $\pm$ 0.00	3.300	12.703	81.96 $\pm$ 4.54	0.067	
	6	68.30 $\pm$ 1.63*	5.500	4.303	81.90 $\pm$ 3.99	0.063	
	C	82.85 $\pm$ 2.09			81.55 $\pm$ 2.58		

Treatment: acid / *Traitement : acide*. C: Control / *Témoin*. t cal: t calculated / *t calculé*. SE: Standard error / *Ecart type*.* Significant / *Significatif*.

Table III. Effect of aestivation period for 20 days on preservation of bivoltine silkworm eggs at low temperature for different durations on the hatching performance.

Tableau III. Effet de l'estivation pendant 20 jours des oeufs de vers à soie et de la durée de conservation à basse température sur la performance d'éclosion.

Duration at 5 °C (days)	Treatment (minutes)	Mean ± SE	t cal	t table	Mean ± SE	t cal	t table
<i>Durée de conservation à 5 °C (jours)</i>	<i>Traitement (minutes)</i>	<i>Moyenne ± SE</i>	<i>t cal</i>	<i>Tableau t</i>	<i>Moyenne ± SE</i>	<i>t cal</i>	<i>Tableau t</i>
Race: NB7 × NB18							
50	3	58.50 ± 4.71	0.692	2.776	84.55 ± 2.55	2.174	2.571
	4	47.16 ± 17.25	0.200	3.182	85.30 ± 2.79	2.062	2.776
	5	55.83 ± 11.72	0.226	3.182	83.37 ± 0.67	2.364	2.571
	C	0.52 ± 10.11			75.26 ± 3.99		
60	3	86.16 ± 3.79	0.775		87.66 ± 0.83	1.555	
	4	85.83 ± 2.56	0.770	2.776	86.20 ± 2.18	1.284	2.776
	5	83.30 ± 5.46	0.487		85.63 ± 3.49	1.125	
	C	77.63 ± 10.28			77.06 ± 6.76		
70	3	83.80 ± 5.32	1.538	2.571	91.13 ± 0.67	1.543	
	4	86.82 ± 3.36	2.391	2.447	88.96 ± 1.24	1.271	2.776
	5	81.30 ± 3.60	1.398	2.447	86.00 ± 2.47	0.887	
	C	73.77 ± 6.12			78.36 ± 8.24		
80	3	86.22 ± 2.73	0.485		94.73 ± 0.54	1.308	
	4	84.15 ± 2.11	0.317	2.571	89.56 ± 1.59	0.790	2.776
	5	84.15 ± 3.07	0.183		90.00 ± 4.40	0.510	
	C	82.83 ± 7.40			91.73 ± 2.23		
90	3	92.50 ± 1.27	2.150	2.571	93.53 ± 1.40	0.506	2.776
	4	92.15 ± 1.04	2.800	2.571	94.76 ± 0.56	1.076	2.776
	5	93.50 ± 1.20	1.790	2.776	92.25 ± 1.45	0.044	2.571
	C	95.96 ± 0.71			92.13 ± 2.38		
100	3	92.25 ± 1.16	0.823	2.571	93.60 ± 1.28	0.093	
	4	90.85 ± 0.69	0.262	2.571	93.07 ± 2.51	0.150	2.447
	5	91.90 ± 2.06	0.516	2.776	93.40 ± 2.39	0.030	
	C	90.30 ± 0.00			93.47 ± 0.39		
110	3	95.02 ± 1.03	0.089	2.306	93.75 ± 1.52	1.000	
	4	94.15 ± 1.20	0.500	2.365	94.10 ± 0.51	1.140	2.447
	5	95.70 ± 0.77	0.668	2.306	95.37 ± 0.91	0.080	
	C	94.90 ± 0.91			95.48 ± 0.83		

Continued overleaf / Suite page suivante

Table III (continued) / *Tableau III (suite).*

Duration at 5 °C (days)	Treatment (minutes)	Mean ± SE	t cal	t table	Mean ± SE	t cal	t table
<i>Durée de conservation à 5 °C (jours)</i>	<i>Traitement (minutes)</i>	<i>Moyenne ± SE</i>	<i>t cal</i>	<i>Tableau t</i>	<i>Moyenne ± SE</i>	<i>t cal</i>	<i>Tableau t</i>
Race: NB ₇ × NB ₁₈				Race: KA × NB ₄ D ₂			
120	3	96.10 ± 0.28	1.670	2.306	92.27 ± 1.58	0.109	2.447
	4	93.20 ± 1.25*	2.890		94.92 ± 1.31	1.141	
	5	95.36 ± 0.89	1.720		91.15 ± 2.00	0.270	
	C	97.20 ± 0.59			91.97 ± 2.23		
130	3	91.88 ± 1.12*	2.970	2.306	94.82 ± 0.96	1.185	2.447
	4	92.50 ± 1.57	2.040	2.447	93.37 ± 2.05	0.297	
	5	94.22 ± 1.84	0.760	2.365	92.80 ± 2.19	0.075	
	C	95.52 ± 0.48			92.60 ± 1.61		
140	3	92.56 ± 2.04	1.410	2.306	92.90 ± 1.99	0.810	2.447
	4	91.90 ± 1.36	2.030	2.306	93.25 ± 1.36	0.830	
	5	92.52 ± 1.83	1.510	2.365	93.17 ± 0.98	0.990	
	C	96.40 ± 1.71			94.87 ± 1.40		
150	3	90.59 ± 1.40	0.221	2.365	91.62 ± 2.05	1.670	2.447
	4	93.92 ± 1.62	1.701	2.365	93.34 ± 1.75	0.920	2.365
	5	92.45 ± 1.79	1.010	2.447	89.10 ± 3.38	1.780	2.447
	C	90.15 ± 1.41			95.25 ± 0.67		
160	3	89.97 ± 2.09	1.190	2.447	94.13 ± 2.11	0.356	2.776
	4	92.40 ± 3.07	0.290	2.776	89.00 ± 1.43	1.980	
	5	92.60 ± 1.65	0.300	2.776	94.63 ± 0.95	0.787	
	C	93.43 ± 2.01			93.20 ± 1.55		
170	3	88.66 ± 3.55	1.628	2.776	79.40 ± 11.95	0.200	4.303
	4	86.46 ± 3.44	1.344		83.40 ± 4.60	0.092	
	5	86.30 ± 1.73	1.442		72.05 ± 11.49	0.700	
	C	76.43 ± 6.62			82.50 ± 9.16		
180	3	83.96 ± 5.85	0.450	2.776	83.96 ± 5.85	0.450	2.776
	4	74.48 ± 10.61	1.090		74.48 ± 10.61	1.090	
	5	84.83 ± 5.86	0.340		84.83 ± 5.85	0.340	
	C	87.53 ± 5.36			87.57 ± 5.39		

Treatment: acid / *Traitement : acide*. C: Control / *Témoin*. t cal: t calculated / *t calculé*. SE: Standard error / *Ecart type*.* Significant / *Significatif*.

Table IV. Effect of aestivation period for 20 days on preservation of bivoltine silkworm eggs at low temperature for different durations on the hatching performance.

Tableau IV. Effet de l'estivation pendant 20 jours des oeufs de vers à soie et de la durée de conservation à basse température sur la performance d'éclosion.

Duration at 5 °C (days)	Treatment (minutes)	Mean ± SE	t cal	t table	Mean ± SE	t cal	t table
<i>Durée de conservation à 5 °C (jours)</i>	<i>Traitement (minutes)</i>	<i>Moyenne ± SE</i>	<i>t cal</i>	<i>Tableau t</i>	<i>Moyenne ± SE</i>	<i>t cal</i>	<i>Tableau t</i>
Race: NB ₁₈ × NB ₇				Race: NB ₄ D ₂ × KA			
50	4	62.43 ± 4.27	0.187	3.182	38.90 ± 0.85	0.000	
	5	60.87 ± 9.23	0.040		30.85 ± 10.64	0.000	
	6	64.76 ± 11.97	0.217		63.75 ± 15.45	0.000	
	C	61.40 ± 0.07			0.00 ± 0.00		
60	4	90.60 ± 1.74	1.718	2.571	81.18 ± 3.37	1.319	2.365
	5	86.15 ± 2.29	0.799		74.62 ± 6.06	0.307	2.447
	6	92.85 ± 3.06	1.779		80.50 ± 5.05	1.024	2.447
	C	81.33 ± 5.58			71.82 ± 6.80		
70	4	81.33 ± 1.66	1.250	2.776	62.90 ± 3.34	4.140	2.571
	5	85.37 ± 1.83	0.385	2.571	66.06 ± 5.45	2.540	2.447
	6	83.07 ± 1.96	0.470	2.571	62.76 ± 5.49	3.080	2.447
	C	84.36 ± 1.75			81.20 ± 2.35		
80	4	86.37 ± 1.58	1.871	2.571	91.56 ± 1.17	0.886	2.776
	5	85.22 ± 1.99	1.200		88.73 ± 2.01	0.380	
	6	85.57 ± 0.45	2.306		87.80 ± 0.98	0.980	
	C	81.86 ± 1.81			89.73 ± 1.70		
90	4	94.60 ± 0.81	0.580	2.447	90.33 ± 2.15	1.143	2.776
	5	93.50 ± 1.54	1.010	2.447	92.50 ± 2.30	2.002	
	6	90.30 ± 2.33	1.020	2.571	90.63 ± 0.76	3.301	
	C	95.32 ± 0.94			87.83 ± 0.38		
100	4	91.56 ± 1.81	0.450	2.776	87.46 ± 3.55	1.750	2.776
	5	91.69 ± 1.22	0.450		86.63 ± 0.61	3.640	
	6	93.26 ± 2.03	0.008		95.33 ± 1.17	0.246	
	C	93.23 ± 1.47			94.73 ± 2.14		
110	4	95.86 ± 0.40	1.662	2.447	93.40 ± 2.15	0.930	2.571
	5	91.16 ± 2.13	1.240		93.32 ± 0.66	1.760	2.447
	6	91.90 ± 1.22	1.130		92.32 ± 1.46	1.650	2.365
	C	93.68 ± 0.96			95.40 ± 0.98		

Continued overleaf / Suite page suivante

Table IV (continued) / *Tableau IV (suite)*.

Duration at 5 °C (days)	Treatment (minutes)	Mean ± SE	t cal	t table	Mean ± SE	t cal	t table
<i>Durée de conservation à 5 °C (jours)</i>	<i>Traitement (minutes)</i>	<i>Moyenne ± SE</i>	<i>t cal</i>	<i>Tableau t</i>	<i>Moyenne ± SE</i>	<i>t cal</i>	<i>Tableau t</i>
Race: NB ₁₈ × NB ₇				Race: NB ₄ D ₂ × KA			
120	4	93.86 ± 1.33	0.830	2.571	92.27 ± 1.37	2.090	2.447
	5	94.57 ± 0.74	0.540	2.447	94.73 ± 1.87	0.310	2.571
	6	92.76 ± 1.84	1.250	2.571	92.93 ± 1.42	1.830	2.571
	C	95.30 ± 1.11			95.25 ± 0.36		
130	4	92.12 ± 0.64*	2.730	2.365	92.30 ± 1.71	1.610	2.571
	5	92.44 ± 1.14	1.870	2.306	92.07 ± 1.29	1.970	2.447
	6	93.85 ± 1.08	0.910	2.365	91.50 ± 0.65*	3.320	2.571
	C	95.06 ± 0.81			95.05 ± 0.78		
140	4	94.66 ± 1.47	0.120	2.365	94.76 ± 2.26	0.750	2.571
	5	92.10 ± 0.68	3.810	2.571	93.37 ± 0.59*	3.540	2.571
	6	92.70 ± 2.33	1.080	2.571	89.00 ± 3.31	2.550	2.776
	C	94.87 ± 0.38			96.27 ± 0.56		
150	4	89.63 ± 0.38	0.720	2.571	91.87 ± 1.99	0.546	2.571
	5	88.15 ± 1.77	1.190	2.447	91.80 ± 1.41	0.700	2.571
	6	82.95 ± 7.38	1.040	2.447	88.93 ± 3.77	0.410	2.776
	C	90.75 ± 1.27			90.53 ± 0.83		
160	4	87.72 ± 2.95	0.490	2.571	91.85 ± 1.33	0.890	2.571
	5	87.93 ± 3.11	0.470	2.776	90.07 ± 3.56	0.820	2.571
	6	90.90 ± 1.37	0.676	2.776	90.46 ± 2.62	1.050	2.776
	C	89.56 ± 1.42			93.76 ± 1.73		
170	4	85.95 ± 3.64	0.650		91.56 ± 1.42	0.338	
	5	92.55 ± 0.60	1.452	2.365	91.36 ± 2.91*	0.232	2.776
	6	88.52 ± 1.04	0.040		95.96 ± 2.32	3.510	
	C	88.66 ± 2.32			90.33 ± 3.36		
180	4	86.31 ± 4.12	2.118	3.182	85.98 ± 0.31	0.104	
	5	84.39 ± 2.98	2.350	4.303	76.83 ± 5.69	0.860	2.776
	6	72.60 ± 5.94	0.160	3.182	77.46 ± 4.79	0.870	2.182
	C	73.89 ± 3.23			85.30 ± 8.77		

Treatment: acid / *Traitement : acide*, C: Control / *Témoin*, t cal: t calculated / *t calculé*, SE: Standard error / *Ecart type*.* Significant / *Significatif*.

This schedule can be adopted at the basic seed multiplication level and commercial silkworm egg production centres. There is no significant variation between the acid-treated batches and the control and also among the treated batches for different durations of 3 to 6 minutes. Acid treatment of hibernated eggs will only help in improving the hatching percentage of eggs in the event these are to be released before 80 days of preservation at 5 °C. The duration taken for hatching from 115 to 140 days of release is 11 to 12 days and with a further increase in the preservation period from 150 to 215 days the duration taken for hatching is 9 to 10 days.

The results of the present experiment indicate that the bivoltine silkworm eggs of either pure races or hybrids can be programmed to hatch any time between 115 and 215 days, this procedure can be adopted for the tropical conditions. However, the schedule for tropical conditions (Narasimhanna, 1988) available in the literature is only for six months. All the schedules available (Tazima, 1978; Aizawa *et al.*, 1972) have been worked out for the temperate countries. This information is the first of its kind which has been worked out for programming the brushing of bivoltine silkworm eggs from three to seven months.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr S B. Dandin, Director, and Dr Raghuraman, Divisional Chief, for their encouragement, Mr Anatharaman for statistical analysis of the data, Mr S. Veereshy, Mr Mallesha Murthy and Mr N.P. Nataraj Murthy for technical assistance in carrying out this project.

REFERENCES

- AIZAWA C., SEKIDO I., YAMAKAWA K., SAKURAI V., KURATA W., YAGINUMA Y., TOKORO Y. (1972) Handbook of Silkworm Rearing Techniques. Fuji Pub. Co., Japan.
- DENLINGER D.L. (1985) Hormonal control of diapause. *In* Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Ed. by G.A. Kerkut and L.I. Gilbert, vol. 8, pp. 353-412.
- HARVEY W.R. (1962) Metabolic aspects of insect diapause. *Ann. Rev. Ent.*, 7, 57-80.
- LEES A.D. (1955) Physiology of Diapause in Arthropods. Cambridge Univ. Press.
- MANJULA A., HURKADLI H.K. (1995) Short-term and ordinary chilling schedule for bivoltine pure and hybrid silkworm eggs for tropical countries. *Indian Textile J.*, 11, 70-74
- NARASIMHANNA M.N. (1988) Manual on Silkworm Egg Production. Pub. by Central Silk Board, India, p. 140.
- TAZIMA Y. (1978) Silkworm Egg. Pub. by Central Silk Board, India.
- WANG S.-M. (1983) Silkworm egg production. *FAO Agricultural Services Bulletin*, 73/3, Rome.
- YAMASHITA O., HASEGAWA K. (1985) Embryonic diapause. *In* Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Ed. by G.A. Kerkut and L.I. Gilbert, vol. 1, pp. 407-434.
- YAMASHITA O., YAGINUMA T., KOBAYASHI M., FURUSAWA T. (1988) Metabolic shift related with embryonic diapause of *Bombyx mori*: Temperature directed sorbitol metabolism. *In* Endocrinological Frontiers in Physiological Insect Ecology. Ed. by F. Senhal, A. Zebza and Denlinger worclaw, pp. 264-275.

ETUDE D'UN CALENDRIER D'HIBERNATION POUR LES OEUFS DE VERS A SOIE BIVOLTINS PURS ET HYBRIDES (*BOMBYX MORI*) (LEPIDOPTERA : BOMBYCIDAE) APRES ESTIVATION PENDANT VINGT JOURS EN MILIEU TROPICAL

A. MANJULA* & H.K. HURKADLI

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

On a utilisé des oeufs de vers à soie de races pures bivoltines et leurs hybrides (bivoltins × bivoltins) pour cette étude. Après une période d'estivation de 20 jours à 24 ± 1 °C et 75 ± 5 % d'humidité relative, les oeufs ont été stockés au froid à 5 °C pendant différentes durées allant de 50 à 200 jours, on les a ensuite sortis du froid à intervalles de 10 jours. Le calendrier de conservation des oeufs bivoltins a été étudié pour permettre de programmer la sortie des pontes à n'importe quel moment entre trois et sept mois en milieu tropical.

INTRODUCTION

Les vers à soie bivoltins ont deux générations par an en milieu tempéré. Le papillon pond des oeufs diapausants ou non diapausants suivant les conditions environnementales telles que la température, l'humidité relative et la photopériode au cours des différents stades du développement. La diapause de l'insecte est une adaptation lui permettant de survivre dans des environnements défavorables : l'insecte entre dans un état de dormance caractérisé par une baisse de certaines activités physiologiques comme la respiration et le métabolisme (Lees, 1955 ; Wang, 1983). La diapause correspond à un arrêt programmé du développement qui peut survenir au cours de la vie de l'insecte ; cet état est associé avec l'adaptation physiologique qui permet à l'embryon de tolérer des températures très basses en hiver (Yamashita et coll., 1988), les caractères génétiques et leur expression sont modulés par les stimuli environnementaux (Denlinger, 1985 ; Yamashita et Hasegawa, 1985).

L'introduction de bivoltins comme parents mâles a ouvert de nouvelles possibilités car, contrairement à ce qui est pratiqué dans les pays tempérés, les bivoltins sont utilisés tout au long de l'année en milieu tropical, d'où la nécessité d'éviter l'entrée en diapause. A l'échelle commerciale, ceci se fait par traitement des oeufs à l'acide. En milieu tropical, l'élevage des larves de vers à soie bivoltins ne peut être réalisé si les conditions sont défavorables. Les oeufs doivent être préparés pendant la saison favorable (septembre à mars) ; en les programmant soit par réfrigération (Manjula et Hurkadli, 1995), soit par hibernation, il est possible de les faire éclore à l'époque de l'année voulue. Cette étude a donc été entreprise afin de (1) déterminer la durée de conservation appropriée à 23-25 °C, (2) déterminer la période de conservation à 5 °C pour l'utilisation des oeufs bivoltins mis en hibernation artificielle et (3) préparer un calendrier pour des mises en hibernation de trois à sept mois après conservation des oeufs pendant 20 jours permettant d'obtenir un taux d'éclosion supérieur à 90 % en milieu tropical.

MATERIELS ET METHODES

Des cocons de races pures bivoltines ont été prélevés au *Seed Technology Laboratory* ; ils ont été traités puis conservés à une température de 24 ± 1 °C, une humidité relative de 75 ± 5 % et en alternance jour/nuit de 16 heures/8 heures pour la préparation des oeufs de races pures (NB7. KA,

* Adresse : Silkworm Seed Technology Laboratory, Central Silk Board, Kodathi, Bangalore 560 035, Inde.

NB₄D₂ et NB₁₈) et hybrides (NB₇ × NB₁₈, KA × NB₄D₂, NB₁₈ × NB₇ et NB₄D₂ × KA). Les papillons mâles et femelles sortis d'émersion ont été accouplés pendant trois heures et demie. Après l'accouplement, les papillons femelles ont été mis à pondre dans une semi-obscurité. Les pontes de vers à soie saines ont été soumises à une période d'estivation de 20 jours à une température de 24 ± 1 °C, une humidité relative de 75 ± 5 % et une alternance jour/nuît de 16 heures/8 heures. Le protocole d'estivation et d'hibernation suivi est le suivant :

Température (°C)	24	20	15	10	05	15	20	24
Durée (jours)	20	03	03	03	50-200	03	01	*

* Incubation

On a sorti les pontes stockées au froid à 5 °C à partir du 50^e jour à intervalles de 10 jours jusqu'au 200^e jour. Les pontes ont ensuite été soumises au traitement à l'acide à une température de 46,1 °C et une gravité spécifique de 1,075 à 15 °C. Les pontes des races à cocons ovales et leurs hybrides ont été réparties en quatre lots de 5 pontes et traitées à l'acide pendant 3, 4 et 5 minutes. Les pontes des races pures à cocons cintrés et leurs hybrides, après leur sortie du froid, ont été réparties en quatre lots et trois lots ont été traités à l'acide pendant 4, 5 et 6 minutes : le quatrième lot de ponte a été mis en incubation sans traitement à l'acide et a servi de témoin.

Toutes les pontes obtenues ont été incubées à une température de 24 ± 1 °C, une humidité relative de 75 ± 5 % et une alternance jour/nuît de 16 heures/8 heures. Ces pontes ont été mises dans des boîtes noires au stade de pigmentation de la tête de l'embryon puis exposées à la lumière le deuxième jour. Les oeufs éclos, non éclos, fécondés et morts ont été comptés afin de déterminer le pourcentage d'éclosion. L'expérience a été répétée cinq fois et élargie aux pontes de masse afin d'observer la performance d'éclosion. Les résultats ont été soumis à analyse statistique, selon le test *t*.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'effet de l'estivation pendant 20 jours sur les oeufs de vers à soie bivoltins et des différentes durées de conservation (50 à 170 jours) à basse température est présenté dans les tableaux I et II pour les races pures et dans les tableaux III et IV pour les hybrides. Les résultats indiquent que le taux d'éclosion est supérieur à 90 % pour les pontes conservées à 5 °C sur des durées de 70 à 170 jours ; les informations concernant la durée la plus fiable et le calendrier à suivre sont décrites ci-dessous :

Calendrier d'hibernation pour les oeufs de vers à soie bivoltins

Race / Température (°C)	Durée en jours							
	24	20	15	10	5	15	20	24
NB ₇	20	03	03	03	70-150	03	01	*
KA	20	03	03	03	90-170	03	01	*
NB ₁₈	20	03	03	03	90-160	03	01	*
NB ₄ D ₂	20	03	03	03	90-150	03	01	*
NB ₇ × NB ₁₈	20	03	03	03	100-170	03	01	*
KA × NB ₄ D ₂	20	03	03	03	80-160	03	01	*
NB ₁₈ × NB ₇	20	03	03	03	90-160	03	01	*
NB ₄ D ₂ × KA	20	03	03	03	100-160	03	01	*

* Incubation

Ce calendrier peut également être adopté pour le grainage de base et dans les centres de grainage commerciaux. Il n'y a pas de variation significative entre les lots traités à l'acide et le témoin ou entre les différents lots traités sur des durées de 3 à 6 minutes. Le traitement à l'acide des oeufs mis en hibernation permet simplement d'améliorer le taux d'éclosion des oeufs lorsqu'ils doivent être utilisés avant 80 jours de conservation à 5 °C. Le délai nécessaire pour l'éclosion des oeufs utilisés après une période de 115 à 140 jours est de 11 à 12 jours ; pour une durée de conservation supérieure, entre 150 et 215 jours, le délai d'éclosion est de 9 à 10 jours.

Les résultats de cette expérience indiquent que l'éclosion des oeufs de vers à soie bivoltins, qu'il s'agisse de races pures ou d'hybrides, peut être programmer à n'importe quel moment entre 115 et 215 jours ; ce protocole peut être adopté en milieu tropical. Cependant, d'après la documentation, le calendrier de conservation en milieu tropical est de six mois seulement (Narasimhanna, 1988). Tous les calendriers disponibles concernent uniquement les pays tempérés (Tazima, 1978 ; Aizawa et coll., 1972). Les résultats décrits ici sont les premiers à présenter un calendrier permettant de programmer la levée des oeufs de vers à soie bivoltins après trois à sept mois de conservation.

STUDIES ON THE CATALASE ACTIVITY IN THE HAEMOLYMPH OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

WU X.-f.¹, LOU C.-f.¹, XU J.-l.¹, MIAO Y.-g.¹ & CUI W.-z.²

1. Department of Sericulture, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029, China.

2. Department of Sericulture, Shandong Agricultural University, Taian 272018, China.

The catalase activity in the haemolymph of the silkworm was analysed at different developmental stages and it was found that there was a dynamic change. The catalase activity of the male was much higher than that of the female. Diet also affected the activity of catalase. There was a great variation of the catalase activity among silkworm races. The results showed that the catalase activity was closely related to the larval health. The catalase activity in the larvae poisoned by fluoride rose while the degree of rise varied with silkworm races. The change of catalase activity was suggested to be taken as one of the physiological indices for anti-fluoride race breeding.

Keywords: Catalase activity, haemolymph, silkworm, *Bombyx mori* L.

INTRODUCTION

In the life activity of an insect, especially under adverse conditions, it will produce some hydrogen peroxide, which is poisonous to the body. Catalase can dissimilate it into water and oxygen rapidly, so as to maintain the normal physiological activities. Therefore, catalase is generally considered as one of the important protective enzymes. It has been reported that the catalase activity of healthy silkworm larvae is higher than that of diseased ones (Wu, 1970), and the catalase activity is supposed to be related to the health of silkworms. Cheng (1987) found that the catalase activity in the haemolymph of larvae poisoned by fluoride rose greatly compared with the control group. This result reveals that the rise of this enzyme activity is a reaction to fluoride and catalase in the haemolymph may be an important defensive enzyme which is related to the silkworm's resistance to adverse conditions.

In this connection, it is very necessary to make a systematic study on catalase in the silkworm. Our research work mainly focused on making clear the dynamic change of catalase activity at different developmental stages, factors (diet, sex) affecting the catalase activity, and differences among silkworm races, as well as the change of catalase activity when larvae are poisoned by fluoride. By these studies, the relationship between the catalase activity and the larval resistance could be expected to be further elucidated. It could also provide a theoretical basis for the silkworm body defence mechanism and resistant silkworm race breeding.

MATERIALS AND METHODS

1. Silkworm races:

Five bivoltine silkworm races, including two parental races, FC and CX, and three hybrids, FC × CX, QS × HY (for spring crop) and ZN × SS (for summer-autumn crop), were selected for the study.

2. Silkworm rearing method:

Both mulberry leaves and artificial diet were utilised and rearing was conducted under normal conditions.

3. Test of fluoride poisoning:

According to the method of Cheng (1987), fifth instar larvae (including newly moulted larvae) were administered daily a fluoride (NaF) solution whose concentration was 50 ppm. Clear water administration was taken as control group.

4. Collection of blood:

As it is difficult to collect blood from young larvae, blood was collected from 4th instar daily from the caudal horn.

5. Treatment of blood samples:

A little amount of phenyl thiourea was added in an Eppendorf tube before collection of the blood. The haemolymph sample was centrifuged at 4,000 rpm for 10 minutes in order to remove the haemocytes and fat body before estimation of the catalase activity.

6. Estimation of catalase activity:

The method by Beers and Sizars (1952) was adopted. The enzyme activity was calculated according to the following formula:

$$\frac{\Delta E_{240} \times 3}{0.0436 \times E_v} \times T_D = U/ml$$

ΔE_{240} : reduced absorbance value under 240 nm within one minute

E_v : volume of enzyme (blood sample)

T_D : times of sample dilution

0.0436: absorbance value of 1 μ mol of hydrogen peroxide under 240 nm

3: total volume of reaction solution

Definition: 1 unit of enzyme is equal to the enzyme amount that can dissimilate 1 μ mol of hydrogen peroxide at 25 °C, pH 7.0.

RESULTS

1. Dynamic change of catalase activity at different developmental stages:

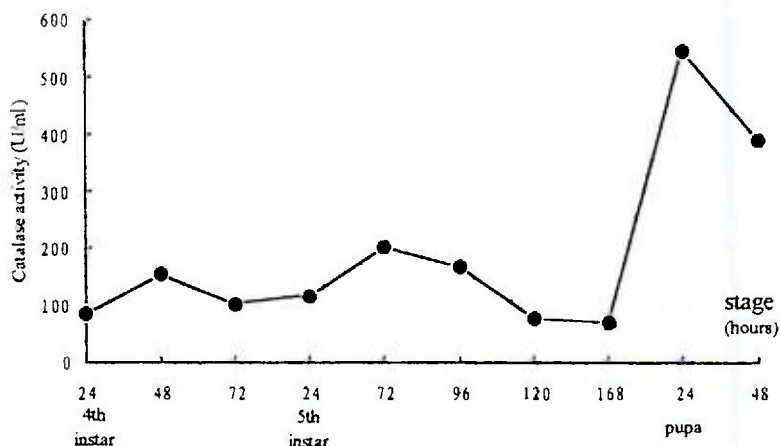
The catalase activity varied greatly with the developmental stage (Fig. 1). It was much higher at the earlier pupal stage than at the larval stage, although it declined gradually afterwards. During the

Fig. 1: Change of catalase activity at different developmental stages.

Silkworm race FC $\times$ CX fed on artificial diet. All data are average values of the females and males.

Fig. 1 : Variation de l'activité catalase à différents stades du développement.

Race de ver à soie FC $\times$ CX nourrie sur aliment artificiel. Les données correspondent aux valeurs moyennes des femelles et des mâles.



larval stage, the catalase activity in the fifth instar was higher than in the fourth instar. In the fifth instar, it increased gradually during the earlier stage, then reached the highest (202.98 U/ml) at 72 hours, afterwards the catalase activity declined until the larvae matured. These results showed that the catalase activity was closely related to the life activity, as well as metabolism. It is known that, in the period 72-96 hours in the fifth instar, which is the gluttonous stage, the body metabolism is most active. At the early pupal stage, considerable histolysis occurs, during which more hydrogen peroxide will be produced. Therefore, the more active the body metabolism, the higher the catalase activity.

2. Variation of catalase activity between the female and male larvae:

There was a great gap of catalase activity between the female and male silkworms (Table I). The catalase activity of the male was much higher than that of the female in larval or pupal stage, especially at 96 hours in the fifth instar.

Table I. Comparison of catalase activity (U/ml) between the female and the male larvae.

Tableau I. Comparaison de l'activité catalase (U/ml) entre les larves femelles et mâles.

Stage Stade	Females Femelles	Males Mâles
5th instar / 5e âge		
48 hr / 48 h	112.94 ± 2.90	208.24 ± 3.29
96 hr / 96 h	86.01 ± 2.13	251.15 ± 4.32
120 hr / 120 h	51.34 ± 1.14	110.72 ± 2.87
Pupae / Chrysalides		
24 hr / 24 h	344.04 ± 4.88	750.33 ± 7.24

Silkworm race FC × CX fed on artificial diet / Race FC × CX nourrie sur aliment artificiel.

3. Catalase activity in silkworms fed on mulberry leaves and artificial diets, respectively:

The difference of catalase activity in silkworms fed on mulberry leaves and artificial diet is given in Figure 2. The catalase activity in the group fed on mulberry leaves was generally higher than that of the group fed on artificial diet whether at earlier, middle or later stage.

4. Catalase activity among silkworm races:

Five silkworm races were selected in this test, among which two were parent races and the other three were hybrids for commercial use. From the results (Table II), it can be seen that there was a trend that the catalase activity of hybrids was generally higher than that of the parent races, while the catalase activity of the summer-autumn race was higher than that of the spring one. Even in the parent races, there was variation

5. Change of catalase activity in the larvae poisoned by fluoride:

Two silkworm races whose resistance was different were selected in this test. The catalase activity of both races increased after administration of the fluoride solution (Fig. 3). However, a significant variation was observed between the two races. In the spring race, QS × HY, the catalase activity rose drastically, and at 96 hours it reached the highest (750.19 U/ml), which was about 5.6 times more than the control value, thereafter it declined rapidly but it still maintained a high level, while in the summer-autumn race, ZN × SS, the catalase activity increased steadily and at 96 hours

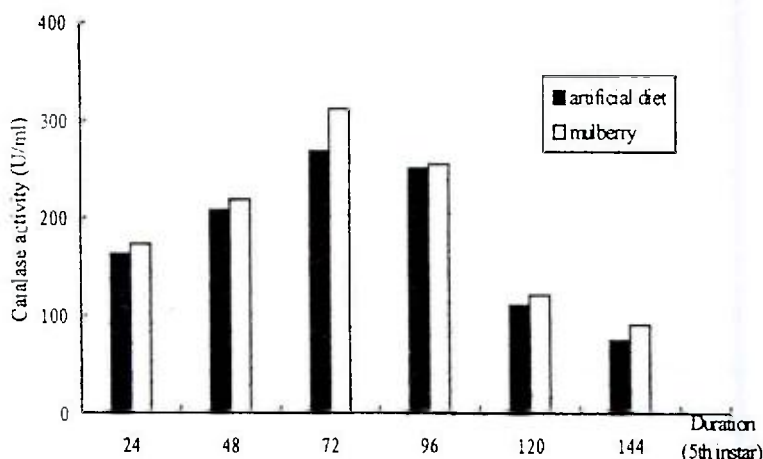
it reached the peak (330.40 U/ml) which was about twice more than the control group value. This result indicated that the susceptibility of the two races to fluoride was different. It also coincided with

Fig. 2: Catalase activity in silkworms fed on mulberry or artificial diet.

Silkworm race: FC × CX; sex: male.

Fig. 2 : Activité catalase chez les vers à soie nourris avec des feuilles de mûrier ou un aliment artificiel.

Race de ver à soie : FC × CX ; sexe : mâle.



the rearing performance, at 96 hours in the fifth instar, the typical symptoms of fluoride poisoning were observed in the race QS × HY, which presented a poor appetite, swollen intersegmental membrane, etc., while the race ZN × SS did not exhibit any obvious symptom, with very high cocoon and pupation rates.

Table II. Catalase activity (U/ml) among silkworm races.

Tableau II. Activité catalase (U/ml) chez différentes races de vers à soie.

Race	5th instar (hr) / 5e âge (h)		
	24	72	120
FC	96.48 ± 2.12	162.63 ± 2.54	57.92 ± 1.63
CX	105.27 ± 2.44	180.68 ± 2.94	66.67 ± 1.72
FC × CX	116.97 ± 2.67	202.98 ± 3.02	77.41 ± 1.84
QS × HY	105.60 ± 2.34	199.36 ± 3.24	74.92 ± 1.78
ZN × SS	124.24 ± 2.56	229.15 ± 3.79	90.27 ± 2.04

All data are the average values of the females and males. Rearing with artificial diet.

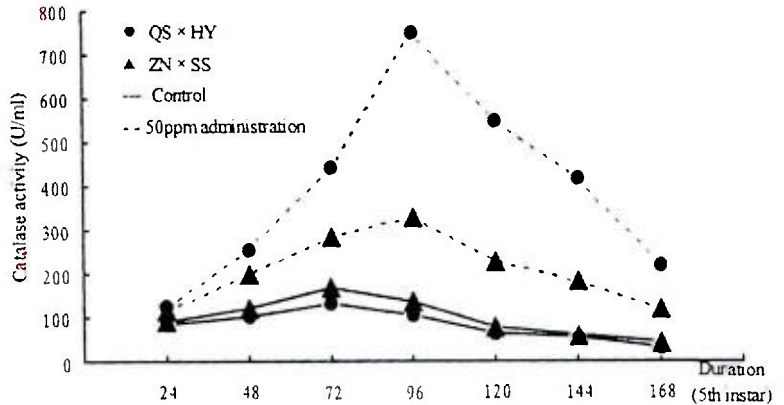
Les données correspondent aux valeurs moyennes des femelles et des mâles. Elevage sur aliment artificiel.

Fig. 3: Change of catalase activity in larvae poisoned by fluoride.

Rearing with mulberry leaves; sex: female.

Fig. 3 : Variation de l'activité catalase chez des larves intoxiquées au fluorure.

Elevage sur feuilles de mûrier ; sexe : femelle.



DISCUSSION

The study indicates that more hydrogen peroxide was produced when the body metabolism was intense or under adverse conditions, such as poisoning. As the situation of metabolism was varied, the catalase activity in the haemolymph of the silkworm presented a dynamic change at different developmental stages.

The catalase activity of the male and female larvae differed significantly. It has been shown that it is generally greater in the male than in the female. It is confirmed that there is a certain relationship between catalase activity and sex, as well as health.

It has been reported that there were some differences in physiology between silkworms fed on mulberry and artificial diets. In this test, the result that the catalase activity of larvae fed on mulberry was generally higher than that of the group fed on artificial diet confirmed that the diet could also affect the catalase activity in the haemolymph.

The present study also indicates that the catalase activity among silkworm races whose health differed exhibited significant variations, and the trend showed that the stronger the health, the higher the catalase activity, i.e., the catalase activity was closely related to the silkworm health. Further, the experiment of fluoride poisoning supported this viewpoint, and the catalase in the larval haemolymph proved to be an important defensive enzyme. The rise of the catalase activity reflected the silkworm's susceptibility and/or resistance to fluoride poisoning. The stronger the silkworm race, the less sensitive to fluoride and the smaller the degree of rise of catalase activity. In recent years, along with the development of rural industry in China, the fluoride pollution has become very serious and has caused heavy damage to cocoon production. Against this background, our scientists are trying to breed out fluoride-resistant silkworm races. By this study, we suggest that the change of catalase activity could be taken as one of the physiological indices for anti-fluoride race breeding.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to express their sincere thanks to Dr Ch. Satyanarayana Raju, Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India, for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- BEERS R.F., SIZERS I.W. (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.*, 15, S, 133.
 STELLMACH B. (1988) Measurement Method of Enzyme. Translated and Published by Press of China Light Industry.

- CHEN Z.-W. (1987) Some biochemical changes of the fluorosis silkworm, *Bombyx mori* L. Science of Sericulture, 13(3), 164-168.
- HU J.-S., WANG Y.-Q. (1991) The relationship between catalase activity in haemolymph of the silkworm and resistance. Bulletin of Sericulture, 22(3), 43-44.
- WU Z.-D. (1970) Anatomy and Physiology of the Silkworm, *Bombyx mori* L. Published by China Agricultural Press, pp. 63-79.
- YUAN B.-H., GE W.-L. (1988) Difference of proteinase activity in midgut and catalase activity in haemolymph among silkworm races. Bulletin of Sericulture and Tea Science, 2, 16-19.

L'ACTIVITE DE LA CATALASE DANS L'HEMOLYMPHE DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L.

WU X.-f.¹, LOU C.-f.¹, XU J.-l.¹, MIAO Y.-g.¹ & CUI W.-z.²

1. Department of Sericulture, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029, Chine.

2. Department of Sericulture, Shandong Agricultural University, Taian 272018, Chine.

L'analyse de l'activité catalase dans l'hémolymphe du ver à soie au cours des différents stades du développement révèle un changement dynamique. L'activité catalase chez le mâle est beaucoup plus élevée que chez la femelle. L'alimentation affecte également l'activité catalase. On observe une variation importante de l'activité catalase entre les races de vers à soie. Les résultats montrent que l'activité catalase est étroitement associée à la santé de la larve. L'activité catalase chez les larves intoxiquées par le fluor augmente mais le degré d'augmentation varie en fonction des races. On suggère d'utiliser la variation de l'activité catalase comme indice physiologique pour la sélection de races résistantes au fluorure.

INTRODUCTION

Au cours de leur vie, en particulier en milieu défavorable, les insectes produisent du peroxyde d'hydrogène qui est nocif pour le corps. La catalase permet de cataboliser rapidement cette substance en eau et en oxygène afin de préserver les activités physiologiques normales. La catalase est donc généralement considérée comme l'une des principales enzymes de protection. L'activité catalase est plus élevée chez les larves de ver à soie saines que chez les larves malades (Wu, 1970) et on suppose qu'elle est liée à la santé du ver à soie. Chen (1987) a observé que l'activité catalase dans l'hémolymphe des larves intoxiquées par le fluorure augmente fortement par rapport à celle du groupe témoin. Ce résultat montre que l'augmentation de l'activité de cette enzyme est une réaction au fluorure et qu'il est possible que la catalase de l'hémolymphe soit une enzyme de défense importante liée à la résistance du ver à soie aux conditions défavorables.

Nous avons donc jugé nécessaire de réaliser une étude systématique sur la catalase chez le ver à soie. Nos travaux sont principalement axés sur l'élucidation des modifications dynamiques de l'activité catalase en fonction des stades de développement et de certains facteurs (alimentation, sexe) affectant l'activité catalase, des races de ver à soie et l'observation des variations de l'activité catalase chez les larves intoxiquées par le fluorure. Cette étude permet de déterminer la relation entre l'activité catalase et la résistance larvaire et de fournir une base théorique sur le mécanisme de défense du corps du ver à soie et la sélection de races résistantes.

MATERIELS ET METHODES

1. Races de ver à soie :

On a sélectionné pour cette étude cinq races de ver à soie bivoltines comprenant les deux races parentales FC et CX et les trois hybrides FC × CX, QS × HY (élevage de printemps) et ZN × SS (élevage d'été/automne).

2. Méthode d'élevage des vers à soie :

On a utilisé des feuilles de mûrier ainsi que de l'aliment artificiel ; l'élevage a été réalisé selon les méthodes classiques.

3. Test d'intoxication au fluorure :

Conformément à la méthode de Chen (1987), des larves du cinquième âge (y compris les larves en sortie de mue) ont été traitées tous les jours avec une solution de fluorure (NaF) à une concentration de 50 ppm. Un lot traité à l'eau claire a été utilisé comme groupe témoin.

4. Prélèvement du sang :

Comme il est difficile de prélever du sang chez les jeunes larves, le sang a été prélevé sur la corne caudale tous les jours à partir du quatrième âge.

5. Traitement des échantillons sanguins :

Une petite quantité de phényl thiourée a été déposée dans un tube Eppendorf avant prélèvement du sang. L'échantillon d'hémolymph a été centrifugé à 4 000 tours/minute pendant 10 minutes afin d'éliminer les hémoctes et le corps adipeux avant estimation de l'activité catalase.

6. Estimation de l'activité catalase :

On a adopté la méthode de Beers et Sizors (1952). L'activité enzymatique a été calculée d'après la formule suivante :

$$\frac{\Delta E_{240} \times 3}{0.0436 \times E_v} \times T_D = U/ml$$

ΔE_{240} : valeur d'absorbance réduite à 240 nm en une minute

E_v : volume d'enzyme (échantillon sanguin)

T_D : dilutions de l'échantillon

0,0436 : valeur d'absorbance de 1 μ mol de peroxyde d'hydrogène à 240 nm

3 : volume total de mélange réactionnel

Définition : une unité d'enzyme est égale à la quantité d'enzyme pouvant cataboliser 1 μ mol de peroxyde d'hydrogène à 25 °C, pH 7,0.

RESULTATS

1. Variation dynamique de l'activité catalase à différents stades du développement :

L'activité catalase varie fortement en fonction du stade de développement (Fig. 1). Elle est beaucoup plus élevée au début du stade nymphal bien qu'elle diminue progressivement par la suite. Pour ce qui concerne le stade larvaire, l'activité catalase est beaucoup plus élevée au cinquième âge qu'au quatrième âge. Chez les larves du cinquième âge, elle augmente progressivement en début de stade puis atteint sa valeur maximale (202,98 U/ml) à 72 heures, l'activité catalase diminue ensuite jusqu'à ce que les larves deviennent matures. Ces résultats montrent que l'activité catalase est fortement liée à l'activité vitale ainsi qu'au métabolisme. On sait que le métabolisme est maximal au cinquième âge, entre la 72e et la 96e heure, qui est le stade de voracité. Au début du stade nymphal, une histolyse importante se produit, entraînant une augmentation de la sécrétion de peroxyde d'hydrogène. L'activité catalase est donc d'autant plus importante que le métabolisme est actif.

2. Variation de l'activité catalase entre les larves femelles et les larves mâles :

On observe une différence considérable de l'activité catalase entre les femelles et les mâles (Tableau I). L'activité catalase des mâles est beaucoup plus élevée que celle des femelles tant au stade larvaire qu'au stade nymphal, en particulier à la 96e heure du cinquième âge.

3. L'activité catalase chez les vers à soie nourris avec des feuilles de mûrier et des aliments artificiels :

Les variations de l'activité catalase entre les vers à soie nourris avec des feuilles de mûrier et ceux nourris avec un aliment artificiel sont présentées dans la figure 2. L'activité catalase est

généralement plus élevée chez le lot nourri avec des feuilles de mûrier que chez le lot nourri avec un aliment artificiel, que ce soit en début, en milieu ou en fin de stade.

4. Activité catalase en fonction des races :

Cinq races de vers à soie, comprenant deux races parentales et deux hybrides utilisés à l'échelle commerciale ont été sélectionnées pour ce test. Les résultats (Tableau II) révèlent que l'activité catalase tend à être plus élevée chez les hybrides que chez les races parentales et chez les races d'été/automne que chez les races de printemps. On observe également des variations chez les races parentales.

5. Variation de l'activité catalase chez les larves intoxiquées au fluorure :

Pour ce test, on a sélectionné deux races de vers à soie dont la résistance diffère. L'activité catalase chez les deux races augmente après administration de la solution de fluorure (Fig. 3). Cependant, on observe une variation significative entre les deux races. Chez la race de printemps QS × HY, l'activité catalase augmente nettement et, après 96 heures, atteint la valeur maximale de 750,19 U/ml, soit 5,6 fois plus que la valeur obtenue pour le témoin. Elle diminue ensuite rapidement mais conserve un niveau élevé. Chez la race d'été/automne ZN × SS, l'activité catalase augmente de manière régulière et, à 96 heures, atteint un pic de 330,40 U/ml, soit deux fois plus que la valeur obtenue pour le groupe témoin. Ce résultat indique que la sensibilité des deux races au fluorure est différente. Il coïncide également avec la performance d'élevage à 96 heures au cinquième âge, stade auquel on observe les symptômes caractéristiques de l'intoxication par le fluorure chez la race QS × HY, qui présente un appétit médiocre, une dilatation de la membrane intersegmentale, etc., tandis que la race ZN × SS ne manifeste aucun symptôme et donne des taux de nymphose et de filage très élevés.

DISCUSSION

Cette étude indique que le peroxyde d'hydrogène est sécrété lorsque le métabolisme est intense ou dans des conditions défavorables comme l'intoxication. Lorsque la situation métabolique change, l'activité catalase dans l'hémolymphe du ver à soie présente des variations dynamiques aux différents stades du développement.

L'activité catalase diffère de manière significative entre les larves femelles et les larves mâles. Il a déjà été démontré qu'elle était généralement plus élevée chez le mâle que chez la femelle. Cette étude confirme qu'il y a une relation entre l'activité catalase et le sexe ou la santé.

On a déjà observé des différences physiologiques entre les vers à soie nourris avec du mûrier et ceux nourris avec des aliments artificiels. Dans cette étude, le fait que l'activité catalase soit généralement plus élevée chez le lot nourri avec du mûrier confirme que l'alimentation artificielle peut également affecter l'activité catalase dans l'hémolymphe.

Cette étude indique également que l'activité catalase présente des variations significatives en fonction de la santé des larves ; nos résultats montrent que l'activité tend à être plus élevée lorsque les larves sont en bonne santé, en d'autres termes, l'activité catalase est étroitement liée à la santé des vers à soie. Les expériences sur l'intoxication par le fluorure corroborent cette hypothèse et la catalase contenue dans l'hémolymphe larvaire s'avère être une enzyme de défense importante. L'augmentation de l'activité catalase reflète la sensibilité et/ou la résistance du ver à soie à l'intoxication par le fluorure. Lorsque la race de ver à soie est vigoureuse, elle est moins sensible au fluorure et le degré d'augmentation de l'activité catalase est plus faible. Depuis quelques années, du fait du développement de l'industrie en Chine, la pollution par les fluorures atteint des proportions importantes et occasionne des dommages considérables pour la production de cocons. Dans ce contexte, nos chercheurs s'efforcent d'isoler des races de vers à soie résistantes au fluorure. Cette étude nous permet de suggérer que la variation de l'activité catalase peut servir d'indice physiologique pour la sélection de races résistantes à cette substance.

RESPONSE OF FIVE DIFFERENT RACES OF SILKWORM, *BOMBYX MORI* L. (LEPIDOPTERA: BOMBYCIDAE), TO HYDROLYSED SOY PROTEIN SUPPLEMENTATION

V. VANISREE, X. NIRMALA & M. KRISHNAN*

Department of Biotechnology, School of Life Sciences, Bharathidasan University,
Tiruchirapalli - 620 024, Tamil Nadu, India.

The comparative response to P-soyatoase supplementation was studied in four multivoltine races, i.e. Saurupet (S), Mysore Princess (MP), Hosa Mysore (HM) and Mysore-1 (M-2) and the bivoltine NB₄D₂. Mulberry leaves supplemented with selected concentrations (1.75, 2.00 and 2.25%) of P-soyatoase were fed to fifth instar larvae. SDS-PAGE showed a maximum accumulation of storage proteins at 1.75% in NB₄D₂ and at 2.00% in S, MP, HM and M-1. P-soyatoase supplementation improved the cocoon weight, pupal weight and shell weight at 1.75% in the male bivoltine and at 2.00% in almost all multivoltines. As this study reveals the differential response of different races to a single dietary protein supplementation, farmers should confirm the optimal level of dietary protein for a concerned race before venturing into nutritional supplementation.

Keywords: P-soyatoase supplementation, optimal concentration, storage protein.

INTRODUCTION

In lepidopterans, storage proteins are synthesised by the fat body during the final instar and released into the haemolymph. The accumulation of storage proteins is greatly influenced by nutritional conditions (Nagata and Kobayashi, 1990). Our earlier report (Krishnan *et al.*, 1995) highlighted the positive influence of the soy protein, P-soyatoase, (2.00% concentration) on the storage protein levels of *Bombyx mori*. Subbu Rathinam *et al.* (1996) have extended their laboratory findings to farms, where supplementation of P-soyatoase at 2.00% concentration (4 g/disease-free laying/day) increased the cocoon crop production of the crossbreed L × NB₄D₂ of *B. mori*. However, Yamamoto and Fujimaki (1982) observed that food utilisation efficiency changes markedly among silkworm strains. Hanumappa and Delvi (1989) also reported that changes in the pattern of food utilisation depend on biotic factors like breed and race of test individuals. Since several races of silkworm are reared for commercial purposes it becomes a necessity to study the comparative response of different races of silkworm to nutritional supplementation. Hence in the present study the response of five different races of the silkworm, *Bombyx mori*, to selected concentrations of P-soyatoase supplementation have been tested.

MATERIALS AND METHODS

Disease-free layings of five races of the silkworm, *Bombyx mori*, i.e., bivoltine NB₄D₂ and multivoltines Saurupet (S), Mysore Princess (MP), Hosa Mysore (HM) and Mysore-1 (M-1) were procured from the Germplasm Station, Hosur, India. Larvae that hatched out were maintained at a temperature of 25 ± 1 °C and an r.h. of 75 ± 5% and fed with finely chopped mulberry leaves (MR₂ variety) five times a day. After the fourth moult, the larvae were sexed and grouped into four batches

* To whom all correspondence should be addressed.

with 100 larvae in each batch, respectively. Of the four groups, one served as control and was fed with fresh mulberry leaves while the other three were fed with mulberry leaves supplemented with P-soyatoso. Supplementation was restricted to the first feed while the rest of the feedings consisted of fresh mulberry leaves. P-soyatoso is an enzymic digest of soy protein containing 8.8% total nitrogen. This plant protein hydrolysate is neutral in pH, soluble in water and devoid of any pathogenic organisms. Using this soyflour, protein suspensions were prepared in distilled water at previously tested concentrations of 1.75, 2.00 and 2.25% (Krishnan *et al.*, 1994). Mulberry leaves dipped in these suspensions were chopped, air-dried and fed to the experimental groups from the first day of the fifth instar.

The larval weight of the different groups was recorded from the first day of the fifth instar. The haemolymph was collected from five larvae by making a small cut in one of the abdominal legs, into tubes pre-rinsed with a phenylthiourea solution. The larvae were then dissected out on ice to collect the fat body. The samples were collected till the penultimate day of spinning. The haemolymph was centrifuged at 5000 rpm for 5 min. at 4 °C to remove the haemocytes before electrophoretic separation. The fat body was homogenised in 5 volumes of phosphate buffer (pH 7.5) using a glass Teflon homogeniser and centrifuged at 5000 rpm for 5 min. The supernatant was subjected to electrophoresis in a 10% SDS-PAGE (Laemmli, 1970) to determine the levels of storage proteins. The remaining ninety-five larvae were allowed to spin their cocoons to determine the effect of P-soyatoso on the economic characters of the silkworm races.

RESULTS

Supplementation of P-soyatoso had a bearing on the levels of storage proteins in the haemolymph, larval weight, pupal weight, cocoon weight, shell weight and larval duration. Observation of haemolymph protein profiles showed that the optimal concentration of P-soyatoso required for maximum accumulation of storage proteins varied among races. Fig. 1 reveals the maximum accumulation of storage proteins (SP 1, 82 kDa; SP 2, 76 kDa and 72 kDa) at the 1.75% concentration in the haemolymph of both sexes of NB₄D₂. In Saurupet (Fig. 1) maximum accumulation of storage proteins, when compared with the control and other supplemented groups, was at the 2.00% P-soyatoso concentration. This was true for both sexes of this race. A similar pattern was observed for MP, HM and M-1, where the maximum accumulation of storage proteins was at the 2.00% level (Fig. 1). The fat body protein profile of all the races did not show any marked change (Fig. 2). In conjunction with the accumulation of storage proteins, the optimal P-soyatoso concentration of 1.75% produced a significant increase ($P < 0.05$) in the larval weight, cocoon weight, pupal weight and shell weight in the males of NB₄D₂ (Table V). On the other hand, in S, MP, HM and M-1 the maximum weight of the larva, cocoon, pupa and shell was observed at 2.00% P-soyatoso concentration over the readings of the control (Tables I-IV). In all the five races of *B. mori*, larvae of supplemented groups reduced their larval duration by 24 hr when compared to the control. While control larvae took 7 days to complete the fifth instar larval period, the supplemented groups took only 6 days.

DISCUSSION

Protein profiles of haemolymph samples indicate a maximum accumulation of storage proteins at 1.75% in NB₄D₂ and at 2.00% level in S, MP, HM and M-1. The larvae, having derived a rich source of amino acids from P-soyatoso besides mulberry, could have increased the synthesis and subsequent accumulation of storage proteins. Such a positive influence of dietary proteins on the haemolymph proteins have also been reported by several authors (Horie *et al.*, 1971; Broadway and Duffey, 1986; Krishnan *et al.*, 1994). This finding is also in perfect agreement with the findings of Horie and Watanabe (1983) who showed that the supplementation of soybean protein increased the protein and amino acid content in the larval haemolymph of the silkworm, *B. mori*.

It is evident from Tables I-V that P-soyatoso augments the growth and economic characters of all five races of *B. mori*. Rich sources of dietary proteins like soyprotein are known to promote growth

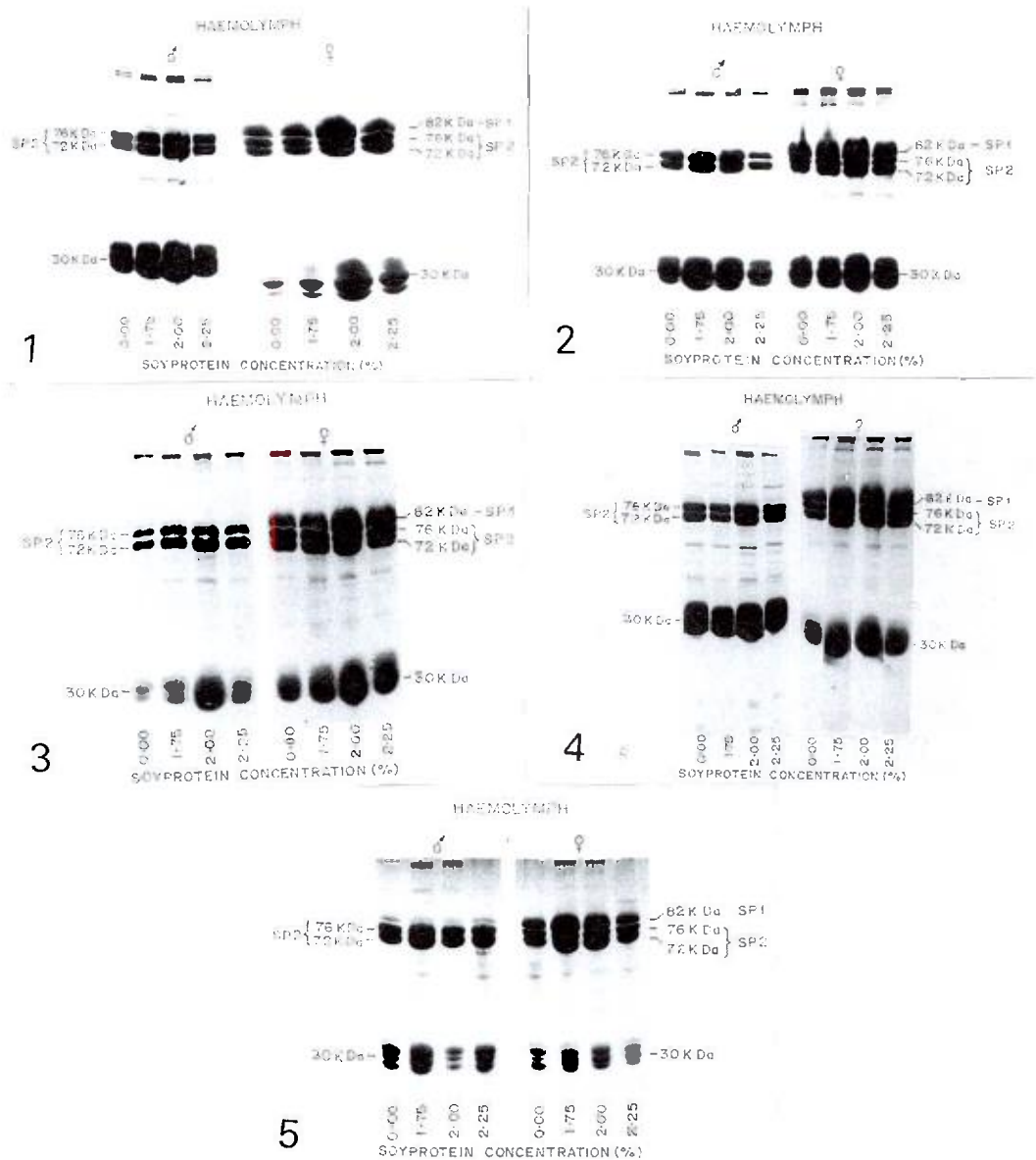


Fig. 1: SDS-PAGE (10% linear gel) of haemolymph samples collected on the fifth day of the fifth instar in control and P-soyatosé-supplemented groups of five races of the silkworm, *B. mori*.

*Fig. 1 : PAGE-SDS (gel linéaire à 10 %) d'échantillons d'hémolymph prélevés au cinquième jour du cinquième chez des groupes témoins et traités au P-soyatosé de cinq races du ver à soie *B. mori*.*

1: Saurupet. 2: Mysore Princess. 3: Hosa Mysore. 4: Mysore 1. 5: NB1D2.

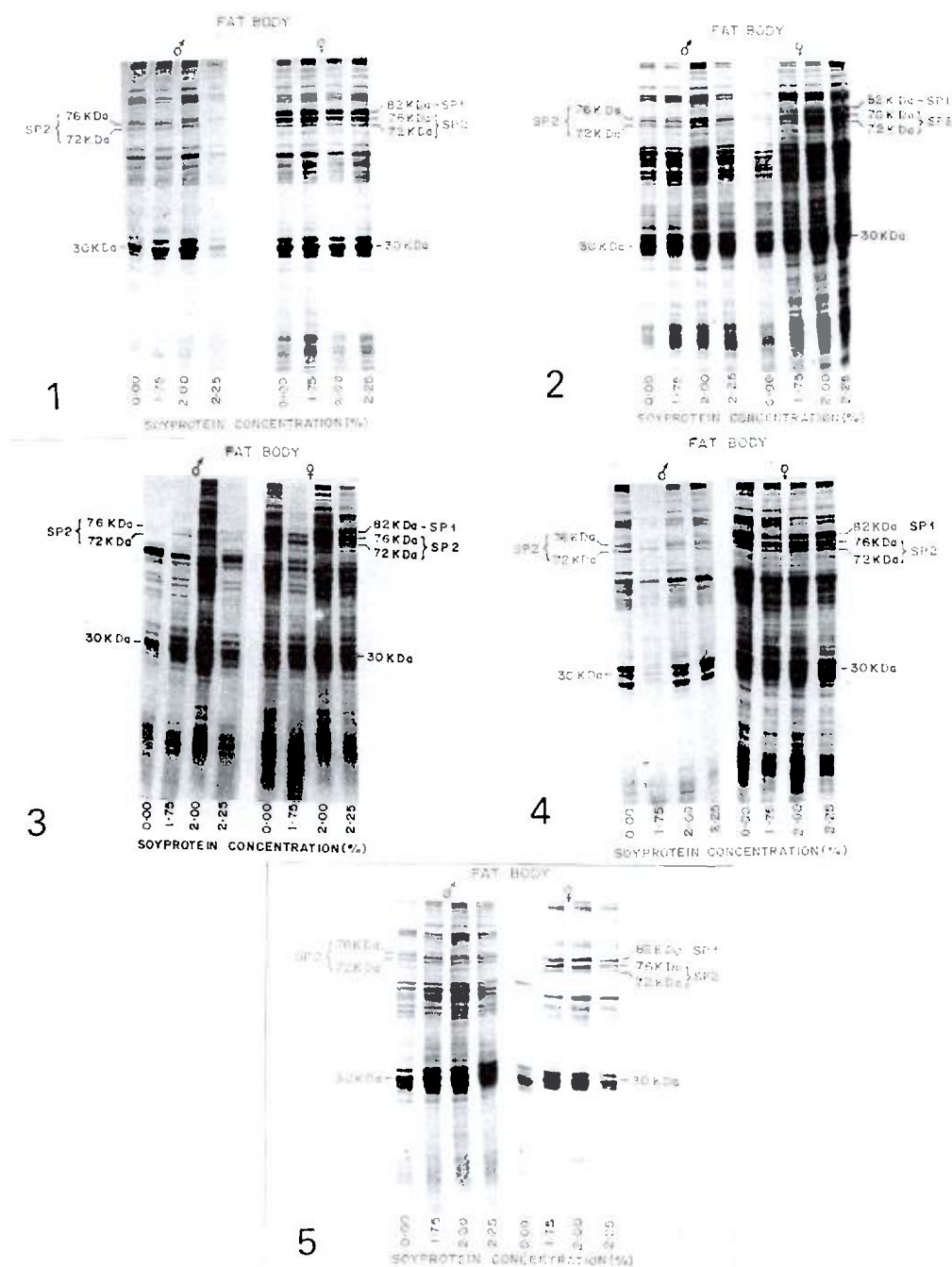


Fig. 2: SDS-PAGE (10% linear gel) of fat body samples collected from the fifth day of the fifth instar in control and P-soyatosse-supplemented groups of five races of the silkworm, *B. mori*.

Fig. 2 : PAGE-SDS (gel linéaire à 10 %) d'échantillons de corps adipeux prélevés à partir du cinquième jour du cinquième âge chez des groupes témoins et traités au P-soyatosse de cinq races du ver à soie *B. mori*.

1: Sauripet. 2: Mysore Princess. 3: Hosa Mysore. 4: Mysore 1. 5: NB4D2.

Table I. Larval duration (fifth instar), larval weight (fifth day of the fifth instar), cocoon weight, pupal weight and shell weight of Saurupet.

Tableau I. Durée larvaire (cinquième âge), poids larvaire (cinquième jour du cinquième âge), poids du cocon, poids nymphal et poids de la coque de Saurupet.

Parameters Paramètres	Sex Sexe	Control Témoin	P-soyatoze concentration (%) Concentration en P-soyatoze (%)		
			1.75	2.00	2.25
Larval duration (days)	M	7	6	6	6
Durée larvaire (jours)	F	7	6	6	6
Larval weight (g)	M	1.510 ± 0.149	1.561 ± 0.094	1.691 ± 0.125*	1.486 ± 0.123
Poids larvaire (g)	F	1.537 ± 0.243	1.590 ± 0.161	1.949 ± 0.159*	1.780 ± 0.152
Cocoon weight (g)	M	0.813 ± 0.058	0.851 ± 0.096	0.898 ± 0.069*	0.748 ± 0.063
Poids du cocon (g)	F	0.942 ± 0.111	0.882 ± 0.052	1.064 ± 0.162**	1.045 ± 0.045
Pupal weight (g)	M	0.685 ± 0.043	0.717 ± 0.081	0.755 ± 0.057**	0.620 ± 0.064
Poids nymphal (g)	F	0.830 ± 0.106	0.766 ± 0.046	0.924 ± 0.129**	0.915 ± 0.080
Shell weight (g)	M	0.128 ± 0.016	0.134 ± 0.016	0.143 ± 0.019 ^{NS}	0.128 ± 0.022
Poids de la coque (g)	F	0.112 ± 0.006	0.116 ± 0.014	0.140 ± 0.028**	0.113 ± 0.036

* Significant increase / Augmentation significative (P < 0.05). ** Significant increase / Augmentation significative (P < 0.1). NS: Not significant / Non significatif. M: Male / Mâle. F: Female / Femelle.

Table II. Larval duration (fifth instar), larval weight (fifth day of the fifth instar), cocoon weight, pupal weight and shell weight of Mysore Princess.

Tableau II. Durée larvaire (cinquième âge), poids larvaire (cinquième jour du cinquième âge), poids du cocon, poids nymphal et poids de la coque de Mysore Princess.

Parameters Paramètres	Sex Sexe	Control Témoin	P-soyatoze concentration (%) Concentration en P-soyatoze (%)		
			1.75	2.00	2.25
Larval duration (days)	M	7	6	6	6
Durée larvaire (jours)	F	7	6	6	6
Larval weight (g)	M	1.083 ± 0.305	1.744 ± 0.050	1.760 ± 0.136*	1.756 ± 0.129
Poids larvaire (g)	F	1.181 ± 0.362	1.787 ± 0.956	1.922 ± 0.424*	1.710 ± 0.145
Cocoon weight (g)	M	0.849 ± 0.064	0.852 ± 0.035	0.932 ± 0.079**	0.851 ± 0.058
Poids du cocon (g)	F	1.005 ± 0.037	1.007 ± 0.063	1.014 ± 0.028 ^{NS}	0.940 ± 0.033
Pupal weight (g)	M	0.708 ± 0.054	0.710 ± 0.028	0.755 ± 0.077 ^{NS}	0.710 ± 0.059
Poids nymphal (g)	F	0.858 ± 0.034	0.855 ± 0.012	0.860 ± 0.029 ^{NS}	0.803 ± 0.032
Shell weight (g)	M	0.141 ± 0.015	0.142 ± 0.018	0.177 ± 0.011*	0.141 ± 0.015
Poids de la coque (g)	F	0.147 ± 0.009	0.152 ± 0.007	0.154 ± 0.013 ^{NS}	0.137 ± 0.005

* Significant increase / Augmentation significative (P < 0.05). ** Significant increase / Augmentation significative (P < 0.1). NS: Not significant / Non significatif. M: Male / Mâle. F: Female / Femelle.

Table III. Larval duration (fifth instar), larval weight (fifth day of the fifth instar), cocoon weight, pupal weight and shell weight of Hosa Mysore.*Tableau III. Durée larvaire (cinquième âge), poids larvaire (cinquième jour du cinquième âge), poids du cocon, poids nymphal et poids de la coque de Hosa Mysore.*

Parameters Paramètres	Sex Sexe	Control Témoin	P-soyatosé concentration (%) Concentration en P-soyatosé (%)		
			1.75	2.00	2.25
Larval duration (days)	M	7	6	6	6
Durée larvaire (jours)	F	7	6	6	6
Larval weight (g)	M	1.649 ± 0.144	1.910 ± 0.030	1.940 ± 0.084*	1.924 ± 0.181
Poids larvaire (g)	F	1.961 ± 0.072	1.961 ± 0.283	2.247 ± 0.142*	2.015 ± 0.159
Cocoon weight (g)	M	0.828 ± 0.059	0.964 ± 0.090	1.037 ± 0.071*	1.035 ± 0.072
Poids du cocon (g)	F	1.191 ± 0.055	1.200 ± 0.095	1.336 ± 0.130*	1.213 ± 0.080
Pupal weight (g)	M	0.695 ± 0.050	0.810 ± 0.080	0.873 ± 0.053*	0.872 ± 0.086
Poids nymphal (g)	F	1.041 ± 0.063	1.048 ± 0.086	1.180 ± 0.126*	1.063 ± 0.050
Shell weight (g)	M	0.132 ± 0.011	0.158 ± 0.015	0.164 ± 0.006*	0.163 ± 0.017
Poids de la coque (g)	F	0.150 ± 0.018	0.152 ± 0.022	0.156 ± 0.004*	0.150 ± 0.002

* Significant increase / Augmentation significative ($P < 0.05$). M: Male / Mâle. F: Female / Femelle.**Table IV.** Larval duration (fifth instar), larval weight (fifth day of the fifth instar), cocoon weight, pupal weight and shell weight of Mysore-1.*Tableau IV. Durée larvaire (cinquième âge), poids larvaire (cinquième jour du cinquième âge), poids du cocon, poids nymphal et poids de la coque de Mysore-1.*

Parameters Paramètres	Sex Sexe	Control Témoin	P-soyatosé concentration (%) Concentration en P-soyatosé (%)		
			1.75	2.00	2.25
Larval duration (days)	M	7	6	6	6
Durée larvaire (jours)	F	7	6	6	6
Larval weight (g)	M	1.870 ± 0.143	1.917 ± 0.060	2.110 ± 0.163*	1.899 ± 0.172
Poids larvaire (g)	F	1.841 ± 0.059	1.706 ± 0.162	2.216 ± 0.206*	2.176 ± 0.186
Cocoon weight (g)	M	0.990 ± 0.020	1.010 ± 0.068	1.051 ± 0.069**	1.022 ± 0.061
Poids du cocon (g)	F	1.153 ± 0.092	1.162 ± 0.014	1.285 ± 0.064*	1.216 ± 0.232
Pupal weight (g)	M	0.850 ± 0.054	0.870 ± 0.045	0.904 ± 0.058**	0.880 ± 0.051
Poids nymphal (g)	F	1.019 ± 0.080	1.019 ± 0.010	1.140 ± 0.075*	1.076 ± 0.221
Shell weight (g)	M	0.140 ± 0.012	0.140 ± 0.006	0.147 ± 0.017 ^{NS}	0.142 ± 0.015
Poids de la coque (g)	F	0.134 ± 0.013	0.143 ± 0.014	0.145 ± 0.10**	0.140 ± 0.012

* Significant increase / Augmentation significative ($P < 0.05$). ** Significant increase / Augmentation significative ($P < 0.1$). NS: Not significant / Non significatif. M: Male / Mâle. F: Female / Femelle.

Table V. Larval duration (fifth instar), larval weight (fifth day of the fifth instar), cocoon weight, pupal weight and shell weight of NB₂D₄.

Tableau V. Durée larvaire (cinquième âge), poids larvaire (cinquième jour du cinquième âge), poids du cocon, poids nymphal et poids de la coque de NB₂D₄.

Parameters Paramètres	Sex Sexe	Control Témoin	P-soyatosé concentration (%) Concentration en P-soyatosé (%)		
			1.75	2.00	2.25
Larval duration (days)	M	7	6	6	6
Durée larvaire (jours)	F	7	6	6	6
Larval weight (g)	M	1.818 ± 0.080	2.469 ± 0.214*	2.147 ± 0.131	2.385 ± 0.287
Poids larvaire (g)	F	2.141 ± 0.210	2.619 ± 0.004*	2.605 ± 0.337	2.275 ± 0.452
Cocoon weight (g)	M	0.971 ± 0.064	1.298 ± 0.146*	1.276 ± 0.140	0.924 ± 0.185
Poids du cocon (g)	F	1.311 ± 0.141	1.369 ± 0.183 ^{NS}	1.349 ± 0.229	1.320 ± 0.193
Pupal weight (g)	M	0.802 ± 0.049	0.941 ± 0.099*	0.930 ± 0.090	0.762 ± 0.101
Poids nymphal (g)	F	1.153 ± 0.078	1.201 ± 0.076 ^{NS}	1.198 ± 0.140	1.170 ± 0.176
Shell weight (g)	M	0.169 ± 0.019	0.357 ± 0.041*	0.346 ± 0.039	0.162 ± 0.044
Poids de la coque (g)	F	0.158 ± 0.064	0.160 ± 0.016 ^{NS}	0.151 ± 0.049	0.150 ± 0.135

* Significant increase / Augmentation significative (P < 0.05).

NS: Not significant / Non significatif. M: Male / Mâle, F: Female / Femelle.

and to improve the economic characters of the silkworm (Ito, 1980). Supplementation with soybean protein results in better silkworm growth (Ito, 1981) as it contains all the indispensable amino acids (Reinecke, 1985).

The requirements of the optimal concentration of supplemented protein differ between the bivoltine NB₄D₂ and the other multivoltine races. This differential response could be explained in two ways:

(1) Experiments on *H. zea* and *S. exiqua* have revealed that there is a relationship between the dietary protein requirements of an insect and its growth and digestive physiology. A species that grows optimally at a relatively higher level of dietary protein produces protease at high levels. In comparison, a species that grows on a lower dietary protein produces relatively less protease (Broadway and Duffey, 1986). In the present study, all the multivoltine races showing the best results at a relatively higher concentration (2.00%) of the supplemented dietary protein might have produced protease at higher levels. On the other hand, the bivoltine NB₄D₂ showing the best results at a relatively lower concentration (1.75%) of the supplemented protein might have produced protease at lower levels. Thus as reported by Broadway and Duffey (1986), acquisition of protein is not solely dependent on the quantity of dietary protein but it is also tied up to the synthesis of protease needed to digest that protein. Each species of insect reaches its own balance between dietary protein requirements and resource expenditure for processing that protein. Thus to maintain a balance between their digestive physiology and dietary protein requirements, bivoltine and multivoltine races of silkworm take in different concentrations of the same supplemented protein.

(2) Hanumappa and Delvi (1989) have shown that the food consumption of different races of silkworm differ with bivoltine recording a high value followed by multivoltine races. According to the above revelation, NB₄D₂ being a bivoltine could have consumed comparatively larger amounts of the supplemented mulberry leaves, thus accumulating enough proteins at the lowest concentration of 1.75%. The multivoltine with a comparatively lower consumption could have accumulated enough proteins only at a higher concentration of 2.00%. This explains the differential response of different

ances to a single supplemented protein diet. A decrease in the larval duration was observed in all the supplemented groups irrespective of the race. Parallel results have also been reported in *B. mori* by Mathavan *et al.* (1984) where the supplementation was with single cell protein and recently by Krishnan *et al.* (1994) wherein the supplementation was with P-soyatox.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks are due to the Director, Germplasm Station, Hosur, India, for providing the eggs of different races of *B. mori*. Financial assistance from the Central Silk Board (M.K.) and University Grants Commission (V.V. and X.N.) is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- BROADWAY R.M., DUFFEY S.S. (1986) The effect of dietary protein on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *J. Insect Physiol.*, 32(8), 673-680.
- HANUMAPPA T.V., DELVI M.R. (1989) Effect of temperature on food utilisation in different races of the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). *Nutri. Ecol. Ins. & Env.*, 212-221.
- HORIE Y., WATANABE K., SHINOHARA E. (1971) Effect of dietary composition on growth, silk glands and components in haemolymph of the silkworm. *Acta Seric. Japan.*, 78, 44-50.
- HORIE Y., WATANABE K. (1983) Effect of various kinds of dietary protein and supplementation with limiting amino acids on growth, haemolymph components and uric acid excretion in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 29(2), 187-199.
- ITO T. (1980) Application of artificial diets in sericulture. *JARQ*, 14(3), 163-168.
- ITO T. (1981) Development of artificial diets and their application in sericulture. *Sericologia*, 24(4), 298-306.
- KRISHNAN M., SUBBU RATHINAM K.M., JANARTHANAN S. (1995) Effect of hydrolyzed protein (P-soyatox) in haemolymph protein profile, larval and pupal characters of the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). *Sericologia*, 35(2), 227-235.
- LAEMMLI U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 280-285.
- MATHAVAN S., BASKARAN K., SIRONMANI A., PANDIAN T.J. (1984) Studies on the utilization of single cell proteins by the silkworm, *Bombyx mori*. *Entomol. Exp. Appl.*, 36, 61-68.
- NAGATA M., KOBAYASHI M. (1990) Effects of nutrition on storage protein concentrations in the larval haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Sericult. Sci. Japan*, 59(6), 469-474.
- REINECKE J.P. (1985) Nutrition: artificial diets. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. G.A. Kerkut and L.I. Gilbert eds., Pergamon Press, Oxford, Vol. 4, pp. 391-419.
- SUBBU RATHINAM K.M., JANARTHANAN S., KRISHNAN M. (1996) Improvement of multivoltine rearing through nutritional fortification of mulberry leaves. *Proceedings of the International Conference on Sericulture 94 : Global Silk Scenario 2001*. Bangalore, pp. 248-251.
- YAMAMOTO T., FUJIMAKI T. (1982) Interstrain differences in food efficiency of the silkworm, *Bombyx mori*, reared on artificial diets. *J. Sericult. Sci. Japan*, 51, 312-315.

REPONSE DE CINQ RACES DIFFERENTES DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L. (LEPIDOPTERA : BOMBYCIDAE) A L'APPORT DE PROTEINES DE SOJA HYDROLYSEES

V. VANISREE, X. NIRMALA & M. KRISHNAN*

Department of Biotechnology, School of Life Sciences, Bharathidasan University,
Tiruchirapalli - 620 024, Tamil Nadu, Inde.

On a réalisé une étude comparative de la réponse à l'apport en P-soyatoses chez quatre races polyvoltines, Saurupet (S), Mysore Princess (MP), Hosa Mysore (HM) et Mysore-1 (M-1), et une race bivoltine, NB₄D₂. Des larves du cinquième âge ont été nourries avec des feuilles de mûrier enrichies avec des concentrations sélectionnées (1,75, 2,00 et 2,25 %) de P-soyatoses. La SDS-PAGE révèle une accumulation maximale de protéines de stockage à 1,75 % chez NB₄D₂ et à 2,00 % chez S, MP, HM et M-1. L'apport de P-soyatoses entraîne une amélioration du poids du cocon, du poids de la coque et de la richesse soyeuse à 1,75 % chez les bivoltins mâles et à 2,00 % chez la plupart des polyvoltins. Compte tenu des différences de réponses des races à un apport simple en protéines alimentaires démontrées dans cette étude il appartient aux fermiers de confirmer la concentration optimale en protéines alimentaires pour une race donnée avant de se lancer dans l'enrichissement des aliments.

INTRODUCTION

Chez les lépidoptères, les protéines de stockage sont synthétisées par le corps adipeux au cours du dernier âge larvaire et libérées dans l'hémolymphe. L'accumulation des protéines de stockage est fortement influencée par les conditions nutritionnelles (Nagata et Kobayashi, 1990). Dans une étude précédente (Krishnan et coll., 1995), nous avons mis en évidence l'influence positive de la protéine de soja P-soyatoses (concentration de 2,00 %) sur les teneurs en protéines de stockage chez *Bombyx mori*. Subbu Rathinam et coll. (1996) ont appliqué les résultats de leurs recherches au niveau des fermes et ont observé que l'apport de P-soyatoses à 2,00 % (4 g/ponte saine/jour) permet d'améliorer la production de cocons chez l'hybride L × NB₄D₂ de *B. mori*. Cependant, Yamamoto et Fujimaki (1982) ont observé que l'efficacité d'utilisation de la nourriture varie fortement en fonction des races de vers à soie. Hanumappa et Delvi (1989) ont également observé que les variations du profil d'utilisation de la nourriture dépend de facteurs biotiques comme la souche ou la race des individus testés. Etant donné que l'on utilise différentes races de vers à soie à l'échelle commerciale, il est nécessaire d'effectuer une étude comparative de la réponse de différentes races de ver à soie à l'apport nutritionnel. Dans cette étude, nous avons donc observé la réponse de cinq races du ver à soie *Bombyx mori* à l'apport de P-soyatoses à des concentrations sélectionnées.

MATERIELS ET METHODES

Des pontes saines de cinq races du ver à soie *Bombyx mori*, à savoir la race bivoltine NB₄D₂ et les races polyvoltines Saurupet (S), Mysore Princess (MP), Hosa Mysore (HM) et Mysore-1 (M-1), ont été fournies par la Germplasm Station d'Hosur (Inde). Les larves écloses ont été conservées à 25 ± 1 °C et 75 ± 5 % d'humidité relative et nourries avec des feuilles de mûrier finement hachées (variété MR₂) cinq fois par jour. Après la quatrième mue, les larves ont été sexées et réparties en 4 lots

* Auteur auquel doit être adressée la correspondance.

de 100 larves. Un lot a été utilisé comme témoin et nourri avec des feuilles de mûrier fraîches et les trois autres lots ont été nourris avec des feuilles de mûrier enrichies en P-soyatosé. L'apport nutritionnel a été limité aux trois premiers nourrissages, les autres nourrissages ont été faits avec des feuilles de mûrier fraîches. La P-soyatosé est un condensé enzymatique de protéines de soja et contient 8,8 % d'azote total. Cet hydrolysate protéique végétal a un pH neutre, est soluble dans l'eau et exempt d'organismes pathogènes. Les suspensions protéiques ont été préparées avec cette farine de soja dans de l'eau distillée à des concentrations préalablement testées de 1,75, 2,00 et 2,25 % (Krishnan et coll., 1994). Les feuilles de mûrier trempées dans ces suspensions ont été hachées, séchées à l'air et données comme aliment aux lots expérimentaux à partir du premier jour du cinquième âge.

Le poids larvaire chez les différents lots a été relevé à partir du premier jour du cinquième âge. L'hémolymph a été prélevée chez cinq larves en incisant l'une des pattes abdominales et déposée dans des éprouvettes rincées dans une solution de phénylthiourée. Les larves ont ensuite été disséquées sur la glace pour prélever le corps adipeux. Les échantillons ont été prélevés jusqu'à l'avant-dernier jour du filage. L'hémolymph a été centrifugée à 5 000 tours/minute à 4 °C pour éliminer les hémocytes avant séparation par électrophorèse. Le corps adipeux a été broyé dans 5 volumes de tampon phosphate (pH 7,5) à l'aide d'un broyeur Téflon en verre et centrifugé à 5 000 tours/minute pendant 5 minutes. Le surnageant a été soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS à 10 % (Laemmli, 1970) afin de déterminer les teneurs en protéines de stockage. On a laissé les 95 larves restantes filer leur cocon afin de déterminer l'effet de la P-soyatosé sur les caractères économiques des différentes races de ver à soie.

RESULTATS

L'apport de P-soyatosé a un impact sur les teneurs en protéines de stockage dans l'hémolymph, sur le poids larvaire, le poids nymphal, le poids du cocon, le poids de la coque et la durée larvaire. L'observation des profils protéiques de l'hémolymph montre que la concentration optimale en P-soyatosé nécessaire à l'accumulation maximale de protéines de stockage varie en fonction des races. La figure 1 révèle que l'accumulation de protéines de stockage (SP 1, 82 kDa ; SP 2, 76 kDa et 72 kDa) est maximale à la concentration de 1,75 % dans l'hémolymph et le corps adipeux pour les deux sexes chez NB4D₂. Chez Saurupet (Fig. 1), l'accumulation de protéines de stockage est maximale et supérieure à celle obtenue pour le témoin et les autres lots traités à la concentration de 2,00 % de P-soyatosé, quel que soit le sexe. On observe un profil identique pour MP, HM et M-1, chez lesquels l'accumulation de protéines de stockage est maximale à 2,00 % (Fig. 1). Le profil protéique du corps adipeux ne présente pas de variation significative, quelle que soit la race (Fig. 2). Outre l'accumulation de protéines de stockages, la concentration optimale de P-soyatosé à 1,75 % entraîne une augmentation significative ($P < 0,05$) du poids larvaire, du poids du cocon, du poids nymphal et du poids de la coque chez les mâles de NB4D₂ (Tableau V). En outre, chez S, MP, HM et M-1, le poids larvaire, le poids du cocon, le poids nymphal et le poids de la coque sont maximaux à la concentration de 2,00 % de P-soyatosé par rapport aux mesures du témoin (Tableaux I à IV). Chez les cinq races de *B. mori* considérées, les larves des lots traités présentent une réduction de la durée larvaire de 24 heures par rapport au témoin : la durée du cinquième âge larvaire est de 7 jours chez le témoin contre 6 jours chez les lots traités.

DISCUSSION

Les profils protéiques des échantillons d'hémolymph indiquent une accumulation maximale de protéines de stockage à la concentration de 1,75 % chez NB4D₂ et à 2,00 % chez S, MP, HM et M-1. Il se peut que la synthèse et l'accumulation consécutive de protéines de stockage augmentent chez les larves bénéficiant d'une source riche en acides aminés dérivée, outre du mûrier, de la P-soyatosé. Cette influence positive des protéines alimentaires sur les protéines de l'hémolymph a déjà été observée par plusieurs chercheurs (Horie et coll., 1971 ; Broadway et Duffey, 1986 ; Krishnan et coll., 1994). Ce résultat corrobore également tout à fait les observations de Horie et Watanabe (1983) qui ont démontré que l'apport de protéines de soja entraînait une augmentation des teneurs en protéines et en acides aminés dans l'hémolymph des larves du ver à soie *B. mori*.

A la lecture des tableaux I à V, il est clair que la P-soyatosé entraîne une augmentation de la croissance et des caractères économiques des cinq races de *B. mori* considérées. On sait que les sources riches de protéines alimentaires comme les protéines de soja favorisent la croissance et améliorent les caractères économiques du ver à soie (Ito, 1980). L'apport de protéines de soja se traduit par une meilleure croissance du ver à soie (Ito, 1981) car elles contiennent tous les acides aminés essentiels (Reinecke, 1985).

La concentration optimale en protéines diffère entre la race bivoltine NB₄D₂ et les races polyvoltines. Cette différence de réponse peut s'expliquer de deux façons.

(1) Des expériences réalisées sur *H. zea* et *S. exigua* ont permis de démontrer qu'il y a une relation entre les besoins en protéines alimentaires d'un insecte, d'une part, et sa croissance et sa physiologie digestive, d'autre part. Une espèce qui se développe de manière optimale avec une concentration relativement élevée de protéines alimentaires produit de la protéase en grande quantité. Par comparaison, une espèce qui se développe avec des concentrations plus faibles de protéines alimentaires produit relativement moins de protéase (Broadway et Duffey, 1986). Dans cette étude, il est possible que les races polyvoltines donnant les meilleurs résultats à une concentration relativement élevée (2,00 %) de protéines alimentaires produisent de la protéase en grande quantité. En outre, il est possible que la race bivoltine NB₄D₂, qui donne les meilleurs résultats à une concentration relativement faible (1,75 %) de protéines alimentaires, produise de la protéase en faible quantité. Comme l'ont démontré Broadway et Duffey (1986), l'acquisition de protéines ne dépend donc pas seulement de la quantité de protéines alimentaires mais est également fonction de la synthèse des protéases nécessaires pour digérer ces protéines. Chaque espèce d'insecte possède un seuil d'équilibre entre les besoins en protéines alimentaires et les dépenses d'énergie pour traiter ces protéines. Aussi, pour maintenir l'équilibre entre la physiologie digestive et les besoins en protéines alimentaires, les races bivoltines et polyvoltines du ver à soie absorbent des concentrations différentes d'une même protéine.

(2) Hanumappa et Delvi (1989) ont démontré que la consommation de nourriture varie en fonction des races de vers à soie, les bivoltins présentant une valeur plus élevée que les polyvoltins. Sur la base de cette observation, on peut penser que NB₄D₂, qui est une race bivoltine, consomme des quantités plus importantes des feuilles de mûrier enrichies et accumule ainsi suffisamment de protéines à la concentration minimale de 1,75 %. Les polyvoltins, qui ont une consommation comparativement plus faible, accumulent les protéines nécessaires seulement à la concentration de 2,00 %, qui est plus élevée. Ceci explique la différence de réponse entre les races à un apport simple en protéines alimentaires. Une diminution de la durée larvaire a été observée chez tous les groupes traités, quelle que soit la race. Des résultats similaires ont été obtenus chez *B. mori* par Mathavan et coll. (1984) dans une expérience utilisant une protéine unicellulaire comme apport nutritionnel et, plus récemment, par Krishnan et coll. (1994) dans une expérience utilisant comme apport nutritionnel de la P-soyatosé.

SURVEY ON THE SEASONAL INCIDENCE OF UZI FLY, *EXORISTA BOMBYCIS* (LOUIS), INFESTATION ON THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L., AND ASSESSMENT OF COCOON LOSS IN BIRBHUM DISTRICT, WEST BENGAL, INDIA

N. CHAKRABORTY, S.S. BHATTACHARYA, N.K. DAS, S.K. SEN & T. PAVAN KUMAR

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

During the period February 1991-November 1992 (10 rearing seasons) studies were made on the incidence of uzi fly infestation in commercial sericultural areas of Birbhum district, West Bengal, India. The rate of uzi fly infestation at the fourth and fifth larval instars and at cocoon stage in relation to temperature, humidity and rainfall prevailing during the period under investigation indicates a positive significant correlation coefficient among these factors. The maximum uzi fly infestation was 16.01% in July at the fifth instar; the lowest infestation rates of 0.44% and 0.36% were observed at the fourth instar in February and at cocoon stage in November, respectively. Based on multiple regression equations and respective coefficients of determination, a prediction can be made from the prevailing abiotic conditions for future uzi fly infestation. Loss of cocoon crop due to uzi fly infestation has been calculated and was found to be maximum of 30.82% in Birbhum district.

Keywords: Uzi fly, survey, silkworm, crop loss.

INTRODUCTION

The uzi fly, *Exorista bombycis* Louis, a serious endoparasitoid of the mulberry silkworm, *Bombyx mori*, causes considerable damage to the silkworm crops in the eastern and north-eastern regions of India (Mukherjee, 1919; Jameson, 1922; Dasgupta, 1962; Datta and Mukherjee, 1978). Different workers have reported the distribution range of the uzi fly and loss of cocoon crops due to uzi attack in different areas as well as in different seasons (Siddappaji and Basavanna, 1990). Krishnaswami *et al.* (1964) studied the rate of uzi fly infestation in Malda district, West Bengal, in the period May to October in 1962. Murty *et al.* (1988) studied the rate of uzi infestation in West Bengal and Andhra Pradesh. Bhattacharya *et al.* (1993b) reported the incidence of uzi fly infestation in Malda district, West Bengal, India, depending upon the season to range from 0.008% to 11.6%. Crop losses were estimated to be 12.25%.

Knowledge on the incidence of *Exorista bombycis* infestation in relation to the abiotic factors prevailing in the rearing seasons such as temperature, relative humidity and rainfall is a prerequisite for taking up a control programme of the uzi fly in a particular area. Keeping this in view and since crop schedules of Malda district (Bhattacharya *et al.*, 1993b) and Birbhum district are distinctly different, a detailed systematic study on the incidence of uzi fly infestation and cocoon crop loss assessment was undertaken in Birbhum district from November 1991 to February 1992. Following multiple regression equation this paper also gives predicted rates of uzi fly infestation and crop losses in relation to the above abiotic factors prevailing in different seasons.

MATERIALS AND METHODS

The present paper illustrates the incidence of uzi infestation recorded in the commercial sericultural areas of Birbhum district, West Bengal, India, during the rearing seasons from February 1991 to November 1992, which covered the annual commercial crop schedule of five rearing seasons

of the district (February, April, July, September and November) for two consecutive years. Studies were carried out in randomly selected 5% of the total commercial sericultural villages at Nalhati and Rampurhat blocks, which regularly suffer cocoon crop losses due to uzi fly infestation. A random sample of 5% of the rearing houses was chosen from every selected village. From each of the selected rearing houses (32), 400 silkworms were picked up randomly from all the rearing trays and examined once during the fourth instar and once during the fifth instar for uzi fly infestation based on the number of black scars on the silkworm larvae; moreover 400 cocoons were selected at random from the total harvest and the number of uzi-pierced cocoons was noted, since uzi fly infestation was found to be maximum in these stages. The percentage of crop loss due to this parasitoid was estimated from the ratio of the number of larvae infested to the total number of larvae reared, and expressed in terms of 'disease-free layings' (dfl) (1 dfl $\approx$ 400 larvae). Estimates for means and variances were calculated according to Sukhatme *et al.* (1984). Multiple regression equation was fitted for the prediction of uzi fly infestation in relation to the influence of abiotic factors in different seasons for different stages.

RESULTS

The meteorological data, i.e., temperature, relative humidity and rainfall, for every commercial season during the survey undertaken are furnished in Table I.

Table I. Meteorological data of Birbhum district for different commercial rearing seasons during 1991-1992.

Tableau I. Données météorologiques dans le district de Birbhum en fonction des saisons d'élevage commercial en 1991-1992.

Season of rearing	Maximum temperature (°C)	Minimum temperature (°C)	Maximum r. humidity (%)	Minimum r. humidity (%)	Average rainfall (mm)
Saison d'élevage	Température maximale (°C)	Température minimale (°C)	Humidité r. maximale (%)	Humidité r. minimale (%)	Pluviométrie moyenne (mm)
Feb. 91 / Fév. 91	26.87	16.45	61.52	40.63	0.07
Mar-Apr. 91 / Mars-Avr. 91	37.95	23.55	71.03	45.76	0.71
Jul. 91 / Juil. 91	32.46	25.13	96.38	80.47	7.38
Sept. 91	31.98	25.01	88.61	74.59	13.25
Nov. 91	28.93	16.83	64.57	42.17	0.00
Feb. 92 / Fév. 92	26.76	13.97	64.00	24.81	0.67
Apr. 92 / Avr. 92	41.52	25.38	77.55	39.26	0.00
Jul. 92 / Juil. 92	32.60	25.21	83.17	58.26	10.55
Sept. 92	33.12	28.00	80.44	66.94	3.84
Nov. 92	28.37	20.64	73.88	41.64	0.02

The rate of uzi fly infestation, both observed and predicted during the fourth and fifth larval instars and cocoon stage, are depicted in Figure 1. During the fourth instar, the infestation was minimum (0.44% to 1.18%) in February. Thereafter, it gradually increased and reached a peak during

July (7.05% to 8.15%). At the fifth instar, minimum infestation (0.87% to 1.70%) was noted in February and the maximum (10.44% to 16.01%) in July. However, cocoon infestation was minimum (0.36% to 0.74%) in November and February whereas it was maximum (7.76% to 8.93%) in July.

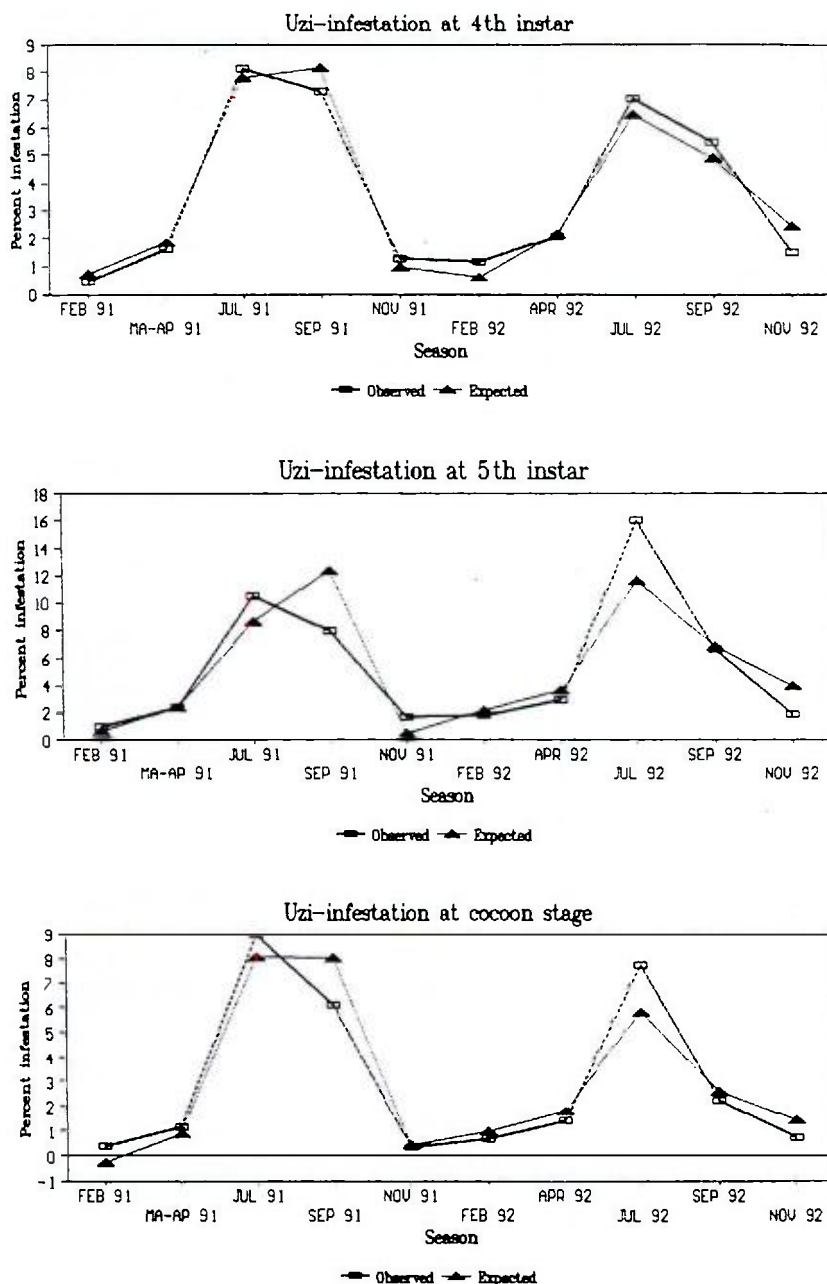


Fig. 1 : Uzi fly infestation (%) in commercial zones of Birbhum district during 1991-92.

Fig. 1 : Infestation par la mouche uzi (%) dans les zones du district de Birbhum en 1991-92.

The correlation coefficients for assessment of the relationship between uzi fly infestation and all of the abiotic factors have been calculated and are given in Table II. The rate of uzi fly infestation at the fourth and fifth instars and cocoon stage is positively correlated with temperature, humidity and rainfall. A similar relationship was also observed in Malda district, West Bengal, by Bhattacharya *et al.* (1993b). Multiple regression equations and respective coefficients of determination (R^2) are furnished in Table III. The coefficient of determination (R^2) was 0.824 for the fourth instar, 0.687 for the fifth instar and 0.786 for the cocoon stage. The values being moderately high, it indicates that a fair prediction can be made from the prevailing abiotic conditions for uzi fly infestation in Birbhum district. Table IV and Figure 1 confirm that predicted values are very close to the observed values for the rate of uzi fly infestation during all the above stages of the silkworm.

Table II. Correlation coefficients of the rate of uzi infestation with abiotic factors in different developmental stages of the silkworm.

Tableau II. Coefficients de corrélation entre le taux d'infestation uzi et les facteurs abiotiques en fonction des stades du développement du ver à soie.

Stage	Maximum temperature	Minimum temperature	Maximum r. humidity	Minimum r. humidity	Average rainfall
Stade	Température maximale	Température minimale	Humidité r. maximale	Humidité r. minimale	Pluviosité moyenne
IV	0.170**	0.657**	0.858**	0.843**	0.482**
V	0.152**	0.576**	0.716**	0.659**	0.764**
Cocoon / Cocon	0.135*	0.529**	0.823**	0.759**	0.486**

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

Table III. Regression equations for predicting uzi infestation in different developmental stages of the silkworm.

Tableau III. Equations de régression permettant de prévoir l'infestation uzi aux différents stades de développement du ver à soie.

Stage	Equation	R square
Stade	Equation	Carré de R
IV	$Y = -6.891 - 0.076x_1 + 0.078x_2 + 0.121x_3 + 0.023x_4 + 0.237x_5$	0.824**
V	$Y = -4.648 - 0.273x_1 + 0.510x_2 + 0.149x_3 - 0.125x_4 + 0.684x_5$	0.687**
Cocoon / Cocon	$Y = -11.634 + 0.063x_1 - 0.267x_2 + 0.223x_3 + 0.008x_4 + 0.297x_5$	0.786**

x_1 : Maximum temperature / *Température maximale*. x_2 : Minimum temperature / *Température minimale*. x_3 : Maximum relative humidity / *Humidité relative maximale*. x_4 : Minimum relative humidity / *Humidité relative minimale*. x_5 : Average rainfall / *Pluviométrie moyenne*.

In Birbhum district, crop losses due to uzi fly infestation was assessed individually for 10 different seasons (Table IV) and showed that the percentage of crop loss varied from 1.72% (minimum in February) to 30.82% (maximum in July).

Table IV. Observed and predicted rates of infestation in relation to abiotic factors.

Tableau IV. Taux d'infestation observés et estimés en fonction des facteurs abiotiques.

Season of rearing	Observed infestation (%)				Expected infestation (%)			
	Stage IV	Stage V	Cocoon stage	Total	Stage IV	Stage V	Cocoon stage	Total
Saison d'élevage	Infestation observée (%)				Infestation estimée (%)			
	4e âge	5e âge	Stade cocon	Total	4e âge	5e âge	Stade cocon	Total
Feb. 91 / Fév. 91	0.44	0.87	0.40	1.71	0.71	0.53	0.27	1.51
Mar-Apr. 91 / Mars-Avr. 91	1.62	2.31	1.18	5.11	1.84	2.33	0.89	5.06
Jul. 91 / Juil. 91	8.15	10.44	8.93	27.52	7.80	8.63	8.04	24.47
Sept. 91	7.31	7.87	6.09	21.27	8.15	12.30	8.01	28.46
Nov. 91	1.25	1.61	0.36	3.22	0.97	0.37	0.43	1.77
Feb. 92 / Fév. 92	1.18	1.70	0.70	3.58	0.61	2.05	0.99	3.65
Apr. 92 / Avr. 92	2.10	2.87	1.41	6.38	2.18	3.59	1.81	7.58
Jul. 92 / Juil. 92	7.05	16.01	7.76	30.82	6.46	11.62	5.85	23.93
Sept. 92	5.48	6.61	2.24	14.33	4.91	6.81	2.60	14.32
Nov. 92	1.49	1.88	0.74	4.11	2.43	3.93	1.46	7.82

DISCUSSION

Field observations made during the present study reveal that in the commercial sericultural areas of Birbhum district uzi fly infestation is low during the winter season (November to February). This infestation gradually becomes higher in the successive rearing seasons following the rise of temperature, relative humidity and rainfall and attains its maximum during the monsoon period (July to September). In Malda district the maximum uzi fly infestation is reported to be 11.6% in May during the fifth instar (Bhattacharya *et al.*, 1993b), whereas in the present investigation a maximum infestation of 16.01% was noted in Birbhum in July during the fifth instar.

Literature data indicate that temperature and relative humidity conditions ranging from 27.2 °C to 30.2 °C and from 80.3% to 88.7%, respectively, are congenial to generation survivability of uzi flies (Bhattacharya *et al.*, 1993a). This is in confirmation with the present observations, since similar abiotic conditions prevail during July to September in Birbhum district when a high incidence of uzi fly infestation was recorded.

In the present review, Birbhum district was found to incur crop loss due to uzi fly attack to the extent of 30.82% (Table V), which is higher than in Malda district (12.25%) (Bhattacharya *et al.*, 1993b). While analysing the reasons for such differences of cocoon crop losses between the two districts it was observed that there was a schedule of four commercial rearing seasons in Malda district, whereas Birbhum district has a schedule of five rearing seasons. Moreover, farmers of many villages

Table V. Assessment of crop losses due to uzi infestation.

Tableau V. Evaluation des pertes de récoltes dues à l'infestation uzi.

Season of rearing	Total rearing houses	Average cocoon yield/100 dfl's (kg)	Dfl's reared (avg.)	Avg. infested larvae/100 dfl's			Devel. stage of infested larvae			Total dfl's infested	Crop loss (%)
				Stage IV	Stage V	Cocoon stage	Stage IV	Stage V	Cocoon stage		
Saison d'élevage	Nombre total de sites d'élevage	Rendement moyen en cocons/100 pontes (kg)	Pontes élevées (moyenne)	Moyenne de larves infestées /100 pontes			Stade de développement des larves infestées			Nombre total de pontes infestées	Perte de récolte (%)
				4e âge	5e âge	Stade cocon	4e âge	5e âge	Stade cocun		
Feb. 91 / Fév. 91	628	23.45	385.9	176.2	348.7	61.2	124.8	175.3	104.2	4158.1	1.72
Mar-Apr. 91 / Mars-Avr. 91	321	21.50	334.4	646.2	922.5	473.7	560.7	588.4	369.3	10603.0	5.11
Jul. 91 / Juil. 91	618	19.25	317.2	3258.7	176.2	3570.0	889.1	1128.7	913.8	53930.5	27.51
Sept. 91	618	19.00	312.5	2923.7	148.7	2437.0	638.0	631.0	499.1	41087.3	21.20
Nov. 91	625	21.85	392.2	500.0	645.0	143.7	232.4	202.2	59.9	7897.4	3.22
Feb. 92 / Fév. 92	827	22.50	371.9	472.5	681.2	280.0	220.1	293.5	105.8	8357.5	3.58
Apr. 92 / Avr. 92	608	22.00	328.1	838.7	1146.2	565.0	243.2	208.9	132.6	12718.1	6.38
Jul. 92 / Juil. 92	609	19.70	334.4	2818.7	6403.7	3105.0	558.9	1562.8	992.0	62757.6	30.82
Sept. 92	597	19.85	340.6	2191.2	2643.7	895.0	436.3	422.3	236.4	29130.3	14.33
Nov. 92	633	22.20	404.7	595.0	750.0	297.5	202.2	171.8	134.9	10518.9	4.11

dfl: disease-free laying / ponte saine.

Sample size of rearing houses: 32 in every season / Taille de l'échantillon en nombre de magnaneries : 32 par saison.

in Birbhum district reap unrecognised six or seven crops per year without caring for any brushing schedule. This causes overlapping silkworm rearing round the year. Therefore it is possible to understand from the present study that this favours uzi fly infestations, as host larvae are present most of the year. In contrast, farmers of Malda district restrict themselves to harvest four commercial crops per year, only leaving a resting period of 2.5 to 3 months between each crop, which suppresses the rate of uzi fly infestation.

The multiple correlation coefficients of temperature and humidity with the incidence of uzi fly infestation, as revealed from the present observations, may be put to practical utilisation for the preparation of an annual calendar for forecasting uzi fly infestations and for accurate timing of its management practices to save the sericulture industry from this menace.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to the sericultural farmers of Birbhum district for their cooperation to enable us to collect the required data. Thanks are also due to Mrs I. Roy, Field Assistant, for assistance.

REFERENCES

- BHATTACHARYA S.S., CHAKRABORTY N., SAHAKUNDU A.K. (1993a) Life table of the uzi fly, *Exorista sorbillans* (Wiedemann) (Diptera: Tachinidae), a parasitoid of the mulberry silkworm, *Bombyx mori*. *Sericologia*, 33(1), 65-75.
- BHATTACHARYA S.S., CHAKRABORTY N., NAIR B.P., SAHAKUNDU A.K. (1993b) Influence of abiotic factors on uzi fly, *Exorista sorbillans* (Wiedemann) Beck, infestation on the silkworm (*Bombyx mori* L.) and assessment of crop loss in Malda district (West Bengal, India). *Sericologia*, 33(2), 289-296.
- DASGUPTA K.P. (1962) Observations on the behaviour of uzi fly maggots. *Indian J. Seric.*, 1(2), 16-18.
- DATTA R.K., MUKHERJEE P.K. (1978) Life history of *Tricholyga bombycis* (Diptera: Tachinidae), a parasite of *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). *Ann. Ent. Soc. America*, 71, 767-770.
- JAMESON A.P. (1922) Report on Diseases of Silkworms in India. Govt. Printing, International Books and Periodical Supply Service, New Delhi, India, pp. 62-64.
- KRISHNASWAMI S., JOLLY M.S., DATTA K. (1964) A study on the fly pest infestation of the larval and cocoon characters of *Bombyx mori* L. *Indian J. Seric.*, 3, 7-12.
- MUKHERJEE N.G. (1919) Handbook of Sericulture. Bengal Secretariat Book Report, Calcutta, 296 pp.
- MURTY S.V., JYOTHI K.N., JAMIL K. (1988) Environmental factors governing the infestation of uzi-fly, *Exorista sorbillans*, an endoparasite of mulberry silkworm, *Bombyx mori*, in certain areas of West Bengal and Andhra Pradesh. *Proc. National Symposium on Nutritional Ecology of Insects and Environment*, Muzaffarnagar, 74 pp.
- SIDDAPPAJI C., BASAVANNA G.P.C. (1990) The Indian uzifly, *Exorista bombycis*, a parasitoid of mulberry silkworm. *Indian J. Seric.*, 29(1), 119-137.
- SUKHATME P.V., SUKHATME B.V., ASOKE C. (1984) Sampling Theory of Survey with Applications. Iowa State Univ. Press & ISAS, New Delhi, 526 pp.

ETUDE SUR L'INCIDENCE SAISONNIERE DE L'INFESTATION DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L. PAR LA MOUCHE *UZI EXORISTA BOMBYCIS* (LOUIS) ET EVALUATION DES PERTES EN COCONS DANS LE DISTRICT DE BIRBHUM (BENGALE OCCIDENTAL, INDE)

N. CHAKRABORTY, S.S. BHATTACHARYA, N.K. DAS, S.K. SEN & T. PAVAN KUMAR

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

On a réalisé une étude sur l'incidence de l'infestation par la mouche uzi dans les zones sérícolas du district de Birbhum (Bengale occidentale, Inde) sur une période allant de février 1991 à novembre 1992 (10 saisons d'élevage). Le taux d'infestation par la mouche uzi au quatrième et au cinquième âge larvaire et au stade cocon en fonction de la température, de l'humidité et de la pluviosité au cours de la période considérée fait apparaître un coefficient de corrélation significatif entre ces facteurs. Le taux d'infestation par la mouche uzi est maximal (16,01%) en juillet au cinquième âge ; on obtient les taux d'infestation les plus faibles (0,44% et 0,36%) au quatrième âge en février et au stade cocon en novembre. A l'aide d'équations de régression multiple et des coefficients de détermination correspondants, il est possible de prédire le taux d'infestation en fonction des conditions abiotiques. Les pertes en cocons dues à l'infestation par la mouche uzi ont été calculées et atteignent un maximum de 30,82 % dans le district de Birbhum.

INTRODUCTION

La mouche uzi, *Exorista bombycis* Louis, l'un des principaux endoparasitoïdes du ver à soie du mûrier, *Bombyx mori*, occasionne des dommages considérables dans les élevages de vers à soie des régions de l'est et du nord-est de l'Inde (Mukherjee, 1919 ; Jameson, 1922 ; Dasgupta, 1962 ; Datta and Mukherjee, 1978). Des chercheurs ont décrit la répartition des populations uzi et les pertes de récoltes de cocons dues à l'infestation uzi en fonction des zones et des saisons (Siddappaji et Basavanna, 1990). Krishnaswami et coll. (1964) ont étudié le taux d'infestation uzi dans le district de Malda (Bengale occidentale) entre mai et octobre en 1962. Murty et coll. (1988) ont étudié le taux d'infestation uzi dans le Bengale occidental et en Andhra Pradesh. Bhattacharya et coll. (1993b) ont montré que l'incidence de l'infestation par la mouche uzi dans le district de Malda (Bengale occidental, Inde) varie de 0,008 % à 11,6 % suivant la saison. Les pertes de récoltes sont estimées à 12,25 %.

La connaissance de l'incidence de l'infestation par *Exorista bombycis* en fonction des facteurs abiotiques comme la température, l'humidité relative et la pluviosité au cours des saisons d'élevage est indispensable à la mise en place d'un programme de lutte contre la mouche uzi dans une région donnée. Sur cette base et étant donné que les saisons d'élevage du district de Malda (Bhattacharya et coll., 1993b) et du district de Birbhum sont nettement différentes, une étude systématique détaillée de l'incidence de l'infestation par la mouche uzi et sur l'évaluation des pertes de cocons a été réalisée dans le district de Birbhum entre novembre 1991 et février 1992. Cette étude vise également à fournir une estimation des taux d'infestation par la mouche uzi et des pertes de cocons en fonction des facteurs abiotiques au cours des différentes saisons en utilisant les équations de régression multiple.

MATERIELS ET METHODES

Cet article décrit l'incidence de l'infestation par la mouche uzi enregistrée dans les zones séricicoles du district de Birbhum (Bengale occidentale, Inde) pendant les saisons d'élevage entre février 1991 et novembre 1992, période qui recouvre le calendrier des élevages commerciaux de ce district (5 saisons d'élevage : février, avril, juillet, septembre et novembre) sur deux années consécutives. L'étude porte sur un échantillon sélectionné au hasard correspondant à 5 % de l'ensemble des villages séricicoles des zones de Nalhati et de Rampurhat qui subissent régulièrement des pertes de cocons dues à l'infestation par la mouche uzi. Un échantillon aléatoire de 5 % des magnaneries a été choisi dans chacun des villages sélectionnés. Dans chacune des magnaneries sélectionnées (32), 400 vers à soie ont été prélevés de manière aléatoire dans toutes les claies d'élevage et examinés une fois au quatrième âge et une fois au cinquième âge afin d'observer la présence éventuelle des cicatrices noires causées par la mouche uzi ; plus de 400 cocons ont été prélevés au hasard sur l'ensemble des récoltes et le nombre de cocons percés a été relevé, l'infestation par la mouche uzi étant maximale à ces stades. Le pourcentage de pertes de récolte dues à ce parasitoïde a été estimé d'après le rapport du nombre de larves infestées sur le nombre total de larves élevées exprimé en terme de « pontes saines » (une ponte saine $\approx$ 400 larves). Les moyennes et les variances ont été estimées d'après la méthode de Sukhatme et coll. (1984). L'équation de régression multiple a été adaptée à la prévision de l'infestation par la mouche uzi en fonction de l'influence des facteurs abiotiques à différentes saisons et différents stades.

RESULTATS

Les données météorologiques (température, humidité relative et pluviométrie) pour chacune des saisons d'élevage au cours de la période considérée sont présentées dans le tableau I.

Les taux d'infestation observés et estimés pour le quatrième et le cinquième âge ainsi que pour le stade cocon sont représentés dans la figure 1. Au quatrième stade, l'infestation est minimale (0,44 % à 1,18 %) en février puis elle augmente progressivement et atteint un pic en juillet (7,05 % à 8,15 %). Au cinquième âge, l'infestation est minimale (0,87 % à 1,70 %) en février et maximale (10,44 % à 16,01 %) en juillet. Cependant, l'infestation des cocons est minimale (0,36 % à 0,74 %) en novembre et en février et maximale (7,76 % à 8,93 %) en juillet.

Les coefficients de corrélation pour l'évaluation de la relation entre l'infestation par la mouche uzi et chacun des facteurs abiotiques ont été calculés et sont présentés dans le tableau II. Le taux d'infestation au quatrième et au cinquième âge ainsi qu'au stade cocon est positivement corrélé avec la température, l'humidité et la pluviosité. Bhattacharya et coll. (1993b) ont observé une relation similaire pour le district de Malda (Bengale occidentale). Les équations de régression multiple et les coefficients de détermination (R^2) correspondants sont présentés dans le tableau III. Le coefficient (R^2) est de 0,824 pour le quatrième âge, de 0,687 pour le cinquième âge et de 0,786 pour le stade cocon. Ces valeurs étant moyennement élevées, il est possible d'obtenir une prévision juste de l'infestation par la mouche uzi dans le district de Birbhum d'après les conditions abiotiques. Les données du tableau IV et de la figure 1 montrent que les valeurs estimées sont très proches des valeurs observées pour le taux d'infestation par la mouche uzi aux stades de développement considérés.

Les pertes de récoltes dues à l'infestation par la mouche uzi dans le district de Birbhum ont été évaluées pour 10 saisons différentes (Tableau IV) : les résultats obtenus montrent que le pourcentage de pertes de récoltes varie de 1,72 % (minimum en février) à 30,82 % (maximum en juillet).

DISCUSSION

Les observations effectuées sur le terrain pour cette étude révèlent que l'infestation par la mouche uzi est faible en hiver (novembre à février) dans les zones d'élevage commercial du district de Birbhum. L'infestation augmente progressivement au cours des saisons d'élevage suivantes à mesure que la température, l'humidité relative et la pluviosité augmentent et atteint son niveau maximal pendant la mousson (juillet à septembre). Dans le district de Malda, l'infestation est maximale (11,6 %) en mai au cinquième âge larvaire (Bhattacharya et coll., 1993b) tandis que, dans l'étude

présentée ici, l'infestation est maximale (16,01 %) en juillet au cinquième âge larvaire dans le district de Birbhum.

Les données bibliographiques indiquent qu'une température située entre 27,2 °C et 30,2 °C et une humidité relative de 80,3 % à 88,7 % favorisent la survie des générations de mouches uzi (Bhattacharya et coll., 1993a). Ceci est conforme à nos résultats, les conditions abiotiques étant similaires de juin à septembre dans le district de Birbhum, lorsque l'incidence de l'infestation par la mouche uzi est élevée.

Cet article révèle que les pertes de récoltes dues à l'infestation par la mouche uzi s'élèvent à 30,82 % dans le district de Birbhum (Tableau V), ce qui est plus élevé que dans le district de Malda (12,25 %) (Bhattacharya et coll., 1993b). L'analyse des causes de la différence de pertes de cocons entre les deux districts montre qu'il y a quatre saisons d'élevage commercial dans le district de Malda contre 5 saisons dans le district de Birbhum. De plus, dans de nombreux villages du district de Birbhum, les fermiers pratiquent six ou sept élevages par an non reconnus sans tenir compte du calendrier des levées, ce qui entraîne un chevauchement des élevages tout au long de l'année. Sur la base de cette étude, on peut conclure que cette pratique favorise l'infestation par la mouche uzi car les larves hôtes sont présentes pendant la majeure partie de l'année. A l'inverse, les fermiers du district de Malda se limitent à quatre élevages commerciaux par an en laissant une période de relâchement de 2,5 à 3 mois entre chaque élevage, ce qui permet de réduire le taux d'infestation par la mouche uzi.

Les coefficients de corrélation multiple obtenus dans cette étude entre la température et l'humidité, d'une part, et l'incidence de l'infestation par la mouche uzi, d'autre part, peuvent être utilisés pour préparer un calendrier annuel permettant de prévoir l'infestation par la mouche uzi et de planifier les élevages afin de préserver l'industrie séricicole de ce fléau.

TRANSFER OF MULBERRY PLANTS FROM TEST TUBES TO FIELD: EVALUATION OF MORPHOGENIC AND NUTRITIONAL STATUS

A. ZAMAN¹, M.A. QADER¹, R. ISLAM², O.I. JOARDER² & A.C. BARMAN¹

1. Mulberry Breeding and Biotechnology Division, Bangladesh Sericulture Research and Training Institute, Rajshahi 6100, Bangladesh.

2. Department of Botany, University of Rajshahi, Rajshahi 6205, Bangladesh.

Proliferating shoot cultures from nodal segments of three genotypes of mulberry were established in MS medium supplemented with 2 mg/l benzyladenine. Microshoots were rooted on indolebutyric acid-enriched ½ MS medium. Rooted shoots were successfully transferred to the field where they resumed growth and grew vigorously. Simultaneously, plants were raised through the conventional cutting method. A comparative study on the morphological and nutritive status of field-established plants raised from cuttings and in vitro-raised plants was conducted. In vitro-raised plants showed significant morphogenic vigour as compared to cutting-raised plants. The nutritional status was found to be more or less similar in both treatments.

Keywords: Mulberry, micropropagation, transplantation, field performance, nutritive value.

INTRODUCTION

Mulberry leaves are the sole food of the silkworm, *Bombyx mori* L. Cutting is the popular and widely used method for raising saplings in Bangladesh and is practised prior to winter (September-October). But the tissue culture technique is the method by which mulberry plantlets are raised all round the year and established in the soil (Zaman *et al.*, 1993). The premium additional benefits like greater vigour, early flowering, fuller branching, higher yield and elimination of wider varieties of pathogens may be associated with plants cloned through tissue culture (Murashige, 1974; Damiano *et al.*, 1983). Although a reliable technique for micropropagation of mulberry through tissue culture has been established in Bangladesh (Islam *et al.*, 1992; Zaman *et al.*, 1993), no literature is available on the field performances of *in vitro*-raised mulberry plants. Very scanty information is available regarding field performances of *in vitro*-raised plants both in terms of morphology and nutritional aspects (Pandey and Singh, 1989). The true applicability of these standardised techniques for production of superior plantlets of uniform size would depend ultimately on the comparative field performances of *in vitro*-produced plants from those produced through cuttings. The present investigation was therefore undertaken to find out the relative performances in terms of both the morphology and the nutritional aspects of *in vitro*-raised plants to cutting-originated plants in the field.

MATERIALS AND METHODS

Two indigenous genotypes (BSRM1 and BSRM3) and one Indian genotype (S1) of 5-year-old mulberry (*Morus alba*) plants were used as experimental sources for the investigation. Stem segments with a single axillary bud after proper sterilisation with 0.1% HgCl₂ for 10 minutes were cultured in cytokinin (benzyladenine, 2 mg/l)-enriched medium for shoot proliferation, whereas for root initiation microshoots were allowed to grow in an auxin-enriched medium (indolebutyric acid, 0.1 mg/l). In both cases, MS basal medium (Murashige and Skoog, 1962) was used. After induction of shoots and

roots the plantlets were taken out of the culture vessels and, after thorough washing to remove the remains of the media, were planted in polybags with non sterile garden soil and compost (1:1 ratio). For the first two weeks the polybags were kept inside the culture room and afterwards they were finally transferred to the field. When the tissue culture-derived plants were 1 year old, they were compared morphologically and biochemically with the cutting-derived plants of the same age. Cuttings (12-15 cm in length) with 4-5 eyes were prepared from the same tree from which nodal explants were collected for *in vitro* culture. These cuttings were sown in the field and the plants were raised. The biochemical parameters (protein, mineral, total sugar, reducing sugar, starch and soluble carbohydrate contents) were estimated following the methods of AOAC (1980). Nitrogen, calcium, potassium and phosphorus contents were determined according to the procedures of AOAC (1980), Bernad (1965), Jackson (1973) and Boltz (1958), respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

Shoot proliferation from cultured nodal explants started following 1-2 weeks of lag period. The explants showed their first response by enlarging and bursting of axillary buds. Within the first week of culture, 40-50% of the cultured explants exhibited bud-breaking and within 3-4 weeks about 80% explants produced proliferating shoot cultures. The shoots showed vigorous growth, had short internodes and deep green thick leaves. A primary explant could produce a maximum of eight usable shoots after eight weeks of culture initiation. Such shoots were excised and used as cuttings for rooting. From shoot-proliferating cultures, individual microshoots were excised and transferred to the rooting medium. Root initiation started within 7-9 days of culture. The microcuttings which failed to form roots within this period were unable to produce roots even after five weeks of culture. The percentage of rooting reached up to 80% within three weeks of culture. The roots produced were healthy, measuring 4-5 cm in length and bearing several laterals. For maximum production of shoots, the stock cultures were transferred to a fresh medium after harvesting the shoots for rooting. In this way, stock cultures were kept for continuous shoot production for several months.

The regenerated plantlets were successfully transferred to the field where they resumed growth and grew vigorously. After completion of one year, both *in vitro*- and cutting-derived plants displayed different morphological characters. The data on the comparative field performance of *in vitro*-raised and cutting-grown plants in relation to different growth parameters are summarised in Table I.

Morphological characters:

Height: The height (from soil level to shoot apex) of 15 plants of both *in vitro*- and cutting-raised plants belonging to three genotypes (BSRM1, BSRM3 and S1) was measured. It was experienced that, in all genotypes, *in vitro*-raised plants were comparatively better than cutting-raised plants. The maximum height (99.7 cm) was obtained in *in vitro*-raised plants of S1, whereas in cutting-raised plants of the same genotype the value was 92.4. In the other two genotypes, the *in vitro*-raised plants dominated over the cutting-raised plants. A similar trend between tissue-cultured plants and conventionally raised plants from cutting of trees has been reported by Murashige (1978).

Number, area and weight of leaves: Except in the case of BSRM1 where *in vitro*-raised plants produced less leaves per branch (24.5) than cutting-grown plants (26.9), in the other two genotypes the leaf number per branch was significantly higher in *in vitro*-raised plants. In all genotypes, the leaf area as well as leaf weight (g) of *in vitro*-raised plants were significantly higher as compared to the cutting-raised plants (Table I). Pandey and Singh (1989) also found the same type of morphogenic expressions while comparing the *in vitro*-raised and seedling-raised plants of *Carica papaya*.

Stomatal frequency: The number of stomata per microscopic field in one-year-old plants was significantly greater in the leaves of *in vitro*-raised plants than in cutting-raised plants. The higher number of stomata and larger leaf area helped in greater rate of photosynthesis, resulting in a greater vigour of *in vitro*-raised plants.

Table I. Comparative field performance of *in vitro*-raised and cutting-raised plants of *Morus alba*⁽¹⁾.

Tableau I. Performances comparées sur le terrain de plants de *Morus alba* obtenus *in vitro* et par bouturage⁽¹⁾.

Morphological characters <i>Caractères morphologiques</i>	Genotypes / <i>Génotypes</i>		
	BSRM1	BSRM2	S1
Plant height (cm) / <i>Hauteur du plant (cm)</i>	87.7 (89.6)	85.2 (91.1*)	92.4 (91.1*)
Leaf number per branch / <i>Nombre de feuilles/branche</i>	26.9 (24.5)	25.3 (37.1*)	38.7 (52.3*)
Leaf area (cm ²) / <i>Surface foliaire (cm²)</i>	70.3 (91.4*)	58.7 (77.3*)	55.9 (68.7*)
Weight of 100 leaves (g) / <i>Poids de 100 feuilles (g)</i>	144.3 (161.2*)	130.4 (156.7*)	119.6 (145.4*)
Stomatal frequency / <i>Fréquence des stomates</i>	20.5 (26.7*)	16.6 (17.4)	24.1 (37.3*)

(1) Data were recorded after one year of transplantation in the field. Figures in parentheses are for *in vitro*-grown plants. The 'paired t' test was applied to test the significance.

(1) Les données ont été relevées un an après la transplantation en mûraie. Les chiffres entre parenthèses correspondent aux plants cultivés *in vitro*.

La signification a été déterminée d'après le test de comparaison « t ».

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

Table II. Comparative nutritive value of mulberry leaves of three genotypes raised through cuttings and by the *in vitro* method⁽¹⁾.

Tableau II. Valeurs nutritives comparées de feuilles de mûrier de trois génotypes obtenus par bouturage et par la méthode *in vitro*⁽¹⁾.

Constituents (%) <i>Composants (%)</i>	Genotypes / <i>Génotypes</i>		
	BSRM1	BSRM2	S1
Moisture / <i>Eau</i>	72.52 (72.69)	70.61 (71.01)	71.11 (70.41)
Total mineral / <i>Minéraux totaux</i>	9.33 (9.61)	9.61 (9.88)	8.03 (8.91)
Protein / <i>Protéines</i>	18.41 (18.54)	19.31 (19.69)	21.60 (21.86)
Total sugar / <i>Sucres totaux</i>	3.61 (3.82)	4.11 (4.39)	4.96 (5.18)
Reducing sugar / <i>Sucres réducteurs</i>	2.33 (2.77)	3.01 (3.19)	3.58 (3.71)
Starch / <i>Amidon</i>	12.11 (12.73)	13.33 (13.49)	14.72 (15.22)
Soluble carbohydrate / <i>Hydrates de carbone solubles</i>	15.72 (16.55)	17.44 (17.88)	20.18 (20.04)
Nitrogen / <i>Azote</i>	2.94 (2.98)	3.08 (3.15)	3.46 (3.50)
Potassium	0.84 (1.15)	0.92 (1.22)	1.12 (1.32)
Phosphorus / <i>Phosphore</i>	0.16 (0.30)	0.19 (0.36)	0.15 (0.27)
Calcium	0.62 (0.63)	0.59 (0.62)	0.61 (0.68)

(1) Figures in parentheses are for *in vitro*-raised plants.

(1) Les chiffres entre parenthèses correspondent aux plants cultivés *in vitro*.

Biochemical and nutritional status:

The mean nutritive values of mulberry leaves of the three genotypes raised through cuttings and by the *in vitro* method are summarised in Table II. The nutritional constituents of mulberry leaves differed among the three genotypes and between the two treatments. Varietal differences of the nutritional constituents in mulberry have been previously reported by Qader *et al.* (1991).

Mulberry plants raised through the *in vitro* method showed a slightly higher amount of total mineral, protein, total sugar, reducing sugar, starch, soluble carbohydrate, nitrogen, potassium, phosphorus and calcium in the leaves of all three genotypes studied except for soluble carbohydrate of genotype S1. Pandey and Singh (1989) also reported a higher quantity of total sugar and reducing sugar in *in vitro*-raised plants of papaya and Swartz (1981) obtained the same result in the case of strawberry, which correlates our findings.

CONCLUSION

In vitro-raised plants exhibited spectacular morphogenic vigorous growth in comparison with cutting-raised plants. On the other hand, the nutritional status of both *in vitro*- and cutting-raised plants was more or less the same, although in many cases *in vitro*-raised plants possessed a slightly better nutritional status. The established *in vitro* plants grew uniformly in the field and can be used for feeding silkworms as well as cutting-raised plants.

REFERENCES

- AOAC (1980) Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, 13th Ed., Washington, DC, USA.
- BERNAD L.O. (1965) *In Hawk's Physical Chemistry*. 14th Ed., McGraw Hill Book Company, New York, pp. 1264-1265.
- BOLTZ D.F. (1958) The Colorimetric Determination of Non-Metals. Interscience Pub., New York, p. 38.
- DAMIANO C., FAEDI W., COBIANCHI D. (1983) Nursery runner plant production, fruiting behaviour of micropropagated strawberry plants. *Acta Horticult.*, 131, 193-200.
- ISLAM R., ZAMAN A., JOARDER O.I. (1992) Effects of different levels of sucrose on *in vitro* growth and development of microshoots. *Bangladesh Silk*, 3, 73-75.
- JACKSON M.L. (1973) Soil Chemical Analysis. Prentice Hall of India Pvt. Ltd., New Delhi, pp. 47-374.
- MURASHIGE T., SKOOG F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15, 475-497.
- MURASHIGE T. (1974) Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25, 135-166.
- MURASHIGE T. (1978) The impact of plant tissue culture in agriculture. *In Frontiers of Plant Tissue Culture*. T.A. Thorpe (ed.), Univ. Calgary Press, Canada, pp. 15-26.
- PANDEY R.M., SINGH S.P. (1989) Field performance of *in vitro* raised papaya plants. *Indian J. Hortic.*, 33, 1-7.
- QADER M.A., SARKER A.A., AHMED S.U. (1991) Comparative study on the nutritive value of bush, low-cut and tree mulberry leaves at different maturity stages. *Sericologia*, 31(3), 429-435.
- SWARTZ H.J. (1981) Field performance and phenotypic stability of tissue culture propagated strawberry. *J. American Soc. Hort. Sci.*, 106(5), 667-673.
- ZAMAN A., ISLAM R., HOSSAIN M., BARI M.A., JOARDER O.I. (1993) Plant regeneration and seedless fruit formation in nodal explant cultures of *Morus alba* L., cv. S1. *Sericologia*, 33(2), 313-318.

TRANSFERT DES PLANTS DE MURIER DES TUBES A ESSAI VERS LES PLANTATIONS : EVALUATION DE L'ETAT MORPHOGENETIQUE ET NUTRITIONNEL

A. ZAMAN¹, M.A. QADER¹, R. ISLAM², O.I. JOARDER² & A.C. BARMAN¹

1. Mulberry Breeding and Biotechnology Division, Bangladesh Sericulture Research and Training Institute, Rajshahi 6100, Bangladesh.

2. Department of Botany, University of Rajshahi, Rajshahi 6205, Bangladesh.

Des cultures de pousses issues de segments nodaux de trois génotypes de mûrier ont été réalisées en milieu MS additionné de 2 mg/l de benzyladénine. Les micropousses ont été racinées sur ½ milieu MS enrichi en acide indole-butyrique. Les pousses racinées ont été transférées avec succès en mûraie où elles ont repris leur croissance et se sont développées rapidement. Simultanément, des plants ont été obtenus par bouturage conventionnel. On a réalisé une étude comparative des éléments morphologiques et nutritifs des plants établis en mûraie après bouturage et culture in vitro. Les plants cultivés in vitro présentent une vigueur morphogénétique marquée par rapport aux plants issus de boutures. La situation nutritionnelle est à peu près identique chez les deux types de traitements.

INTRODUCTION

Les feuilles de mûrier constituent la seule nourriture du ver à soie *Bombyx mori* L. Le bouturage est la méthode la plus couramment utilisée pour obtenir des plantules au Bangladesh et est habituellement effectué avant l'hiver (septembre à octobre). Néanmoins, la technique de culture des tissus permet d'obtenir des plantules de mûrier et de les établir en mûraie tout au long de l'année (Zaman et coll., 1993). Les avantages principaux du clonage des plants par culture tissulaire sont : une meilleure vigueur, une floraison précoce, des ramifications plus importantes, un rendement plus élevé et l'élimination d'un plus grand nombre d'agents pathogènes (Murashige, 1974 ; Damiano et coll., 1983). Bien qu'une technique fiable pour la micropropagation du mûrier par culture tissulaire ait déjà été mise au point au Bangladesh (Islam et coll., 1992 ; Zaman et coll., 1993), on ne dispose d'aucune information sur les performances en mûraie des plants cultivés *in vitro*. Un nombre très limité de publications concerne les performances en mûraie des plants cultivés *in vitro*, tant sur le plan de la morphologie que sur les aspects nutritifs (Pandey et Singh, 1989). L'applicabilité de ces techniques standardisées visant à produire des plantules supérieures de taille uniforme dépend en fin de compte des performances comparées des plants obtenus *in vitro* et des plants reproduits par bouturage. Cette étude a donc été réalisée afin de déterminer les performances relatives, pour ce qui concerne la morphologie et les aspects nutritifs, des plants cultivés *in vitro* par rapport aux plants obtenus par bouturage.

MATERIELS ET METHODES

Des plants de mûrier (*Morus alba*) âgés de cinq ans issus de deux génotypes indigènes (BSRM1 et BSRM3) et d'un génotype indien (S1) ont été utilisés comme matériel expérimental. Après stérilisation avec de l'HgCl₂ à 0,1 % pendant 10 minutes, des fragments de tige comportant un seul bourgeon axillaire ont été cultivés dans un milieu enrichi en cytokinine (benzyladénine, 2 mg/l) pour la prolifération des pousses, tandis que, pour l'initiation des racines, les micropousses ont été cultivées dans un milieu enrichi en auxine (acide indole-butyrique, 0,1 mg/l). Dans les deux cas, on a utilisé un milieu de base MS (Murashige et Skoog, 1962). Après induction des pousses et des racines, les

plantules ont été prélevées dans les vases de culture et, après lavage pour éliminer les débris de milieu, elles ont été plantées dans des sacs en polyéthylène contenant du terreau de jardin non stérile et du compost (dans un rapport de 1:1). Pendant les deux premières semaines, les sacs de polyéthylène ont été conservés à l'intérieur de la pièce de culture puis ils ont été transférés en mûraie. Lorsque les plants obtenus par culture tissulaire ont atteint l'âge de 1 an, ils ont été soumis à une comparaison morphologique et biologique avec des plants du même âge obtenus par bouturage. Les boutures (12 à 15 cm de long), comportant 4 à 5 yeux, ont été préparées à partir de l'arbre sur lequel ont été prélevés les explants nodaux destinés à la culture *in vitro*. Ces boutures ont été plantées en mûraie et les plants ont été cultivés. Les paramètres biochimiques (teneurs en protéines, en minéraux, en sucres totaux, en sucres réducteurs, en amidon et en hydrates de carbone solubles) ont été évalués selon les méthodes de l'AOAC (1980). Les teneurs en azote, en calcium, en potassium et en phosphore ont été déterminées respectivement selon les protocoles de l'AOAC (1980), de Bernad (1965), de Jackson (1973) et de Boltz (1958).

RESULTATS ET DISCUSSION

La prolifération des pousses sur les explants nodaux cultivés commence après un délai d'une à deux semaines. La première réaction des explants se manifeste par le développement et le déploiement des bourgeons axillaires. Dès la première semaine de culture, les bourgeons s'ouvrent chez 40 à 50 % des explants cultivés et, en 3 à 4 semaines, environ 80 % des explants présentent une prolifération des pousses. Les pousses ont une croissance vigoureuse, des entre-nœuds courts et des feuilles épaisses et vert foncé. Un explant primaire peut produire jusqu'à huit pousses utilisables huit semaines après la mise en culture. Ces pousses ont été excisées et utilisées comme boutures pour le racinement. Pour les cultures de prolifération des pousses, des micropousses individuelles ont été excisées et transférées dans le milieu de racinement. L'initiation des racines commence après 7 à 9 semaines de culture. Les microboutures qui ne racinent pas pendant cette période ne peuvent pas produire de racines même après cinq semaines de culture. Le pourcentage de racinement atteint 80 % après trois semaines de culture. Les racines obtenues sont saines, mesurent 4 à 5 cm de long et comportent plusieurs parties latérales. Pour optimiser la production de pousses, les cultures mères ont été transférées dans un nouveau milieu après récolte des pousses pour le racinement. De cette façon, les cultures mères ont été conservées sur plusieurs mois pour assurer une production continue de pousses.

Les plantules régénérées ont été transférées avec succès en mûraie, où elles ont repris leur croissance et se sont bien développées. Après une année, les plants obtenus *in vitro* et ceux obtenus par bouturage présentent des caractères morphologiques différents. Les données concernant les performances sur le terrain des plants cultivés *in vitro* et des plants obtenus par bouturage en fonction des différents paramètres de croissances sont récapitulées dans le tableau I.

Caractères morphologiques :

Hauteur : On a mesuré la hauteur (du niveau du sol au sommet de la tige) de 15 plants appartenant à trois génotypes (BSRM1, BSRM2 et S2) obtenus *in vitro* et par bouturage. Chez tous les génotypes, les plants obtenus par culture *in vitro* sont plus grands que les plants obtenus par bouturage. La hauteur est maximale (99,7 cm) pour les plants de S1 cultivés *in vitro* tandis que la valeur correspondante chez les plants du même génotype obtenus par bouturage est de 92,4. Chez les deux autres génotypes, les plants cultivés *in vitro* donnent de meilleurs résultats que les plants obtenus par bouturage. Une tendance similaire entre les plants issus de cultures tissulaires et les plants obtenus par bouturage conventionnel des arbres a été observée par Murashige (1978).

Nombre, surface et poids des feuilles : A l'exception de BSRM1, chez lequel les plants obtenus par culture *in vitro* donnent moins de feuilles par branche (24,5) que les plants obtenus par bouturage (26,9), pour les deux autres génotypes, le nombre de feuilles par branche est significativement plus élevé chez les plants *in vitro* (Tableau I). Pandey et Singh (1989) ont également observé le même type d'expression morphogénique chez des plants obtenus *in vitro* et par semis de *Carica papaya*.

Fréquence des stomates : Le nombre de stomates par champ microscopique chez les plants âgés d'un an est significativement plus élevé chez les feuilles de plants obtenus *in vitro* que chez celles de plants obtenus par bouturage. L'augmentation du nombre de stomates et de la surface foliaire favorise l'accélération du taux de photosynthèse, entraînant une meilleure vigueur des plants obtenus *in vitro*.

Conditions biochimiques et nutritives :

Les valeurs nutritives moyennes des feuilles de mûrier des trois génotypes obtenues par bouturage et par culture *in vitro* sont présentées dans le tableau II. Les composants nutritionnels des feuilles de mûrier diffèrent selon le génotype et selon le traitement. Ces différences variétales des composants nutritionnels chez le mûrier ont également été observées par Qader et coll. (1991).

Les plants de mûrier obtenus par la méthode *in vitro* présentent des teneurs légèrement plus élevées en minéraux totaux, en protéines, en sucres totaux, en sucres réducteurs, en amidon, en hydrates de carbone solubles, en azote, en potassium, en phosphore et en calcium chez les trois génotypes considérés sauf pour ce qui concerne la teneur en hydrates de carbone solubles chez le génotype S1. Pandey et Singh (1989) ont également observé une augmentation de la quantité de sucres totaux et de sucres réducteurs chez les plants obtenus par culture *in vitro* du papayer et Swartz (1981) a obtenu le même résultat chez le fraisier, ce qui corrobore nos observations.

EVALUATION OF LEAF GAS-EXCHANGE PARAMETERS OF FIVE CHINESE MULBERRY GERMPLASMS IN INDIAN TROPICAL CONDITIONS

S. CHATTOPADHYAY, C. DAS, T. SENGUPTA, J.K. GHOSH, K.K. DAS, S.K. SEN & T. PAVAN KUMAR

Mulberry Physiology Section, Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore 742 101, West Bengal, India.

*Effective physiological evaluation of exotic germplasms would be beneficial for the selection of varieties in future mulberry breeding programmes. In this study, the pigment composition and leaf-gas exchange parameters were compared among five Chinese germplasms of mulberry (*Morus alba* L.) along with an indigenous local check variety, Kajli. The Chinese germplasms showed overall superiority over Kajli and distinct genotypic variations were observed in all the tested attributes. The chlorophyll titre and photosynthesis rate (CER) were found maximum in China Black A, while China Black B had the highest transpiration rate (T) and stomatal conductance to water vapour (g). Excepting the physiological water use efficiency (pWUE), the CER had a moderate to very high correlation with all the tested parameters. Overall superiority with respect to chlorophyll, CER, pWUE and low quantum requirement (Φ^{-1}) indicated that the germplasm China Black A might be exploited in future breeding programmes for quality leaves.*

Keywords: Mulberry genotype, photosynthesis, chlorophyll, transpiration, physiological water use efficiency.

INTRODUCTION

The major breakthrough in genetic improvement in plants has come through the utilization of germplasms (Shivashankar, 1989). Although the yield potential of mulberry leaves has attained a commendable increase in the recent past, it is far from the satisfactory level (Susheclamma *et al.*, 1992). Consequently, evaluation of exotic germplasms may surely be an important tool for the improvement of mulberry, as it is regularly practiced in other plants (Paroda and Arora, 1986). Moreover, most of the previous breeding experiments emphasized higher leaf production, but not the quality and tolerance properties (Dandin, 1992). Photosynthetic efficiency, the only known energy input process, is considered as the most important qualitative character of a plant. On the other hand, co-ordination of gas-exchange and chloroplast activity are important to plant performance in any adverse biotic and abiotic environment (Castonguay and Markhart, 1992) and some of the gas-exchange parameters are used as (a) stable genotypic marker(s) for varietal screening programmes (Chaisompongpan, 1990).

Therefore, the specific objectives of this study were to (1) identify the chlorophyll composition and leaf gas-exchange parameter(s) that could be used as (a) genotypic marker(s) for germplasm selection in mulberry, and (2) select the photosynthetically most efficient Chinese germplasm in Indian tropical conditions.

MATERIALS AND METHODS

Five Chinese mulberry (*Morus alba* L.) germplasms, i.e., China Black A, China Black B, China Black C, China White, Canton China, along with a local check cultivar, Kajli, (most extensively used in the eastern part of India) were directly used from the germplasm bank of the Central Sericultural

Research and Training Institute, Berhampore. In that bank, plants of each variety, in 1.20×1.20 m spacing, were maintained with the usual cultural practices from 1983. The pruning at 0.75 m above the ground level was done at an interval of two years and maintained in high bush condition. At the time of experiment, the age of the plant was 60 days (after pruning). As our preliminary study indicated that the fifth leaf from the top had the highest photosynthetic efficiency (unpublished data), this leaf was taken as test material.

The chlorophyll titre was estimated according to Arnon (1949), while *in situ* leaf gas-exchange rates were measured by using a LI-COR 6200 portable photosynthesis system (LI-COR Inc., Lincoln, Nebraska, USA) with a 250 ml leaf chamber. All measurements were taken from 11:00 to 12:00 to minimize the diurnal variation in CER. Other parameters ranged between (1) photosynthetic photon flux density 900 to 1000 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, (2) air temperature 29 to 32 °C, (3) relative humidity 45-55%. At the time of each measurement the CO_2 concentration was near ambient, 300-400 $\mu\text{L L}^{-1}$. The pWUE was expressed as μmol of CO_2 fixed per mol of H_2O transpired. The Φ^{-1} to fix CO_2 was expressed as mol of photosynthetically active incident radiation absorbed per mol of CO_2 fixed.

Data were taken from three separate plants of the germplasm bank with three replications per plant. The results were analysed by analysis of variance and the critical difference values were estimated. The responses of chlorophyll and each gas-exchange variables were determined by simple correlation coefficient analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Chlorophyll compositions and leaf gas-exchange parameters significantly differed among the six germplasms (Table I). With respect to total chlorophyll content, CER, internal CO_2 concentration

Table I. Chlorophyll (Chl) composition, photosynthesis (A), stomatal conductance (g), transpiration (T), internal CO_2 concentration (Ci), physiological water use efficiency (pWUE) and quantum requirement (Φ^{-1}) of five Chinese germplasms along with a local check cultivar of mulberry.

Tableau I. Teneur en chlorophylle (Chl), photosynthèse (A), conductance stomatique (g), transpiration (T), concentration interne en CO_2 , efficacité d'utilisation physiologique de l'eau (pWUE) et besoins quantiques (Φ^{-1}) de cinq germoplasmes chinois et d'un cultivar local témoin de mûrier.

Name of the germplasms	Chlorophyll composition <i>Teneur en chlorophylle</i>			Leaf gas-exchange parameters <i>Paramètres d'échanges gazeux</i>					
	Chl a	Chl b	Total Chl <i>Chl totale</i>	A ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	g ($\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	T ($\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	Ci ($\mu\text{L L}^{-1}$)	pWUE ($\mu\text{mol mmol}^{-1}$)	Φ^{-1}
China Black A	13.79	4.67	18.46	15.76	0.785	0.0262	335.9	0.602	75.71
China Black B	11.64	3.41	15.06	14.75	2.898	0.0501	359.2	0.295	75.61
China Black C	10.04	3.53	13.57	12.22	1.504	0.0461	365.2	0.265	98.50
China White	10.06	2.89	12.95	10.56	2.089	0.0283	334.3	0.373	111.00
Canton China	8.48	2.68	11.15	10.48	1.525	0.0351	364.2	0.298	103.62
Kajli	7.55	2.81	10.35	4.65	0.131	0.0114	293.8	0.408	182.50
CD at 5%	0.68	0.40	0.96	0.70	0.133	0.001	11.6	0.028	13.03
CD at 1%	0.96	0.56	1.34	0.98	0.187	0.0014	16.2	0.039	18.27

Ci), g and Φ^{-1} , all the Chinese germplasms had superiority over the local cultivar, Kajli. The maximum CER was observed in China Black A, 3.4 fold over Kajli. It also appeared that the total chlorophyll level rather than the individual one was more directly related with the CE, while the maximum g and T were observed in China Black B over Kajli. The low CER of Kajli can be explained, at least partly, by a very low g due to stomatal closure, which limited CO₂ entrance and resulted in a decline in the available Ci for photosynthesis. A similar situation was also observed in other plants (Irigoyen *et al.*, 1992). The chlorophyll content, when expressed on a unit weight basis, ranges between 1.792 and 1.062 mg g⁻¹ fresh weight, while the leaf area ranges between 92 and 198 cm² (data unpublished). Although the titre of chlorophyll per unit leaf was much lower than in mulberry varieties maintained in temperate areas (Lou *et al.*, 1990), a similar level of chlorophyll per unit weight was reported from different mulberry varieties cultivated in Indian tropical conditions (Dorcus and Vivekanandan, 1991). It may be due to the high bush nature, age condition and comparatively less frequent pruning schedule of our tested germplasm bank.

The CER had a high positive correlation with the total chlorophyll ($r = 0.87$), while negatively related with Φ^{-1} ($r = -0.97$) (Table II). This suggests that the study of one parameter can be indicative of the other and either one of the parameters can be used as a screening tool of mulberry germplasms. On the other hand, different plant breeding programmes have been initiated in other crops for identifying breeding lines with high WUE in rainfed conditions (Barker *et al.*, 1989; Johnson, 1980). But our study indicated that pWUE had a poor correlation with the CER ($r = 0.2$) and only moderate correlation with T ($r = 0.58$). It suggests that the genotypic selection for higher WUE alone may not be an indication of photosynthetically efficient germplasm in mulberry.

Table II. Simple correlation matrix of total chlorophyll and different gas exchange parameters of six mulberry germplasms.

Tableau II. Matrice de corrélation simple pour la chlorophylle totale et différents paramètres d'échanges gazeux de six germoplasmes de mûrier.

	A	Chl	g	Ci	T	pWUE	Φ^{-1}
A	1.00	0.87	0.54	0.67	0.66	0.20	-0.97
Chl		1.00	0.19	0.25	0.28	0.58	-0.74
g			1.00	0.68	0.81	-0.53	-0.64
Ci				1.00	0.89	-0.48	-0.78
T					1.00	-0.59	-0.74
pWUE						1.00	-0.05
Φ^{-1}							1.00

A: Photosynthesis / *Photosynthèse*. Chl: Total chlorophyll / *Chlorophylle totale*. g: Stomatal conductance / *Conductance stomatique*. Ci: Internal CO₂ concentration / *Concentration interne en CO₂*. T: Transpiration. pWUE: Physiological water use efficiency / *Efficacité d'utilisation physiologique de l'eau*. Φ^{-1} : Quantum requirement / *Besoins quantiques*.

The distinct genotypic variation of the tested leaf gas exchange parameters clearly indicates that these may be used as (a) physiological marker(s) for qualitative germplasm screening programmes. Moreover, high photosynthetic efficiency with low energy requirement for CO₂ fixation and high water use capacity of China Black A claim strongly its inclusion in the future breeding programme for quality leaves.

REFERENCES

- ARNON D.I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol., 24, 1-15.
- BARKER R.E., FRANK A.B., BERDAHL J.D. (1989) Cultivar and clonal differences for water use efficiency and yield in four forage grasses. Crop Sci., 29, 58-61.
- CASTONGUAY Y., MARKHART A.H. (1992) Leaf gas exchange in water-stressed common bean and tapary bean. Crop Sci., 32, 980-986.
- CHAISSOMPONGPAN N., LI P.H., DAVIS D.W., MARKHART A.H. (1990) Photosynthetic responses to heat stress in common bean genotypes differing in heat acclimation potential. Crop Sci., 30, 100-104.
- DANDIN S.B. (1992) Methods of mulberry breeding for tropics. In Proc. Natl. Conference on 'Mulberry Sericulture Research', Central Sericult. Res. & Training Inst., Mysore, India.
- DORCUS D., VIVEKANANDAN M. (1991) Screening of mulberry varieties for rainfed conditions. Sericologia, 31, 233-241.
- IRIGOYEN J.J., EMERICH D.W., SANCHEZ-DIAZ M. (1992) Alfalfa leaf senescence induced by drought stress: Photosynthesis, hydrogen peroxide metabolism, lipid peroxidation and ethylene evolution. Physiol. Plant., 84, 67-72.
- JOHNSON D.A. (1980) Improvement of perennial herbaceous plants for drought-stressed western range lands. In Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress. Eds. N.C. Turner and P.J. Kramer, John Wiley & Sons, New York, pp. 419-433.
- LOU C., HOMMA A., KUNO K. (1990) Effects of nickel concentration on growth, photosynthetic rate in mulberry cuttings. J. Sericult. Sci. Japan, 60, 192-199.
- PARODA R.S., ARORA R.K. (1986) Plant genetic resources and their conservation — Indian perspective. In Conservation for Productive Agriculture. Eds. V.L. Chopra and T.N. Khoshoo. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi, pp. 73-82.
- SHIVASHANKAR G. (1989) Improvement and utilization of mulberry germplasm. In Genetic Resources of Mulberry and Utilization. Eds. K. Sengupta and S.B. Dandin, Central Sericult. Res. & Training Inst., Central Silk Board, Mysore, pp. 1-3.
- SUSHEELAMMA B.N., KUMAR J.S., SIKDAR A.K., DANDIN S.B., JOLLY M.S., SENGUPTA K. (1992) Exploitation of promising mulberry germplasm genotypes for yield potentiality. Sericologia, 32, 295-300.

EVALUATION DES PARAMETRES D'ECHANGES GAZEUX DES FEUILLES DE MURIER DE CINQ LIGNEES CHINOISES EN MILIEU TROPICAL INDIEN

S. CHATTOPADHYAY, C. DAS, T. SENGUPTA, J.K. GHOSH, K.K. DAS, S.K. SEN & T. PAVAN KUMAR

Mulberry Physiology Section, Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore 742 101, West Bengal, Inde.

*L'évaluation physiologique effective des lignées exotiques permet de faciliter la sélection des variétés lors de programmes de sélection du mûrier. Dans cette étude, on a comparé la composition des pigments et les paramètres d'échanges gazeux des feuilles de cinq lignées chinoises de mûrier (*Morus alba* L.) et d'une variété témoin indigène, Kajli. Les lignées chinoises se révèlent globalement supérieures à Kajli et on observe des variations génotypiques distinctes pour tous les paramètres considérés. La teneur en chlorophylle et le taux de photosynthèse sont maximaux chez China Black A, alors que le taux de transpiration et la conductance stomatique de la vapeur d'eau sont maximaux chez China Black B. Le taux de photosynthèse présente une corrélation moyenne à très forte avec tous les paramètres considérés, à l'exception de l'efficacité de l'utilisation physiologique de l'eau. La supériorité globale de China Black A observée pour ce qui concerne la chlorophylle, le taux de photosynthèse, l'utilisation physiologique de l'eau et les besoins quantiques (Φ^{-1}) indique que cette variété peut être exploitée dans des programmes de sélection pour obtenir des feuilles de qualité.*

INTRODUCTION

L'utilisation des germoplasmes a constitué une percée capitale dans l'amélioration génétique des plantes (Shivashankar, 1989). Bien que le potentiel de rendement des mûriers ait été augmenté de manière appréciable au cours de ces dernières années, il n'a pas encore atteint un niveau satisfaisant (Susheclamma et coll., 1992). L'évaluation de germoplasmes exotiques doit sûrement être un outil important pour l'amélioration du mûrier car cette méthode est appliquée couramment pour d'autres cultures (Paroda et Arora, 1986). De plus, la plupart des expériences de sélection déjà réalisées portent sur l'augmentation de la production et non sur l'amélioration de la qualité et des propriétés de tolérance (Dandin, 1992). L'efficacité de la photosynthèse, qui est le seul processus d'apport énergétique connu, est considérée comme le paramètre qualitatif le plus important de la plante. Par ailleurs, la coordination des échanges gazeux et de l'activité des chloroplastes est essentielle pour la performance de la plante en milieu biotique ou abiotique défavorable (Castonguay et Markhart, 1992) ; certains paramètres d'échanges gazeux sont utilisés comme marqueur(s) génotypique(s) stable(s) dans les programmes de sélection variétale (Chaisompongpan, 1990).

Cette étude a donc pour objectif spécifique, en premier lieu, d'étudier la composition de la chlorophylle et les paramètres d'échanges gazeux susceptibles de servir de marqueur(s) génotypique(s) pour la sélection de lignées de mûrier et, en second lieu, de sélectionner le germoplasme chinois dont la photosynthèse est la plus efficace en milieu tropical indien.

MATERIELS ET METHODES

Cinq germoplasmes chinois de mûrier (*Morus alba* L.), à savoir China Black A, China Black B, China Black C, China White, Canton China, ainsi qu'un cultivar témoin local, Kajli, (utilisé de manière extensive dans l'est de l'Inde) ont été utilisés directement à partir de la banque génétique du Central Sericultural Research and Training Institute de Berhampore. Dans cette banque, les plants de chacune des variétés (espacement de 1,20 × 1,20 m) ont été cultivés selon les pratiques culturales habituelles à partir de 1983. La taille a été réalisée à 0,75 m du sol tous les deux ans pour maintenir

les plants en arbustes hauts. Au moment de l'expérience, les plants avaient été taillés depuis 60 jours. Nos études préliminaires ayant indiqué que la cinquième feuille à partir du sommet présente l'efficacité de photosynthèse la plus élevée (données non publiées), cette feuille a été utilisée comme matériel expérimental.

La teneur en chlorophylle a été estimée d'après la méthode d'Arnon (1949), tandis que les taux d'échanges gazeux *in situ* ont été mesurés à l'aide d'un système de photosynthèse portable LI-COR 6200 (LI-COR Inc., Lincoln, Nebraska, Etats-Unis) avec une chambre foliaire de 250 ml. Toutes les mesures ont été relevées entre 11h00 et 12h00 pour minimiser les variations diurnes du taux de photosynthèse. Pour ce qui concerne les autres paramètres, la densité du flux synthétique varie de 900 à 1300 $\mu\text{moles photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, la température de l'air se situe entre 29 et 32 °C et l'humidité relative entre 45 et 55 %. Lors du relevé des mesures, la concentration en CO_2 était proche des conditions ambiantes, soit 300 à 400 $\mu\text{L/L}$. L'utilisation physiologique de l'eau est exprimée en $\mu\text{moles de CO}_2$ fixé par mole de H_2O transpirée. Les besoins quantiques servant à fixer le CO_2 sont exprimés en moles de radiations incidentes à photosynthèse active absorbées par mole de CO_2 fixé.

Les données ont été relevées sur trois plants de la banque génétique avec trois répétitions par plant. Les résultats ont été soumis à une analyse de variance et les valeurs des intervalles de confiance ont été estimées. Les réponses de la chlorophylle et des paramètres d'échanges gazeux ont été déterminées en appliquant une analyse des coefficients de corrélation simples.

RESULTATS ET DISCUSSION

La composition en chlorophylle et les paramètres d'échanges gazeux diffèrent de manière significative entre les six lignées (Tableau I). Pour ce qui concerne la teneur en chlorophylle totale, le taux de synthèse, la concentration en CO_2 interne (C_i), la conductance stomatique et les besoins quantiques, les lignées chinoises se révèlent toutes supérieures au cultivar local Kajli. Le taux de synthèse est supérieur de 3,4 fois chez China Black A à celui observé chez Kajli. La teneur en chlorophylle totale, plus que la teneur en chlorophylle individuelle, est directement liée au taux de photosynthèse, tandis que China Black B présente la conductance stomatique et le taux de transpiration maximaux par rapport à Kajli. Le taux de photosynthèse faible observé chez Kajli peut s'expliquer, du moins partiellement, par une conductance stomatique très faible due à la fermeture des stomates qui limite l'entrée du CO_2 et entraîne une diminution du C_i disponible pour la photosynthèse. Ce phénomène a également été observé chez d'autres plantes (Irigoyen et coll., 1992). La teneur en chlorophylle exprimée sur la base du poids unitaire varie de 1,792 à 1,062 mg g^{-1} de poids frais tandis que la surface foliaire varie de 92 à 198 cm^2 (données non publiées). Bien que la teneur en chlorophylle par surface foliaire soit inférieure à celle des variétés de mûrier cultivées en milieu tempéré (Lou et coll., 1990), on a observé une teneur comparable en chlorophylle chez des variétés de mûrier différentes cultivées en milieu tropical indien (Dorcus et Vivekanandan, 1991). Ceci pourrait être dû au type de plantation en arbuste haut, à l'âge et au calendrier comparativement plus espacé des tailles de la banque génétique utilisée dans nos expériences.

Le taux de photosynthèse présente une corrélation positive élevée avec la chlorophylle totale ($r = 0,87$) et une corrélation négative avec les besoins quantiques ($r = -0,97$) (Tableau II). Ceci suggère que l'étude d'un paramètre peut être révélatrice de l'autre paramètre et que ces deux paramètres peuvent indifféremment être utilisés comme outils de sélection des lignées de mûrier. Par ailleurs, des programmes de sélection des plantes ont été mis en place pour d'autres cultures afin d'identifier des lignées de sélection présentant une utilisation physiologique de l'eau élevée en régime pluvial (Barker et coll., 1989 ; Johnson, 1989). Cependant, notre étude montre que l'utilisation physiologique de l'eau présente une corrélation faible avec le taux de photosynthèse ($r = 0,2$) et une corrélation moyenne avec le taux de transpiration ($r = 0,58$). Ceci suggère qu'une sélection génotypique portant uniquement sur l'utilisation physiologique de l'eau ne suffit pas pour déterminer les lignées efficaces au niveau de la photosynthèse chez le mûrier.

La forte variation génotypique des paramètres d'échanges gazeux considérés indique que ceux-ci peuvent servir de marqueurs physiologiques dans les programmes de sélection de lignées de qualité. De plus, la photosynthèse élevée, les faibles besoins en énergie pour la fixation du CO_2 et la forte capacité d'utilisation de l'eau de China Black A nous conduisent à conseiller fortement son inclusion dans les programmes de sélection visant à obtenir des feuilles de qualité chez le mûrier.

EFFECTS OF HOST GENOTYPES, SHOOT AGE AND CLIMATIC CONDITIONS ON THE DEVELOPMENT OF *PHYLLACTINIA CORYLEA* IN MULBERRY

S. BISWAS*, K.K. DAS, S.K. MANDAL & S.K. SEN

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

*The powdery mildew disease caused by *Phyllactinia corylea* (= *P. moricola*) developed well in all 10 high-yielding mulberry varieties of the Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, West Bengal. However, amongst them, C1729 and S799 showed comparatively resistant. The disease intensity was significantly less in two-month-old shoots than in three-month-old ones. During the experimental period (May 1991-April 1993), the disease was found negligible in the months February to July, while it was very high in October to January. Of the 6 abiotic factors studied, maximum temperature and minimum relative humidity of the days and the number of rainy days were found to be correlated with the disease.*

Keywords: Mulberry, *Phyllactinia corylea*, disease development, host genotypes, shoot age, climatic conditions.

INTRODUCTION

Phyllactinia corylea (Pers) Karst (syn. *P. moricola*), the mulberry powdery mildew fungus, causes severe damage to the foliage (Anonymous, 1968-69; Suryanarayan and Ganesh, 1969; Noamani *et al.*, 1970). It occurs during September to March in tropical regions and from spring to autumn in temperate regions (Itoi *et al.*, 1964; Krishnaprasad and Siddaramaiah, 1979). Itoi *et al.* (1962) reported that a temperature below 25 °C and atmospheric humidity of 80% favoured the development and spread of the disease. However, so far, due attention has not been given to understand its occurrence in subtropical regions and the role of other abiotic and biotic factors on its development. Hence, in this investigation the occurrence of the disease in different months in West Bengal and the effects of different factors of climatic condition, host genotypes and shoot age were studied.

MATERIALS AND METHODS

One-year-old potted plants (pot's size: 40 cm diameter) of ten high-yielding mulberry varieties, i.e., C763, C776, C1729, C1730, S1, S799, S1635, Tr4 and Tr10, of the Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, were considered for this study. The plants of 150 pots were kept in simple randomized design in a vacant place of the research farm and were pruned after 60 to 90 days in such a way that 2-month- and 3-month-old shoot plants of each with 3 replications were available in every month, respectively. The fertilizer schedule was 300 kg nitrogen, 180 kg phosphate and 120 kg potash/ha/yr in four equal split doses and the amounts were calculated considering the surface area of pot's soil. Irrigation to the potted plants was given as and when necessary depending upon the soil moisture content. The disease was appraised regularly following the method of Biswas *et al.* (1992) at monthly intervals from the first week of June 1991 to the first week of May 1993 and was considered as the effect of the preceding month in each case. The prevailing atmospheric conditions were noted regularly during the period of observation and were correlated with the disease.

* Present address: Regional Sericultural Research Station, Kalimpong - 734 301, West Bengal, India.

RESULTS AND DISCUSSION

Phyllactinia corylea developed well in all 10 high-yielding mulberry varieties of the Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore. However, amongst them, C1729 and S799 were found to be comparatively resistant to the disease (Table I, Fig. 1). This result is in conformity with our earlier findings (Biswas *et al.*, 1993). The disease intensity was significantly less in two-month-old shoot plants (2MSP) than in three-month-old ones. The lesser disease intensity in 2MSP may be on account of more resistant young leaves in these (Bell, 1981). The development of the disease was markedly affected by the seasonal variation (Fig. 2). During the experimentation (May 1991 to April 1993) in West Bengal, the disease intensity was negligible in the months February to July, thereafter it started to increase in August and September and remained very high in October to January.

Table I. Analysis of variance for powdery mildew disease intensities (% disease index) from ten mulberry varieties, after square root transformation $[(x + 1)^{1/2}]$ of the raw data.

Tableau I. Analyse de variance pour l'intensité de l'oïdium (en pourcentage de maladie) chez 10 variétés de mûrier après transformation des données brutes en racines carrées $[(x + 1)^{1/2}]$.

Factor	Degree of freedom	Mean squares	F value
<i>Facteur</i>	<i>Degrés de liberté</i>	<i>Carrés moyens</i>	<i>Valeur de F</i>
Shoot age (SA) / Age de la pousse (SA)	1	214.62	336.31**
Month (M) / Mois (M)	23	269.64	422.53**
Variety (V) / Variété (V)	9	15.10	23.67
SA × M	23	27.80	43.56**
SA × V	9	1.87	2.92**
M × V	207	3.28	5.14**
SA × V × M	207	1.65	2.58**
Error / Ecart	960	0.64	

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

The effects of abiotic factors like maximum temperature, minimum temperature, maximum relative humidity percentage, minimum relative humidity percentage of the days (all average on month), total monthly rainfall and number of rainy days in a month on average disease intensity (PDI) in that month were estimated separately for each variety of mulberry, using regression tools. There, it was found that average maximum temperature, average minimum relative humidity and number of rainy days affected disease development significantly. An exponential relationship $[y = C \cdot \exp. (a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3) - 1]$ with these three factors was found to be the best fit for all the varieties with a significant ($P < 0.01$) coefficient of determination (R^2) ranging between 0.54 and 0.75 against 20 degrees of freedom (Table II). Moreover, a significant increase in R^2 was not possible by inclusion

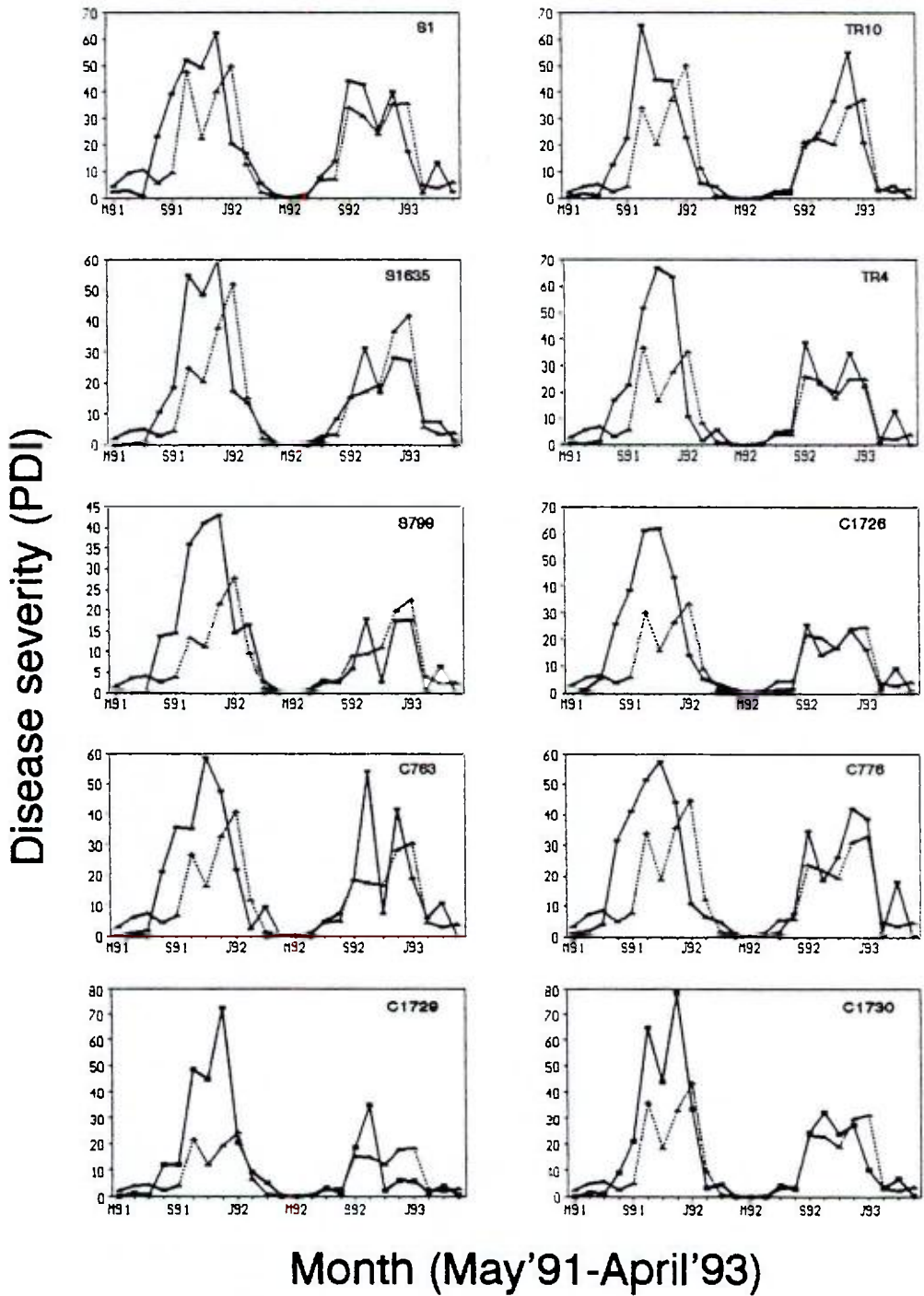


Fig. 1: Powdery mildew disease severity in ten mulberry varieties.

Fig. 1 : Intensité de l'oïdium chez dix variétés de mûrier.

—■— Observed PDI / Intensité observée ; ...▲... Predicted PDI / Intensité estimée.

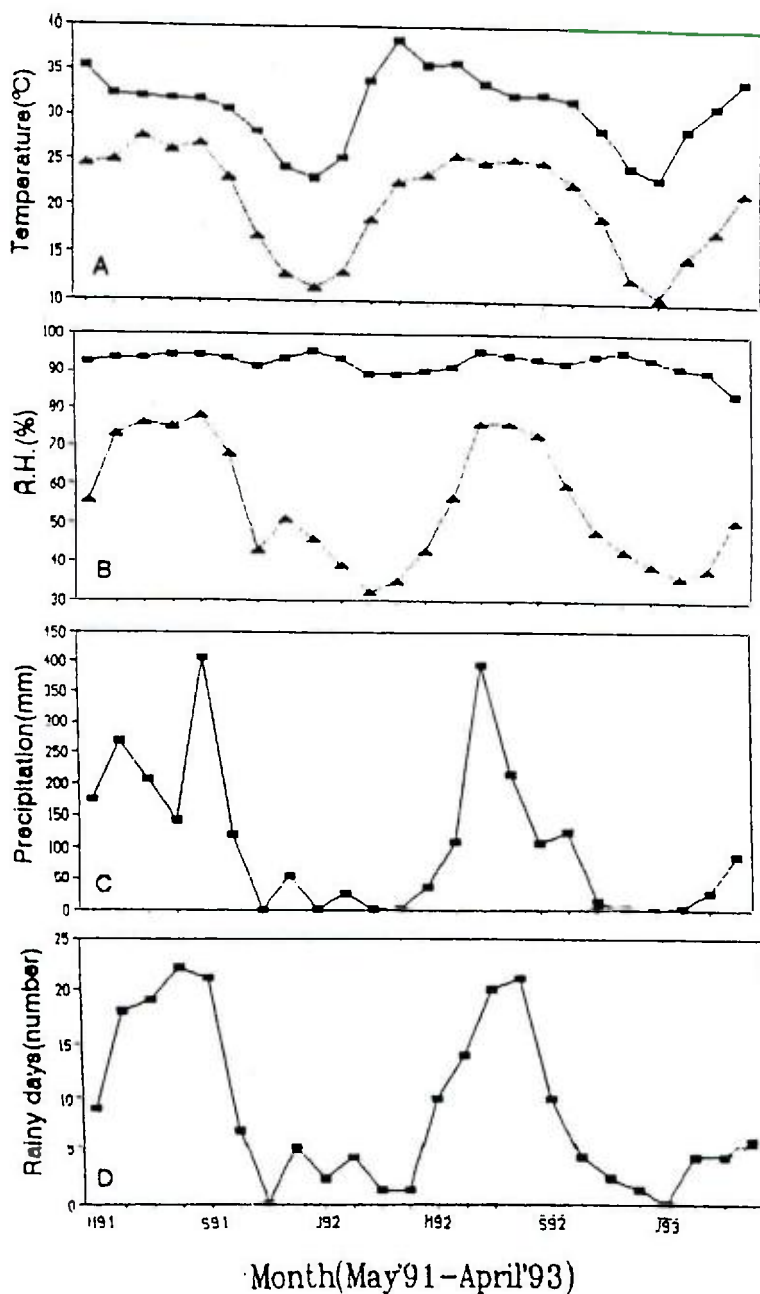


Fig. 2: Meteorological conditions during the powdery mildew disease development study in mulberry.

A: Temperature (■ maximum; ▲ minimum); B: Relative humidity (■ maximum; ▲ minimum); C: Total rainfall; D: Number of rainy days per month.

Fig. 2 : Conditions météorologiques au cours de l'étude sur le développement de l'oidium chez le mûrier.

A: Température (■ maximale; ▲ minimale); B: Humidité relative (■ maximale; ▲ minimale); C: Pluviosité totale; D: Nombre de jours de pluie par mois.

Table II. Regression equations of *Phyllactinia corylea* disease intensity for different mulberry varieties, fitted with maximum temperature, minimum relative humidity and number of rainy days.

Tableau II. Equations de régression de l'intensité de Phyllactinia corylea pour différentes variétés de mûrier calculées en fonction de la température maximale, l'humidité relative minimale et le nombre de jours de pluie.

Variety Variété	Regression equation Equation de régression	R ²
C1726	$\log_e (y + 1) = 3.57 - 0.16x_1 - 0.16x_2 + 0.09x_3$	0.58
C776	$\log_e (y + 1) = 4.55 - 0.18x_1 - 0.14x_2 + 0.08x_3$	0.58
C763	$\log_e (y + 1) = 4.88 - 0.19x_1 - 0.13x_2 + 0.08x_3$	0.54
Tr4	$\log_e (y + 1) = 3.16 - 0.16x_1 - 0.18x_2 + 0.10x_3$	0.57
Tr10	$\log_e (y + 1) = 4.67 - 0.20x_1 - 0.18x_2 + 0.09x_3$	0.75
S1635	$\log_e (y + 1) = 5.77 - 0.20x_1 - 0.15x_2 + 0.07x_3$	0.70
C1730	$\log_e (y + 1) = 4.03 - 0.19x_1 - 0.18x_2 + 0.10x_3$	0.70
C1729	$\log_e (y + 1) = 3.28 - 0.15x_1 - 0.16x_2 + 0.08x_3$	0.56
S1	$\log_e (y + 1) = 3.89 - 0.17x_1 - 0.16x_2 + 0.09x_3$	0.64
S799	$\log_e (y + 1) = 5.29 - 0.19x_1 - 0.11x_2 + 0.06x_3$	0.56

y: average PDI; x_1 : average maximum temperature; x_2 : number of rainy days; x_3 : average minimum relative humidity.

y: pourcentage moyen de la maladie; x_1 : température maximale moyenne; x_2 : nombre de jours de pluie; x_3 : humidité relative moyenne.

of other abiotic parameters as causal factors. The month-wise observed and predicted average PDI for each variety indicated that the maximum temperature range, 23-30.6 °C, minimum relative humidity percentage, 39-68%, and number of rainy days, 0-7 per month, are the most favourable conditions for the disease.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1968-69) Annual Administrative and Scientific Report. Central Sericultural Research and Training Institute, Central Silk Board, Mysore, p. 139.
- BELL A.A. (1981) Biochemical mechanism of disease resistance. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 32, 21-81.
- BISWAS S., TEOTIA R.S., MANDAL S.K. (1992) Some field observations on the severity of powdery mildew (*Phyllactinia corylea*) in mulberry. *Indian J. Seric.*, 31, 67-69.
- BISWAS S., MANDAL S.K., CHINYA P.K. (1993) Development of powdery mildew disease in mulberry and its control. *Sericologia*, 33, 653-662.
- ITOI S., NAKAYAMA K., KUBOMURA Y. (1962) Studies on the powdery mildew disease of mulberry tree caused by *Phyllactinia moricola*. *Bull. Sericult. Exp. Sta.*, Tokyo, 17, 433-445.
- ITOI S., NAKAYAMA K., KUBOMURA Y. (1964) The spread of mulberry powdery mildew and the control of the first outbreak by eradicating perithecia. *Bull. Sericult. Exp. Sta.*, Tokyo, 18, 545-558.
- KRISHNAPRASAD K.S., SIDDARAMAIAH A.L. (1979) Studies on the development of powdery mildew disease of mulberry in Karnataka. *Indian J. Seric.*, 18, 9-13.
- NOAMANI M.K.R., MUKHERJEE P.K., KRISHNASWAMI S. (1970) Studies on the effect of feeding of multivoltine silkworm (*Bombyx mori*) larvae with mildew-affected leaves. *Indian J. Seric.*, 9, 49-52.
- SURYANARAYAN S.K., GANESH N.K. (1969) Preliminary observations on the effect of feeding silkworm with mildew-affected leaves. *Silkworm Information Bull.*, 1, 62-67.

EFFET DU GENOTYPE DE L'HÔTE, DE L'ÂGE DE LA POUSSE ET DES CONDITIONS CLIMATIQUES SUR LE DEVELOPPEMENT DE *PHYLLACTINIA CORYLEA* CHEZ LE MURIER

S. BISWAS*, K.K. DAS, S.K. MANDAL & S.K. SEN

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

*L'oïdium du mûrier, causé par *Phyllactinia corylea* (= *P. moricola*), se développe bien chez dix variétés de mûrier performantes du Central Sericultural Research and Training Institute de Berhampore (Bengale occidentale). Cependant, parmi celles-ci, C1729 et S799 s'avèrent comparativement résistantes. L'intensité de la maladie est significativement plus faible chez les pousses âgées de deux mois que chez les pousses âgées de trois mois. Au cours de la période expérimentale (mai 1991 à avril 1993), l'intensité de la maladie est négligeable de février à juillet et très élevée d'octobre à janvier. Sur les six facteurs abiotiques considérés, la température maximale et l'humidité relative minimale pendant la journée et le nombre de jours de pluie sont corrélés avec la maladie.*

INTRODUCTION

Phyllactinia corylea (Pers) Karst (synonyme : *P. moricola*), champignon responsable de l'oïdium du mûrier, entraîne des dommages importants pour le feuillage (Anonyme, 1968-1969 ; Suryanarayan et Ganesh, 1969 ; Noamani et coll., 1970). Il est présent entre septembre et mars en milieu tropical et du printemps à l'automne en milieu tempéré (Itoi et coll., 1964 ; Krishnaprasad et Siddaramaiah, 1979). Itoi et coll. (1962) ont observé qu'une température inférieure à 25 °C et une humidité atmosphérique supérieure à 80 % favorisaient le développement et la propagation de la maladie. Cependant, on s'est peu intéressé, jusqu'à présent, à l'étude de sa présence dans les régions subtropicales ou au rôle des autres facteurs abiotiques et biotiques dans son développement. Cet article décrit donc la présence de la maladie au cours des différents mois dans le Bengale occidental et les effets de différents facteurs liés aux conditions climatiques, aux génotypes de l'hôte et à l'âge de la pousse.

MATERIELS ET METHODES

On a utilisé pour cette étude des plants en pot (pots de 40 cm de diamètre) âgés d'un an de dix variétés de mûrier performantes, à savoir C763, C776, C1729, C1726, C1730, S1, S799, S1635, Tr4 et Tr10, cultivées au Central Sericultural Research and Training Institute de Berhampore. Cent cinquante plants en pots, conservés selon la méthode aléatoire simple dans un endroit vacant de la ferme expérimentale, ont été taillés après 60 et 90 jours, de telle façon que des plants avec des pousses âgées de deux et trois mois, en trois répétitions, soient disponibles chaque mois. La méthode de fumure est de 300 kg d'azote, 180 kg de phosphate et 120 kg de potasse/ha/an en quatre doses égales ; les quantités ont été calculées en tenant compte de la surface du terreau contenu dans les pots. Les pots ont été irrigués suivant les besoins, en fonction de la teneur en eau du terreau. La maladie a été évaluée régulièrement suivant la méthode de Biswas et coll. (1992) à intervalles d'un mois entre la première

* Adresse actuelle : Regional Sericultural Research Station, Kalimpong - 734 301, West Bengal, Inde.

semaine de juin 1991 et la première semaine de mai 1993 ; les observations relevées ont été prises comme l'effet du mois précédent dans chaque cas. Les conditions atmosphériques ont été relevées régulièrement au cours de la période d'observation et ont été corrélées avec la maladie.

RESULTATS ET DISCUSSION

Phyllactinia corylea se développe bien chez les dix variétés de mûrier performantes du *Central Sericultural Research and Training Institute* de Berhampore. Cependant, C1729 et S799 s'avèrent comparativement résistantes à la maladie (Tableau I, Fig. 1). Ce résultat confirme nos observations antérieures (Biswas et coll., 1993). L'intensité de la maladie est nettement plus faible chez les plants dont les pousses sont âgées de deux mois que chez ceux dont les pousses sont âgées de trois mois. L'intensité plus faible de la maladie chez les plants dont les pousses sont âgées de deux mois pourrait être due à une meilleure résistance des jeunes feuilles chez ces plants (Bell, 1981). Le développement de la maladie est fortement influencé par les variations saisonnières (Fig. 2). Au cours de la période expérimentale (mai 1991 à avril 1993), l'intensité de la maladie dans le Bengale occidental est négligeable de février à juillet puis elle commence à augmenter en août et en septembre et se maintient à un niveau élevé d'octobre à janvier.

Les effets des facteurs abiotiques, à savoir température maximale, température minimale, pourcentage maximal d'humidité relative, pourcentage minimal d'humidité relative pendant la journée (données présentées en moyennes mensuelles), pluviométrie mensuelle totale et nombre de jours de pluie par mois, sur l'intensité moyenne de la maladie au cours d'un mois donné ont été estimés individuellement pour chaque variété de mûrier à l'aide des équations de régression. La température maximale moyenne, l'humidité relative minimale moyenne et le nombre de jours de pluie ont un effet significatif sur le développement de la maladie. Une relation exponentielle [$y = C \cdot \exp. (a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3) - 1$] avec ces trois facteurs s'avère la mieux appropriée à toutes les variétés avec un coefficient de détermination (R^2) significatif ($P < 0.01$) situé entre 0,54 et 0,75 pour 20 degrés de liberté (Tableau II). De plus, il n'est pas possible d'obtenir une augmentation significative de R^2 en incluant d'autres paramètres abiotiques comme facteurs causatifs. Les pourcentages mensuels d'intensité moyenne de la maladie observés et estimés pour chaque variété indiquent que les fourchettes de température maximale entre 23 et 30,6 °C, d'humidité relative minimale entre 39 et 68 % et de nombre de jours de pluie par mois entre 0 et 7 forment les conditions les plus favorables à la maladie.

INFLUENCE OF HOST GENOTYPES, SHOOT AGE AND CLIMATIC CONDITIONS ON THE DEVELOPMENT OF *PSEUDOCERCOSPORA MORI* IN MULBERRY

S. BISWAS*, N.K. DAS & T. PAVAN KUMAR

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

The amphigenous spots on the ventral surface of mulberry leaves caused by Pseudocercospora mori (Hara) Deighton developed well in all 10 high-yielding mulberry varieties of the Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore. However, amongst them, C763, C1726, S1635, Tr4 and Tr10 were found to be comparatively less affected by the disease. The disease intensity was significantly less in the leaves with oldest one of 50 days of 2-month-old shoots than in the leaves with oldest one of 80 days of 3-month-old shoots. During the experimental period, from April 1991 to March 1993, the disease was found to be negligible in the months from February to May, while it was higher from August to December. A quadratic exponential relationship $[y = C \cdot \exp(a_1x_1 + a_2x_1^2 + b_1x_2 + b_2x_2^2) - 1]$ with monthly average maximum and minimum temperatures was found to be the best fit to the disease and, based on that, the development of the disease was predicted for all the varieties over all months of a year. The average maximum temperature ranging between 28.5 and 30.6 °C and minimum temperature between 19.0 and 23.0 °C were found to be the most suitable for the disease.

Keywords: Mulberry, *Pseudocercospora mori*, disease development, host genotypes, shoot age, climatic conditions.

INTRODUCTION

Pseudocercospora mori (Hara) Deighton (syn. *Cercospora mori* Hara), the mulberry leaf spot fungus, has been reported to occur widely all over the world (Munjal *et al.*, 1959; Deighton, 1976; Srivastava *et al.*, 1978; Hsieh and Goh, 1990). It appears in mulberry on the ventral surface of the leaf as small gray to brown-coloured hyphal mats and later forms necrotic lesions on the dorsal surface. Mulberry leaves affected by this fungus are not suitable for silkworm rearing and fall early due to premature ripening. During the recent survey on mulberry diseases in the major sericultural districts of West Bengal, India, conducted by the Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, the senior author observed that the disease (considered as an unknown fungus of the leaf spot disease) occurs abundantly in all mulberry fields and causes severe damage to the foliage (Anonymous, 1991-92). Morphological descriptions of the fungus have been worked out by Deighton (1976) and Hsieh and Goh (1990). However, so far, no further research work has been done on the disease. The present study reports the development of the pathogen in some high-yielding mulberry varieties under different climatic conditions and of different leaf ages.

MATERIALS AND METHODS

One-year-old plants (pots' size: 40 cm diameter) of ten high-yielding mulberry varieties, i.e., C763, C776, C1726, C1729, C1730, S1, S799, S1635, Tr4 and Tr10, of the Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, were considered for this study. The plants of 150 pots, which

* Present address: Regional Sericultural Research Station, Kalimpong - 734 301, West Bengal, India.

were kept in a simple randomized design in a vacant place of the research farm, were pruned after 60 and 90 days of intervals in such a way that 2- and 3-month-old shoots with three replications of each variety were available in every month, respectively. The fertilizer schedule was 3.41 g nitrogen, 2.04 g phosphate and 1.36 g potash per pot with 20 kg of soil per year in four equal split doses. Irrigation to the potted plants was given as and when necessary, depending upon the soil moisture content. The disease was visually scored on a 0-5 scale (Siddaramaiah *et al.*, 1978) which was used to compute the disease index, following the method described by Biswas *et al.* (1993), regularly at monthly intervals from the first week of May 1991 to the first week of April 1993, and this was considered as the effect of the preceding month in each case. The prevailing atmospheric conditions were noted daily during the period of observations and were correlated with the disease.

RESULTS AND DISCUSSION

Pseudocercospora mori (IMI-358575) appeared in mulberry as small, gray to brown-coloured hyphal mats, i.e., a mildew-like appearance, consisting of geniculate and fasciculate conidiophores with conidia on the abaxial surface of the leaf (Fig. 1). They subsequently coalesced each other and concomitant deep brown-coloured spots developed on the dorsal surface and finally, before falling, the entire leaf turned yellow with dark amphigenous spots. The disease developed well in all ten high-yielding varieties. However, amongst them, C763, C1726, S1635, Tr4 and Tr10 were found to be comparatively less affected by the fungus (Table 1, Fig. 2). The intensity of the disease was less in the leaves with oldest one of 50 days of two-month-old shoots (2MS) than in the leaves with oldest one of 80 days of 3-month-old shoots. The lower disease intensity in 2MS may be on account of more young leaves (Bell, 1981). The disease development was also markedly influenced by seasonal variations (Fig. 3). During the experimentation (April 1991 to March 1993)

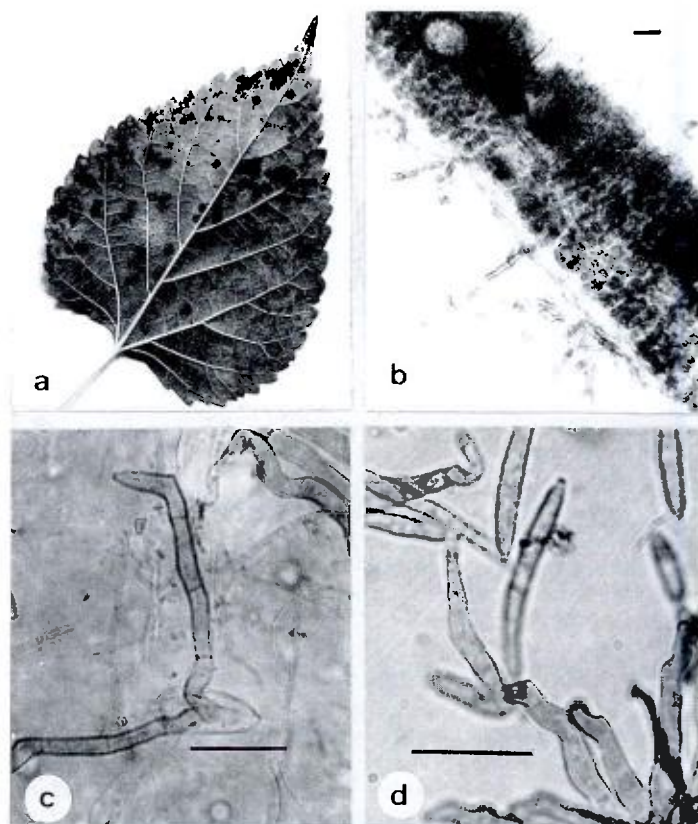


Fig. 1: *Pseudocercospora mori* in mulberry.

A: Dark amphigenous spots on a mulberry leaf along with white powdery mildew specks. **B:** Transversal section of a leaf through spots showing conidiophores on the ventral surface. **C:** Hyphae emerged through stomata. **D:** Conidiophores with conidia. Bar = 0.02 mm.

Fig. 1 : *Pseudocercospora mori* chez le mûrier.

A : Taches amphigènes foncées sur une feuille de mûrier et taches d'oïdium blanc. **B :** Coupe transversale d'une feuille à travers les taches montrant les conidiophores sur la surface ventrale. **C :** Hyphes sortant des stomates. **D :** Conidiophores et conidies. Trait = 0,02 mm.

in West Bengal, India, the disease intensity was negligible in the months from February to May, thereafter it started to increase and remained very high from August to December.

Table I. Analysis of variance for *Pseudocercospora mori* disease intensities (% disease index) from ten mulberry varieties, after square root transformation $[(x + 1)^{1/2}]$ of the raw data.

Tableau I. Analyse de variance pour l'intensité de la maladie causée par *Pseudocercospora mori* (en pourcentage de maladie) chez 10 variétés de mûrier après transformation des données brutes en racines carrées $[(x + 1)^{1/2}]$.

Factor	Degree of freedom	Mean squares	F value
Facteur	Degrés de liberté	Carrés moyens	Valeur de F
Shoot age (SA) / Age de la pousse (SA)	1	488.00	869.32**
Month (M) / Mois (M)	23	339.46	604.71**
Variety (V) / Variété (V)	9	6.20	11.05**
SA × M	23	56.19	100.10**
SA × V	9	1.17	2.09*
M × V	207	1.83	3.25**
SA × V × M	207	1.58	2.81**
Error / Ecart	960	0.56	

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

** Significant both at the 5% and 1% levels / Significatif aux seuils de 5 % et de 1 %.

Table II. Regression equations of *Pseudocercospora mori* disease intensity on maximum and minimum temperature for ten mulberry varieties.

Tableau II. Equations de régression entre l'intensité de *Pseudocercospora mori* et les températures maximale et minimales pour dix variétés de mûrier.

Variety / Variété	Regression equation / Equation de régression	R ²
C763	$\text{Log}_e(y + 1) = 40.95 - 3.65x_1 + 2.52x_2 + 0.05x_1^2 - 0.05x_2^2$	0.79
C776	$\text{Log}_e(y + 1) = 48.31 - 4.28x_1 + 2.79x_2 + 0.05x_1^2 - 0.05x_2^2$	0.79
C1726	$\text{Log}_e(y + 1) = 39.24 - 3.46x_1 + 2.37x_2 + 0.04x_1^2 - 0.04x_2^2$	0.83
C1729	$\text{Log}_e(y + 1) = 43.23 - 3.77x_1 + 2.49x_2 + 0.05x_1^2 - 0.05x_2^2$	0.83
C1730	$\text{Log}_e(y + 1) = 45.85 - 4.10x_1 + 2.80x_2 + 0.05x_1^2 - 0.05x_2^2$	0.83
S1	$\text{Log}_e(y + 1) = 40.56 - 3.51x_1 + 2.34x_2 + 0.04x_1^2 - 0.04x_2^2$	0.89
S799	$\text{Log}_e(y + 1) = 45.04 - 3.87x_1 + 2.43x_2 + 0.05x_1^2 - 0.05x_2^2$	0.88
S1635	$\text{Log}_e(y + 1) = 40.93 - 3.47x_1 + 2.21x_2 + 0.04x_1^2 - 0.04x_2^2$	0.83
Tr4	$\text{Log}_e(y + 1) = 43.61 - 3.89x_1 + 2.66x_2 + 0.05x_1^2 - 0.05x_2^2$	0.78
Tr10	$\text{Log}_e(y + 1) = 41.06 - 3.73x_1 + 2.66x_2 + 0.05x_1^2 - 0.05x_2^2$	0.74

y: Average PDI; x₁: Average maximum temperature; x₂: Average minimum temperature.

y: Pourcentage moyen de la maladie; x₁: Température maximale moyenne; x₂: Température minimale moyenne.

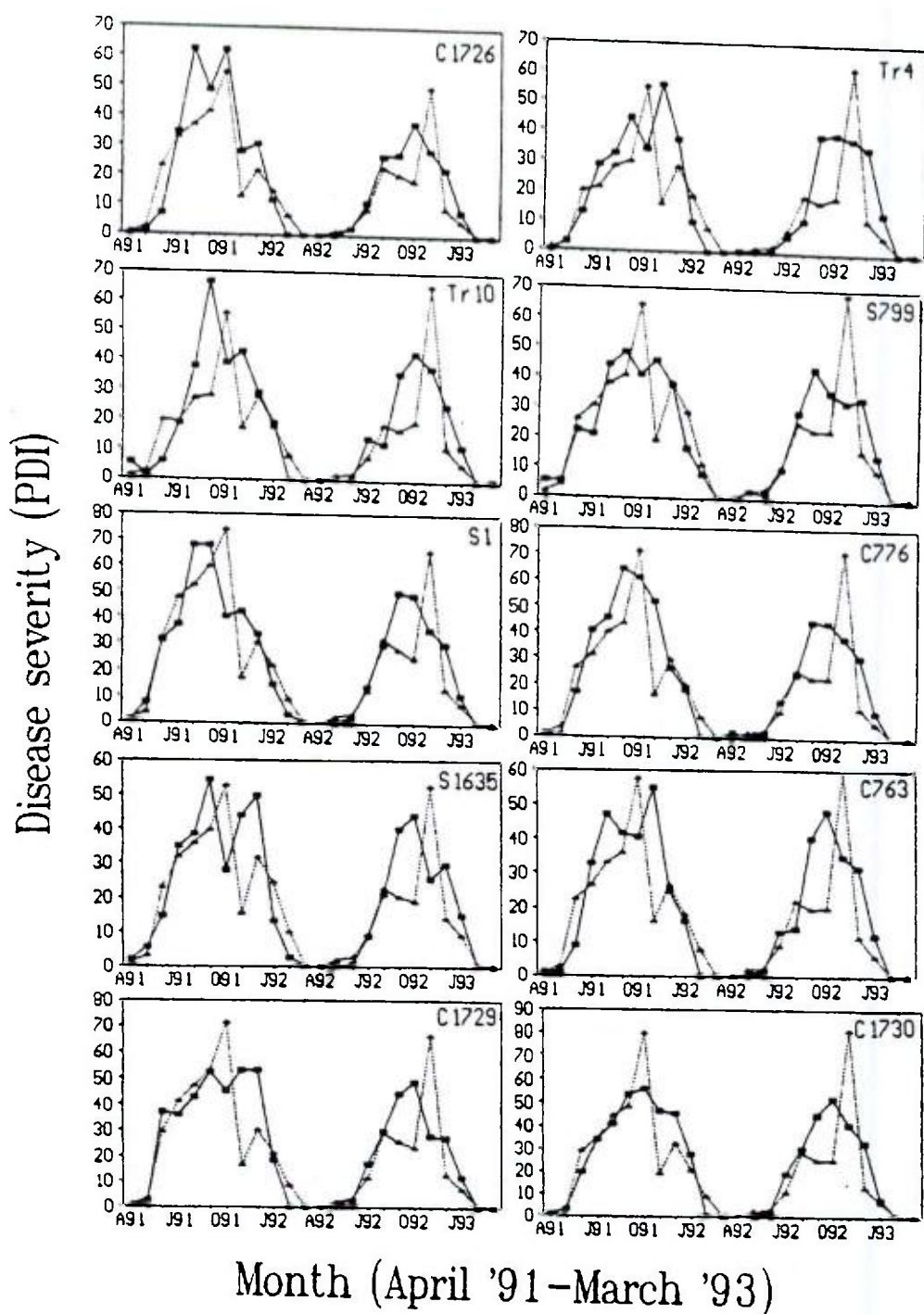


Fig. 2: *Pseudocercospora mori* disease severity in ten mulberry varieties.

Fig. 2 : Intensité de la maladie causée par *Pseudocercospora mori* chez dix variétés de mûrier.

—■— Observed PDI / Intensité observée.▲.... Predicted PDI / Intensité estimée.

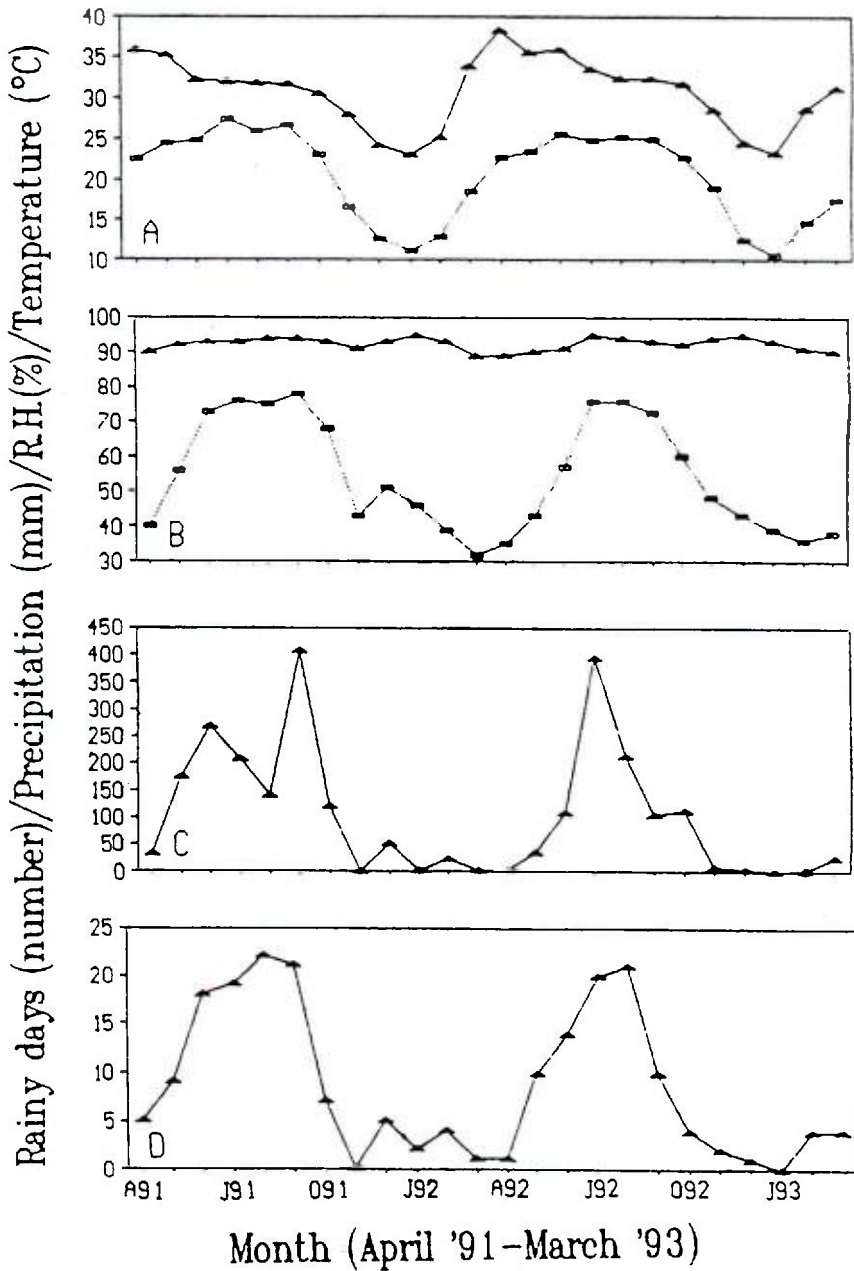


Fig. 3: Meteorological conditions during the study on the development of *Pseudocercospora mori* mulberry.
 A: Temperature (...▲... maximum; —■— minimum); B: Relative humidity (...▲... maximum; —■— minimum); C: Total monthly rainfall; D: Number of rainy days per month.

Fig. 3: Conditions météorologiques au cours de l'étude sur le développement de *Pseudocercospora mori* chez le mûrier.

A: Température (...▲... maximale; —■— minimale); B: Humidité relative (...▲... maximale; —■— minimale); C: Pluvisité mensuelle totale; D: Nombre de jours de pluie par mois.

The effects of abiotic factors like maximum temperature, minimum temperature, maximum relative humidity percentage, minimum relative humidity percentage (all average on month), total monthly rainfall and number of rainy days in a month on the percent disease intensity (PDI) in that month were estimated separately for each variety of mulberry using regression tools. A quadratic exponential relationship $[y = C. \exp. (a_1x_1 + a_2x_2^2 + b_1x_1 + b_2x_2^2) - 1]$ with average maximum temperature and minimum temperature was found to be the best fit for all the varieties with a significant ($P < 0.01$) coefficient of determination (R^2) ranging between 0.74 and 0.89 against 19 degrees of freedom (Table II). Also, a significant increase in R^2 was not possible by inclusion of any of the other abiotic parameters as causal factors. The month-wise observed and predicted PDI for each variety indicates that the months of October and November with average maximum temperatures ranging between 28.5 and 30.6 °C and minimum temperatures between 19.0 and 23.0 °C were the most favourable for the disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Dr B.C. Sutton, Head of Biosystematic Services, International Mycological Institute, United Kingdom, for identification of the fungus.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1991-92) Annual Research and Administrative Report. Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, India, 411 pp.
- BELL A.A. (1981) Biochemical mechanism of disease resistance. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 32, 21-81.
- BISWAS S., MANDAL S.K., CHINYA P.K. (1993) Development of powdery mildew disease in mulberry and its control. *Sericologia*, 33, 653-662.
- DEIGHTON F.C. (1976) Studies on *Cercospora* and allied genera. VI. *Pseudocercospora* Speg., *Pantospora* Cif. and *Cercoseptoria* Petr. *Mycol. Pap.*, CMI 140, 1-168.
- HSIEH, GOH (1990) *Cercospora* and similar fungi from Taiwan. Maw Chang Book Co., pp. 240-241.
- MUNJAL R.L., LALL G., CHONA B.L. (1959) Some *Cercospora* species from India II. *Indian Phytopath.*, 12, 85-89.
- 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, 23-27.
- SRIVASTAVA R.C., KHAN M.S., LAL M.P. (1978) Some new leaf spot fungi from India. *Indian Phytopath.*, 31, 524-525.

INFLUENCE DU GENOTYPE DE L'HOTE, DE L'AGE DE LA POUSSE ET DES CONDITIONS CLIMATIQUES SUR LE DEVELOPPEMENT DE *PSEUDOCERCOSPORA MORI* CHEZ LE MURIER

S. BISWAS*, N.K. DAS & T. PAVAN KUMAR

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

*Les taches amphigènes provoquées par **Pseudocercospora mori** (Hara) Deighton à la surface inférieure des feuilles de mûrier se développent bien chez dix variétés de mûrier performantes du Central Sericultural Research and Training Institute de Berhampore. Cependant, parmi celles-ci, C763, C1726, S1635, Tr4 et Tr10 s'avèrent comparativement moins affectées par la maladie. L'intensité de la maladie est nettement plus faible chez les feuilles, dont la plus âgée a 50 jours, des pousses âgées de deux mois que chez les feuilles, dont la plus âgée a 80 jours, des pousses âgées de trois mois. Au cours de la période expérimentale (avril 1991 à mars 1993), l'intensité de la maladie est négligeable de février à mai mais est élevée d'août à décembre. Une relation quadratique exponentielle [$y = C \cdot \exp. (a_1x_1 + a_2x_1^2 + b_1x_2 + b_2x_2^2) - 1$] avec les températures moyennes maximales et minimales est la mieux adaptée pour rendre compte de la maladie et permet de prédire son développement pour toutes les variétés et tous les mois de l'année. La température moyenne maximale située entre 28,5 et 30,6 °C et la température minimale entre 19,0 et 23,0 °C sont les plus favorables à la maladie.*

INTRODUCTION

La présence de *Pseudocercospora mori* (Hara) Deighton (synonyme : *Cercospora mori* Hara), champignon responsable de la tache foliaire du mûrier, a été observée dans tous les pays du globe (Munjal et coll., 1959 ; Deighton, 1976 ; Srivastava et coll., 1978 ; Hsieh et Goh, 1990). Il se manifeste chez le mûrier par de petits hyphes gris à marron sur la surface inférieure des feuilles et forme, par la suite, des lésions nécrotiques sur la surface supérieure. Les feuilles de mûrier infestées par ce champignon sont impropres à l'élevage du ver à soie et tombent rapidement en raison de leur sénescence prématurée. Au cours d'une étude récente sur les maladies du mûrier dans les principaux districts séricicoles du Bengale occidental (Inde) réalisée par le *Central Sericultural Research and Training Institute* de Berhampore, le principal auteur a observé que cette maladie (considérée comme un champignon indéterminé de la tache foliaire) était présente de manière importante dans toutes les mûraies et occasionnait des dommages importants au feuillage (Anonyme, 1991-92). La description morphologique de ce champignon a été réalisée par Deighton (1976) et Hsieh et Goh (1990). Cependant, aucune étude approfondie n'a été réalisée sur la maladie. Cette communication vise à présenter le développement de l'agent pathogène chez certaines variétés de mûrier performantes en fonction des conditions climatiques et de l'âge des feuilles.

MATERIELS ET METHODES

On a sélectionné pour cette étude des plants en pot âgés d'un an (pots de 40 cm de diamètre) de dix variétés de mûrier, à savoir C763, C776, C1726, C1729, C1730, S1, S799, S1635, Tr4 et Tr10, du *Central*

* Adresse actuelle : Regional Sericultural Research Station, Kalimpong - 734 301, West Bengal, Inde.

Sericultural Research and Training Institute de Berhampore. Cent cinquante plants en pot, maintenus selon la configuration aléatoire simple, ont été taillés à 60 et à 90 jours d'intervalle de telle façon que des pousses âgées de deux et de trois mois en trois répétitions soient disponibles chaque mois. Les doses de fumure appliquées sont de 3,41 g d'azote, 2,04 g de phosphate et 1,36 g de potasse par pot pour 20 kg de terreau par an en quatre doses égales. Les plants en pot ont été arrosés en fonction des besoins, suivant la teneur en eau du terreau. La maladie a été enregistrée visuellement sur une échelle de 0 à 5 (Siddaramaiah et coll., 1978) utilisée pour calculer l'indice de maladie suivant la méthode décrite par Biswas et coll. (1993) régulièrement une fois par mois de la première semaine de mai 1991 à la première semaine d'avril 1993, chaque observation étant considérée comme l'effet du mois précédant dans chaque cas. Les conditions atmosphériques ont été relevées tous les jours au cours de la période d'observation et ont été corrélées avec la maladie.

RESULTATS ET DISCUSSION

Pseudocercospora mori (IMI-358575) se manifeste chez le mûrier sous la forme de petits hyphes de couleur grise ou marron ressemblant à l'oïdium et composés de conidiophores géniculés et fasciculés avec des conidies sur la surface supérieure de la feuille (Fig. 1). Ils convergent ensuite et des taches de couleur marron foncé se développent de manière concomitante sur la surface supérieure et, avant que la feuille ne se détache entièrement, deviennent jaunes avec des taches amphigènes foncées. La maladie se développe bien chez les dix variétés performantes. Cependant, C763, C1726, S1635, Tr4 et Tr10 s'avèrent comparativement moins affectées par le champignon (Tableau I, Fig. 2). L'intensité de la maladie est plus faible chez les feuilles dont la plus âgée a 50 jours chez les pousses âgées de deux mois que chez les feuilles dont la plus âgée a 80 jours chez les pousses âgées de trois mois. Le fait que l'intensité de la maladie soit moins forte chez les pousses âgées de trois mois pourrait être dû à la présence d'un plus grand nombre de jeunes feuilles (Bell, 1981). Le développement de la maladie est également fortement influencé par les variations saisonnières (Fig. 3). Au cours de la période d'expérimentation (avril 1991 à mars 1993) dans le Bengale occidental (Inde), l'intensité était négligeable de février à mai puis a commencé à augmenter et est restée à un niveau très élevé d'août à septembre.

Les effets des facteurs abiotiques [température maximale, température minimale, humidité relative maximale, humidité relative minimale (moyenne mensuelle), pluviométrie mensuelle totale et nombre de jours de pluie par mois] sur le pourcentage d'intensité de la maladie ont été évalués séparément pour chaque variété de mûrier à l'aide des équations de régression. Une relation quadratique exponentielle [$y = C \cdot \exp. (a_1x_1 + a_2x_2^2 + b_1x_1 + b_2x_2^2) - 1$] comprenant la température moyenne maximale et minimale est la plus appropriée pour toutes les variétés avec un coefficient de corrélation (R^2) significatif ($P < 0,01$) situé entre 0,74 et 0,89 pour 19 degrés de liberté (Tableau II). En outre, il n'est pas possible d'obtenir une augmentation significative de R^2 en incluant les autres paramètres abiotiques comme facteurs causatifs. Les pourcentages d'intensité de la maladie observés et estimés pour chaque variété indiquent que les mois d'octobre et de novembre, au cours desquels la température maximale moyenne se situe entre 28,5 et 30,6 °C et la température minimale moyenne entre 19,0 et 23,0 °C, sont les plus favorables au développement de la maladie.

BIOPHYSICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERS OF SOME MULBERRY CULTIVARS RESISTANT AND SUSCEPTIBLE TO LEAF SPOT (*CERCOSPORA MORICOLA*)

T. PHILIP, GOVINDAIAH, J. LATHA, D.D. SHARMA, A.K. BAJPAI & R.K. DATTA

Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura,
Mysore 570 008, India.

*Growth parameters and biochemical characters studied in different mulberry genotypes indicated that the genotypes resistant to leaf spot caused by *Cercospora moricola*, namely Belidevalaya (Ber. Local) and Kaliakuttai, grew faster, gave a higher leaf yield, had fewer spots of smaller size, smaller leaf area with higher wax and chlorophyll contents. The susceptible genotypes, Sujanpur and ACC 155, possessed a higher leaf moisture percentage and more spots of coalescing type and larger size.*

Keywords: Biophysical and biochemical characters, mulberry, leaf spot, resistance.

INTRODUCTION

The leaf spot disease of mulberry, caused by *Cercospora moricola* Cooke, is most prevalent during the rainy season. It reduces the leaf yield by 10-12 percent in almost all the cultivated mulberry varieties besides reducing the nutritive value of the leaves (Madhava Rao *et al.*, 1981). Feeding of diseased leaves adversely affects the larval growth and commercial characters of cocoons (Siddaramaiah and Hegde, 1988). Resistance against the leaf spot disease and the structural defence mechanism have been reported in genotypes Belidevalaya (Ber. Local) and Kaliakuttai (Govindaiah *et al.*, 1989; Philip *et al.*, 1992). Some of the biophysical and biochemical characters of these genotypes were studied and are discussed in this paper.

MATERIALS AND METHODS

Resistant genotypes, Belidevalaya (Ber. Local) and Kaliakuttai, and susceptible genotypes, Sujanpur and ACC 155, grown at the germplasm of the Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, were selected for the study. These genotypes were inoculated during September with a spore suspension of *C. moricola* containing 10,000 spores/ml of sterile distilled water. Observations on the disease incidence, number of spots/leaf, size of spots, height of plants, number of leaves per branch, internodal distance, leaf area, leaf yield, fresh and dry weight of leaves per plant, moisture and ash contents (AOAC, 1970), quantity of wax (Martin and Batt, 1958) and chlorophyll contents (Bruinsma, 1963) were recorded on fully grown plants. The percentage of disease incidence was calculated as per the FAO methods of plant disease assessment (Anonymous, 1967). The leaf area was measured with the help of a leaf area meter. Optical density for chlorophyll estimation was measured at 645 and 663 nm wavelengths in a spectronic 20 spectrophotometer. Data were recorded during 1992 and 1993 for two years. Comparison of the means of resistant and susceptible genotypes was done using Student's 't' test.

RESULTS AND DISCUSSION

a) Morphological features:

The disease incidence recorded on a 1-5 scale was 3.74% in resistant genotypes against 49.48% in susceptible genotypes. The first spot in susceptible genotypes developed 6 days after inoculation, while resistant genotypes showed the symptoms on the ninth day after inoculation. Resistant genotypes showed 2-6 spots of 2.3 to 2.6 mm diameter per leaf, which was significantly less than 16-22 spots/leaf of 3.4 to 4.7 mm diameter developed on susceptible genotypes. Moreover, resistant genotypes showed scattered spots with a narrow layer of yellowing around them as against irregular and coalescing type of spots with extensive yellowing around spots in susceptible genotypes. Among susceptible genotypes, Sujanpur showed a higher number of spots (22) per leaf with extensive destruction of leaf area, indicating its higher susceptibility. Among resistant genotypes, Belidevalaya (Ber. Local) showed a lower number of spots of smaller size, indicating a greater degree of resistance to the disease (Table I). Brahmachari and Kolte (1985) recorded similar observations with reference to the number and size of spots and degree of resistance of groundnut cultivars against early leaf spot caused by *Cercospora arachidicola* Hori.

Table I. Biophysical characters of resistant and susceptible varieties of mulberry to leaf spot.

Tableau I. Caractères biophysiques de variétés de mûrier résistantes et sensibles à la tache foliaire.

Variety	Height of plant (cm)	Number of leaves per branch	Leaf yield per plant (g)	Internodal distance (cm)	Fresh wt. ⁽¹⁾ (g)	Dry wt. ⁽¹⁾ (g)	Leaf area (cm ²)	% of infestation	Number of spots per leaf	Size of spots (dia. cm)
Variétés	Hauteur du plant (cm)	Nombre de feuilles par branche	Rendement en feuilles par plant (g)	Distance internode (cm)	Poids frais ⁽¹⁾ (g)	Poids sec ⁽¹⁾ (g)	Surface foliaire (cm ²)	Infestation (%)	Nombre de taches par feuille	Taille des taches (diamètre) (cm)
Resistant / Résistantes										
Belidevalaya (Ber. Local)	139.6	21.5	585.3	5.98	118.04	33.35	98.96	3.18	2.0	2.3
Kaliakuttai	142.5	27.3	702.0	5.61	156.37	43.47	117.60	4.31	3.0	2.6
Mean / Moyenne	141.05	24.42	643.65	6.30	137.21	38.41	108.28	3.75	2.5	2.45
SD	4.07	3.20	61.17	0.78	20.19	6.49	9.99	0.77	0.76	0.34
CV	2.88	13.10	9.50	12.38	14.71	16.90	9.23	20.53	30.4	13.88
Susceptible / Sensibles										
Sujanpur	151.3	24.0	543.7	6.61	98.38	28.4	117.45	53.39	22.0	3.4
ACC 155	50.5	16.5	345.7	4.1	108.11	30.62	121.2	45.57	16.0	4.7
Mean / Moyenne	105.43	20.25	444.68	5.09	103.25	29.51	119.33	49.48	19.0	4.03
SD	46.49	4.26	104.82	1.16	9.30	2.75	9.38	7.25	5.03	0.84
CV	44.10	21.04	23.57	22.79	9.01	9.32	7.86	14.65	26.47	20.84
t at 5%	1.873	1.92	4.03	2.13	3.75	1.34	1.98	15.40	7.97	4.28
t at 5%	*	*	*	*	*	NS	*	*	*	*

(1) Weight of 100 leaves / Poids de 100 feuilles.

SD: Standard deviation / Ecart type, CV: Coefficient of variation / Coefficient de variation.

* Significant / Significatif, NS: Not significant / Non significatif.

Height of the plants was more in the susceptible genotype, Sujanpur, followed by the resistant genotypes, Kaliakuttai and Belidevalaya (Ber. Local). The susceptible genotype ACC 155 attained only a height of 59.5 cm in 65 days. The average daily rate of growth in resistant genotypes was 2.35 cm while it was only 1.76 cm in susceptible genotypes. Similarly, the average number of leaves per branch was higher in Kaliakuttai, followed by Sujanpur, Belidevalaya (Ber. Local) and ACC 155. The fresh weight of leaves and leaf yield was greater in resistant genotypes. The leaf area was greater in susceptible genotypes (Table I). It was very much reduced in the resistant genotype Belidevalaya (Ber. Local), where the infected area was only 4.6 sq. cm compared to the average infested area of 75 sq. cm in susceptible genotypes. In susceptible genotypes, more than 60% of the total leaf area was infested, whereas in resistant genotypes the total infested leaf area was only 6% of the total leaf area. This reduced leaf area might have helped the plant to minimise the deposition of fungal spores and consequent infection.

Biochemical characters:

The most striking biochemical characters of resistant genotypes were the high contents of wax and chlorophyll (Table II). The quantity of wax on the leaf surface was significantly high in both resistant genotypes as compared to susceptible genotypes. The waxy cuticle on the leaf forms a hydrophobic surface that prevents the retention of water drops/film of water, thereby preventing the

Table II. Biochemical characters of resistant and susceptible varieties of mulberry to leaf spot.

Tableau II. Caractères biochimiques de variétés de mûrier résistantes et sensibles à la tache foliaire.

Variety <i>Variétés</i>	Moisture <i>Eau</i> %	Wax <i>Cire</i> (mg/100 cm ²)	Chlorophyll <i>Chlorophylle</i>			<i>a/b</i> ratio <i>Rapport a/b</i>	Ash <i>Minéraux</i>
			<i>a</i>	<i>b</i>	total		
Resistant / Résistantes							
Belidevalaya (Ber. Local)	71.75	5.1	3.25	2.92	6.45	1.11	0.039
Kaliakuntai	72.20	5.3	4.24	3.03	7.75	1.40	0.038
Mean / <i>Moyenne</i>	71.97	5.2	3.75	2.97	7.10	1.26	0.0385
SD	1.77	0.28	0.55	0.37	0.76	0.18	3.20
CV	2.46	5.38	14.67	12.45	10.70	14.29	8.32
Susceptible / Sensibles							
Sujanpur	72.48	3.5	3.44	2.54	6.03	1.36	0.037
ACC 155	72.08	3.1	2.68	2.23	5.24	1.20	0.041
Mean / <i>Moyenne</i>	72.28	3.3	3.06	2.38	5.63	1.28	0.039
SD	1.02	0.44	0.56	0.34	0.50	0.10	3.65
CV	1.41	13.33	18.30	14.29	8.88	8.00	9.36
t at 5%	0.37	8.94	2.16	2.87	3.96	0.135	0.003
t at 5%	NS	*	*	*	*	NS	NS

SD: Standard deviation / *Ecart type*, CV: Coefficient of variation / *Coefficient de variation*.

* Significant / *Significatif*, NS: Not significant / *Non significatif*.

fungus spores from germinating. A waxy cuticle may also limit the exudation of nutrients required by the pathogens in the initial stages of infection and, therefore, may indirectly contribute to the defence of the plant (Singh, 1986). Leaf surface wax has been shown as an important factor contributing to resistance in many plants against various pathogens (Holloway and Baker, 1970; Dixit and Gupta, 1979).

Similarly, chlorophyll *a*, *b* and total chlorophyll contents were high in resistant genotypes. Relation between higher chlorophyll content and disease resistance has also been reported in groundnut against early leaf spot caused by *Cercospora arachidicola* Hori (Brahmachari and Kolte, 1983). Higher disease incidence and the resultant reduction in plant growth, leaf yield, etc., in susceptible genotypes can also be attributed, to some extent, to the presence of more moisture in these genotypes.

The resistant genotypes, Belidevalaya (Ber. Local) and Kaliakuttai, were reported to possess a thick epidermal-cum-cuticle layer (4.68 and 4.64 μm , respectively), thick palisade layer (44.03 and 74.33 μm , respectively) with closely arranged cells and a lower stomatal frequency (325 and 225/ mm^2) (Philip *et al.*, 1992). The susceptible genotypes, Sujampur and ACC 155, have a thin cuticle-cum-epidermal layer (3.34 and 3.83 μm , respectively), thin palisade layer (26.62 and 36.49 μm , respectively) and high stomatal frequency (400 and 520/ mm^2 , respectively). The greater thickness of surface layers and compactness of the palisade layer act as mechanical barriers to the easy entry of the pathogen into the leaf and thus contribute to resistance. Similarly, the presence of a lower number of stomata in resistant genotypes naturally reduces the number of infection sites available for spore penetration. Thus, from these studies it can be concluded that the mechanism of resistance in Belidevalaya (Ber. Local) and Kaliakuttai is due to many associated factors such as reduced leaf area, higher wax and chlorophyll contents, thick leaf size, thick and closely packed palisade layer and lower frequency of stomata.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1967) FAO Symposium on Crop Losses. Rome, Oct. 2-4.
- AOAC (1970) Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, 1013 pp.
- BRAHMACHARI B.K., KOLTE S.J. (1983) Morphological and biochemical differences in two *Cercospora* leaf spot resistant and susceptible varieties of groundnut. Indian Phytopathol., 36, 149-150.
- BRAHMACHARI B.K., KOLTE S.J. (1985) A comparative study of certain groundnut cultivars resistant and susceptible to early leaf spot. Indian Phytopathol., 38, 743-744.
- BRUINSMA J. (1963) The quantitative analysis of chlorophyll *a* and *b* in plant extracts. Photochem. Photobiol., 2, 241-249.
- DIXIT R.B., GUPTA J.S. (1979) Analytical study of leaf surface wax of two barley cultivars. Proc. Indian Nat. Sci. Acad., 45, 586-588.
- GOVINDAIAH, SHARMA D.D., SENGUPTA K., GUNASEKHAR V., SURYANARAYANA N., MADHAVA RAO Y.R. (1989) Screening of mulberry varieties against major fungal diseases. Indian J. Seric., 28, 207-213.
- HOLLOWAY P.T., BAKER E.A. (1970) The cuticle of some angiosperm leaves and fruits. Ann. Appl. Biol., 66, 145-154.
- MADHAVA RAO Y.R., KODANDARAM M.S., SRINIVASAN E.B. (1981) Effect of leaf spot disease on the composition of mulberry leaves. J. Mysore Univ., 28, 21-23.
- MARTIN J.T., BATT R.F. (1958) Extraction of leaf surface wax. Ann. Appl. Biol., 47, 375-387.
- PHILIP T., GOVINDAIAH, DATTA R.K. (1992) Preinfectious structural defence mechanisms in mulberry against *Cercospora* Cooke, causing leaf spot. Abst. First Nat. Conf. on Mulberry Seric. Res., Central Sericultural Res. and Training Institute, Mysore, Dec. 10-11, pp. 59-60.
- SIDDARAMAIAH A.L., HEGDE R.K. (1988) Effect of feeding of *Cercospora* infected leaves of mulberry on silkworm development. Mysore J. Agric. Sci., 22, 498-504.
- SINGH D.P. (1986) Breeding for resistance to diseases and insect pests. Springer Verlag, Berlin.

CARACTERES BIOPHYSIQUES ET BIOCHIMIQUES DE CERTAINS CULTIVARS DE MURIER RESISTANTS ET SENSIBLES A LA TACHE FOLIAIRE (*CERCOSPORA MORICOLA*)

T. PHILIP, GOVINDAIAH, J. LATHA, D.D. SHARMA, A.K. BAJPAI & R.K. DATTA

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

*L'étude des paramètres de croissance et des caractères biochimiques de différents génotypes indique que les génotypes résistants à la tache foliaire causée par *Cercospora moricola*, à savoir Belidevalaya (Ber. Local) and Kaliakuttai, ont une croissance plus rapide, un rendement en feuilles plus élevé, un nombre plus faible de taches, des taches de petite taille, une surface foliaire plus petite et des teneurs en cire et en chlorophylle plus élevées. Les feuilles des génotypes sensibles, Sujampur et ACC 155, présentent une teneur en eau plus élevée et un nombre plus important de taches de type convergent et de plus grande taille.*

INTRODUCTION

La maladie de la tache foliaire, provoquée par *Cercospora moricola* Cooke, apparaît principalement au cours de la saison pluvieuse. Elle occasionne une diminution de 10 à 12 % du rendement en feuilles chez la plupart des variétés de mûrier cultivées ainsi qu'une réduction de la valeur nutritive des feuilles (Madhava Rao et coll., 1981). Le nourrissage avec des feuilles malades a un effet négatif sur la croissance larvaire et les caractères commerciaux des cocons (Siddaramaiah et Hegde, 1988). La résistance à la tache foliaire et les mécanismes de défense structurels contre cette maladie ont été étudiés chez les génotypes Belidevalaya (Ber. Local) et Kaliakuttai (Govindaiah et coll., 1989; Philip et coll., 1992). Nous avons étudié certains caractères biophysiques et biochimiques de ces génotypes et les résultats obtenus sont discutés dans cet article.

MATERIELS ET METHODES

On a choisi pour cette étude les génotypes résistants Belidevalaya (Ber. Local) et Kaliakuttai et les génotypes sensibles Sujampur et ACC 155 cultivés à la banque génétique du *Central Sericultural Research and Training Institute* de Mysore. Ces génotypes ont été inoculés en septembre avec une suspension de spores de *C. moricola* contenant 10 000 spores/ml d'eau distillée stérile. Les observations, qui portent sur l'incidence de la maladie, le nombre de feuilles par branche, la distance internodale, la surface foliaire, le rendement en feuilles, le poids humide et sec des feuilles, la teneur en eau et la teneur en minéraux (AOAC, 1970), la quantité de cire (Martin et Batt, 1958) et la teneur en chlorophylle (Bruinsma, 1963), ont été faites sur des plants arrivés à maturité. Le pourcentage d'incidence de la maladie a été calculé selon les méthodes d'évaluation des maladies des végétaux de la FAO (Anonyme, 1967). La surface foliaire a été mesurée à l'aide d'un planimètre foliaire. La densité optique pour l'évaluation de la chlorophylle a été mesurée aux longueurs d'ondes de 645 et 663 nm avec un spectrophotomètre Spectronic 20. Les données ont été enregistrées sur deux ans, de 1992 à 1993. La comparaison des moyennes obtenues pour les génotypes résistants et les génotypes sensibles a été réalisée d'après le test *t* de Student.

RESULTATS ET DISCUSSION

a) Caractères morphologiques :

L'incidence de la maladie enregistrée sur une échelle de 1 à 5 est de 3,74 % chez les génotypes résistants contre 49,48 % chez les génotypes sensibles. La première tache chez les génotypes sensibles apparaît six jours après l'inoculation tandis que les génotypes résistants manifestent les premiers symptômes neuf jours après l'inoculation. On observe 2 à 6 taches de 2,3 à 2,6 mm de diamètre par feuille chez les génotypes résistants, ce qui est nettement inférieur aux valeurs correspondantes (16 à 22 taches de 3,4 à 4,7 mm par feuille) observées chez les génotypes sensibles. De plus, chez les génotypes résistants, les taches sont dispersées avec une bordure fine de jaunissement tandis que, chez les génotypes sensibles, les taches sont de type irrégulier et convergent et présentent un élargissement de la zone de jaunissement. Sujampur a un nombre supérieur de taches (22) par feuille et présente une destruction importante de la surface foliaire, ce qui indique que sa sensibilité est élevée. Parmi les génotypes résistants, Belidevalaya (Ber. Local) présente moins de taches de taille réduite, ce qui indique son degré élevé de résistance à cette maladie (Tableau I). Brahmachari et Kolte (1985) ont fait des observations similaires chez des cultivars d'arachide pour ce qui concerne le nombre et la taille des taches et le degré de résistance à la tache foliaire précoce causée par *Cercospora arachidicola* Hori.

La hauteur du plant est plus élevée chez le génotype sensible Sujampur que chez les génotypes résistants Kaliakuttai et Belidevalaya (Ber. Local). Le génotype sensible ACC 155 atteint une hauteur maximale de 59,5 cm en 65 jours. La vitesse de croissance journalière est de 2,35 cm chez les génotypes résistants contre seulement 1,76 cm chez les génotypes sensibles. De même, le nombre moyen de feuilles par branche est maximal chez Kaliakuttai par rapport à celui observé chez Sujampur, Belidevalaya (Ber. Local) et ACC 155. Le poids frais des feuilles et le rendement en feuilles sont plus élevés chez les génotypes résistants. La surface foliaire est plus importante chez les génotypes sensibles (Tableau I), tandis qu'elle est fortement réduite chez le génotype résistant Belidevalaya (Ber. Local) chez lequel la surface infestée ne dépasse pas 4,6 cm² contre 75 cm² en moyenne chez les génotypes sensibles. Chez ces derniers, plus de 60 % de la surface foliaire totale est infestée tandis que, chez les génotypes résistants, la surface infestée ne dépasse pas 6 % de la surface foliaire totale. Il se peut que le fait que la surface foliaire soit réduite aide la plante à minimiser le dépôt des spores fongiques et l'infestation qui en résulte.

Caractères biochimiques :

Les caractères biochimiques les plus marquants des génotypes résistants sont les teneurs élevées en cire et en chlorophylle (Tableau II). La quantité de cire sur la surface foliaire est significativement plus élevée chez les deux génotypes résistants que chez les génotypes sensibles. La cuticule cireuse de la feuille forme une surface hydrophobe qui empêche la rétention des gouttes ou des couches d'eau et évite ainsi la germination des spores fongiques. Une cuticule cireuse peut également limiter l'exsudation des éléments nutritifs nécessaires aux agents pathogènes aux premiers stades de l'infestation et contribuer indirectement à la défense de la plante (Singh, 1986). On a démontré que la présence de cire de la surface foliaire était un facteur important de résistance contre divers agents pathogènes chez de nombreuses plantes (Holloway et Baker, 1970 ; Dixit et Gupta, 1979).

De même, les teneurs en chlorophylle *a*, en chlorophylle *b* et en chlorophylle totale sont élevées chez les génotypes résistants. Une relation entre une teneur élevée en chlorophylle et la résistance à la tache foliaire précoce causée par *Cercospora arachidicola* Hori a également été observée chez l'arachide (Brahmachari et Kolte, 1983). L'incidence élevée de la maladie et la diminution consécutive de la croissance, du rendement en feuilles, etc., chez les génotypes sensibles peuvent également être attribuées, dans une certaine mesure, à la présence d'un taux plus élevé d'eau chez ces génotypes.

Les génotypes résistants Belidevalaya (Ber. Local) et Kaliakuttai présentent une couche épidermique et cuticulaire épaisse (respectivement 4,68 et 4,64 µm), une couche palissadique épaisse (44,03 et 74,33 µm) avec des cellules disposées de manière compacte et une fréquence stomatique faible (325 et 225/mm²) (Philip et coll., 1992). Les génotypes sensibles Sujampur et ACC 155 ont une couche épidermique et cuticulaire fine (respectivement 3,34 et 3,83 µm), une couche palissadique

fine (26,62 et 36,49 μm) et une fréquence stomatique élevée (400 et 520/ mm^2). Les couches superficielles épaisses et la couche palissadique compacte servent de barrières mécaniques à l'entrée de l'agent pathogène dans la feuille et contribuent ainsi à la résistance. En outre, la présence d'un nombre plus faible de stomates chez les génotypes résistants permet de réduire naturellement le nombre de sites de pénétration possibles pour les spores. A la lumière de cette étude, on peut conclure que le mécanisme de résistance chez Belidevalaya (Ber. Local) et Kaliakuttai est dû à l'association de plusieurs facteurs comme une surface foliaire réduite, des teneurs en chlorophylle et en cire plus élevées, des feuilles plus épaisses, une couche palissadique épaisse et compacte et une fréquence stomatique faible.

SEASONAL INCIDENCE OF SOME IMPORTANT NURSERY DISEASES OF MULBERRY

J. SUKUMAR, S.D. PADMA, T.D. NAGENDRA KUMAR & U.D. BONGALE

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

The incidence and intensity of four foliar diseases and a serious stem disease were recorded on M-5 variety of mulberry in the nursery during 1991-93 through summer, rainy and winter seasons. The leaf spot, powdery mildew, leaf rust and bacterial leaf spot diseases exhibited marked seasonal patterns of incidence while stem canker was present throughout the year. Leaf spot and bacterial leaf spot were severe during August and September months, covering the mid-rainy season. Intensity of powdery mildew and rust was high during December and January months of winter. Mortality of stem cuttings and saplings due to stem canker was more in the cuttings planted during winter followed by rainy and summer plantings. The details are discussed with special reference to the control measures in the context of seasonal influence.

Keywords: Mulberry, *Morus*, nursery diseases.

INTRODUCTION

Mulberry (*Morus alba* L.), the main food plant of the silkworm (*Bombyx mori* L.), is propagated vegetatively in the tropics. The saplings are raised through stem cuttings planted in nurseries, which facilitates cost reduction and uniformity in the development of the plantation. Keeping in view the expansion programmes contemplated in Indian sericulture under the World Bank assisted National Sericulture Project, several agencies are planning to take up large-scale nurseries for commercial production of saplings (Dandin, 1990).

Mulberry is affected by four important foliar diseases, i.e., the leaf spot caused by *Cercospora moricola* Cooke (Patel *et al.*, 1949), leaf rust caused by *Peridiospora mori* Prasad (Prasad *et al.*, 1993); powdery mildew caused by *Phyllactinia corylea* (Pers.) Karst (Ramakrishnan and Sudan, 1954); bacterial leaf spot caused by *Pseudomonas mori* Bayer *et* Lambert (Sinha and Saxena, 1966), and an important stem disease, the stem canker caused by *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon and Maubl. (Luke and Sathiy Paul, 1982). The leaf diseases reduce the vigour of the plant while stem canker causes death of cuttings and saplings (Sukumar *et al.*, 1991). Despite serious limitations caused by these diseases, information on their seasonal incidence and intensity under nursery conditions are lacking. The present study reports the seasonal incidence and intensity of these diseases in mulberry nurseries.

MATERIALS AND METHODS

The popular variety M-5 (*Morus alba* L.) was selected for the study conducted for two years (1991-93). Mulberry cuttings 15-20 cm in length with 3-4 active buds each were prepared from one-year-old parent plants having 1.0-1.5 cm diameter thickness of the stem. The nursery beds, measuring 2.4 × 1.2 m, were prepared in a five-year-old nursery site used repeatedly to raise the saplings. Cuttings were planted 8 × 20 cm apart. About 20 kg farmyard manure was applied and 150 cuttings were planted in each bed. The beds were watered regularly once in 4-5 days. Urea @ 500 g/bed was applied after 60 days.

Three seasons, namely, rainy, winter and summer, were identified and planting was taken up on the first or second day of the first month of each season. Data on the incidence of foliar diseases and the percent leaf area infected were collected at weekly intervals following Stover's model (Stover, 1971). (0-6 grade scale for leaf spot and powdery mildew and 0-10 grade scale for rust and bacterial leaf spot). Data were collected until the plants were 3½ months old. Meteorological data were collected from standard instruments installed in the field.

RESULTS

The data recorded during 1991-93 are presented in Figures 1 and 2. Three seasons were identified based on the weather data. The southwest monsoon, which contributed the major share of rains for the year, usually commenced during the first week of June and spanned up to the end of October. The temperature ranged from 22-26 °C and the relative humidity was 70-90%. The winter season from November to mid-February accounted for low temperature (18-24 °C). The relative humidity was usually 50-70 percent. From mid-February to May the temperature was high (32-36 °C) with low relative humidity (40-60%). This was designated as summer season.

During the course of our investigations, four foliar diseases, namely, leaf spot, powdery mildew, leaf rust, bacterial leaf spot and a chronic stem disease — the stem canker, were recorded. While the foliar diseases were seasonal, the stem canker occurred throughout the year.

Leaf spot:

The leaf spot disease was recorded during the rainy season. The trend of disease development was similar during both years. Maximum damage was observed during August-September in 1992-93 with 50 percent of the plants developing the disease and 20 percent destruction of the leaf area.

Powdery mildew:

The disease was observed both during the later part of the rainy season (August-October) and the winter season. The data indicate that the disease initiated during the later part of the rainy season and reached peak proportions in winter (December-January). During 1991-92, the maximum disease incidence was observed during December-January when about 45 percent of plants were infected with 15 percent destruction of leaf area. In 1992-93, 50 percent of plants were infected and 25 percent of leaf area was colonized by the pathogen.

Leaf rust:

This disease was observed during winter months of both years, with maximum infection during December-January. During 1991-92, the maximum number of plants (50 percent) were infected with 20 percent destruction of leaf area as compared with the infection of 35 percent plants and 10 percent destruction of leaf area during 1992-93.

Bacterial leaf spot:

This disease was also restricted to rainy months during both years. The incidence was more during 1992-93 with 40 percent of the plants infected and 3 percent leaf area destroyed as compared to 30 percent infection and 1 percent leaf area destroyed during 1991-92. Among the foliar diseases, bacterial leaf blight appeared to be a minor disease.

Stem canker:

This disease was observed to be persistent from year to year and occurred throughout the year irrespective of seasons, causing mortality of cuttings and saplings. The symptoms could be observed from the 15th day after planting, causing death and rotting of cuttings and withering sprouts. Although the disease was recorded during all seasons, the mortality of cuttings was highest during winter months. During 1991-92, the mortality of cuttings was 18, 45 and 20 percent respectively during rainy, winter and summer seasons; corresponding figures for 1992-93 were 25, 40 and 28 percent.

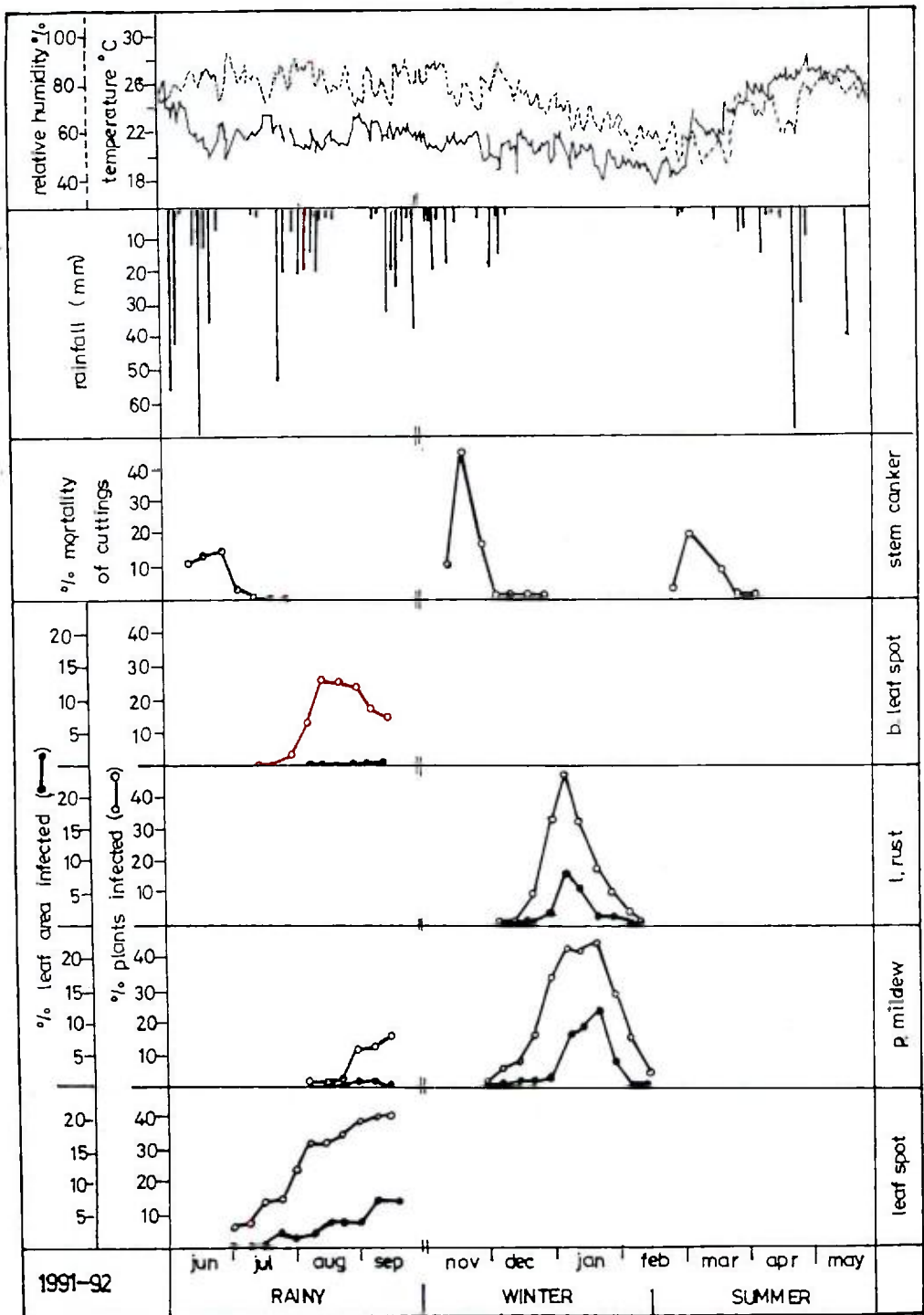


Fig. 1: Seasonal incidence and intensity of some important nursery diseases during 1991-92.

Fig. 1 : Incidence et intensité saisonnières des principales maladies de pépinière en 1991-92.

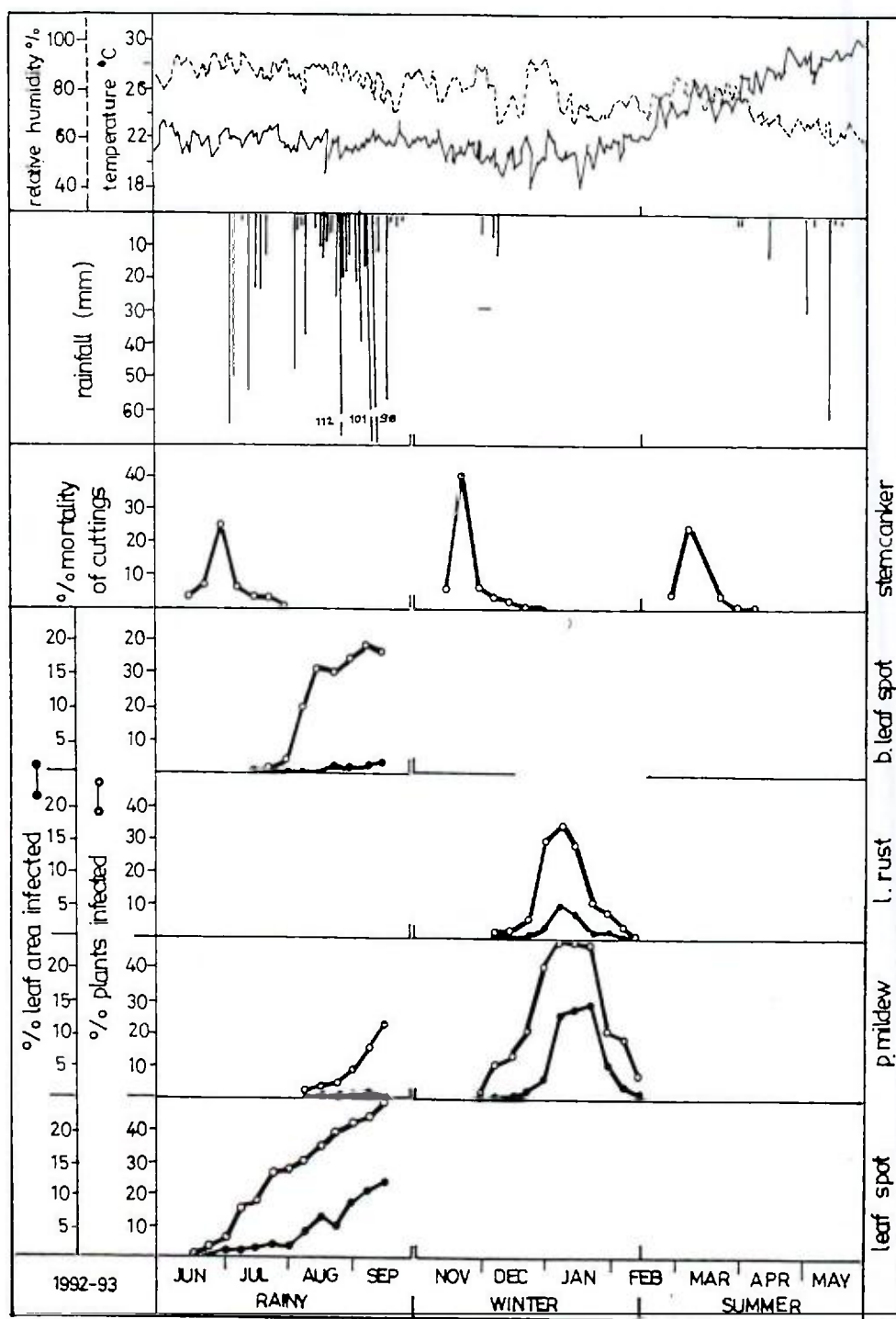


Fig. 2: Seasonal incidence and intensity of some important nursery diseases during 1992-93.

Fig. 2 : Incidence et intensité saisonnières des principales maladies de pépinière en 1992-93.

DISCUSSION

The foliar diseases of mulberry in the nursery can be grouped as seasonal diseases while the stem canker occurred throughout the year. The leaf spot and bacterial blight occurred during the rainy season, powdery mildew initiated on plants during the later part of the rainy season, reaching maximum intensity in winter months of November-January. The patterns of occurrence of these diseases are similar to their occurrence in well-established gardens (Sukumar and Ramalingam, 1989; Krishnaprasad and Siddaramaiah, 1979). The leaf spot pathogens, *Cercospora moricola* and *Pseudomonas mori*, appear on plants only during the rainy season owing to their adaptation to splash dispersal (Sukumar and Ramalingam, 1981, 1989). These two pathogens are soil-borne and the leaves produced on the cuttings are easily accessible to soil-borne inoculum. This accounts for the increased incidence of the disease with successive rains. The powdery mildew pathogen, *Phyllactinia corylea*, and the leaf rust fungus, *Peridermium mori*, are air-borne diseases and hence the diseases spread faster in the nursery, causing more damage than the leaf spot disease. Close planting in the nursery favours disease development. The foliar diseases result in premature defoliation which causes reduced vigour of the plant. The saplings become weak and unsuitable for planting.

Among the diseases recorded in the nursery, the stem canker, caused by *Lasiodiplodia theobromae*, inflicts major damage by killing the stem cuttings. The disease is rampant throughout Karnataka, causing 30-70 percent mortality of stem cuttings in the nurseries (Sukumar *et al.*, 1992).

Soils become sick due to repeated use of nursery over the years, creating serious site-related problems.

With the information generated in the present study, the following suggestions are made to minimize the loss due to diseases in the nursery:

1. Raising saplings repeatedly in the same nursery site should be avoided.
2. Planting of cuttings during winter should be avoided.
3. Best seasons for raising saplings are rainy and summer months (under irrigated conditions).
4. Prior to planting, the cuttings should be soaked in 0.2 percent carbendazim solution for 30 minutes. This should be followed by a 0.1 percent spray of carbendazim 15 days after planting.
5. The leaf spot, powdery mildew and leaf rust diseases can be controlled by spraying 0.1 percent carbendazim twice at 10 days' interval as a general protective measure. To control bacterial leaf spot, a 100 ppm solution of streptomycin can be sprayed at weekly intervals.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Director, Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Bangalore, for facilities and encouragement.

REFERENCES

- DANDIN S.B. (1990) Raising mulberry saplings on commercial scale. KSSR & DI Publication No. 1, 16 pp.
- KRISHNAPRASAD K.S., SIDDARAMAIAH A.L. (1979) Studies on the development of powdery mildew disease of mulberry in Karnataka. Indian J. Seric., 18, 10-13.
- LUKE P.B., SATHIYA PAUL K.M. (1982) A new record of *Botryodiplodia theobromae* on *Morus alba* L. Current Science, 51, 427.
- PATEL M.K., KAMAT M.N., BHIDE (1949) Fungi of India. Indian Phytopath., 2, 148.
- PRASAD K.V., YADAV B.R.D., SULLIA S.B. (1993) Taxonomic status of mulberry rust in India. Current Science, 65, 424-425.
- RAMAKRISHNAN T.S., SUDAN N.V. (1954) *Phyllactinia corylea* in India. Indian Phytopath., 7, 61-68.
- SINHA S.K., SAXENA S.E. (1966) First record of bacterial blight of mulberry in India caused by *Pseudomonas mori* (Boyer et Lambert) Stevens. Indian Phytopath., 19, 318-319.

- STOVER S.A. (1971) A proposed international scale for estimating intensity of banana leaf spot (*Mycosphaerella musicola* Leach). Trop. Agric. Trin., 48, 185-196.
- SUKUMAR J., RAMALINGAM A. (1981) Splash dispersal in *Cercospora moricola* Cooke. Science and Culture, 47, 173-175.
- 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., YADAV B.R.D., PRASAD K.V. (1991) Stem canker — A serious nursery disease of mulberry in Karnataka. Indian Silk, 29, 42-45.
- SUKUMAR J., PRASAD K.V., BONGALE U.D., DANDIN S.B. (1992) Studies on *Botryodiplodia* stem canker disease of mulberry. Proceedings of the National Conference on Mulberry Sericulture Research 10-11 December, CSR & TI, Mysore, India, 58.

INCIDENCE SAISONNIERE DE CERTAINES MALADIES IMPORTANTES DU MURIER EN PEPINIERE

J. SUKUMAR, S.D. PADMA, T.D. NAGENDRA KUMAR & U.D. BONGALE

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

On a étudié l'incidence et l'intensité de quatre maladies foliaires et d'une maladie grave de la tige chez la variété de mûrier M-5 en pépinière en été, à la saison pluvieuse et en hiver au cours de la période 1991-1993. La tache foliaire, l'oïdium, la rouille et la tache foliaire bactérienne donnent un profil d'intensité saisonnière marqué tandis que le chancre de la tige est présent tout au long de l'année. La tache foliaire et la tache foliaire bactérienne ont une incidence élevée pendant les mois d'août et de septembre, mois qui recouvrent la moitié de la saison pluvieuse. L'intensité de l'oïdium et de la rouille est élevée en décembre et en janvier (hiver). La mortalité des boutures et des plantules due au chancre de la tige est plus élevée chez les boutures plantées en hiver, devant les boutures plantées à la saison pluvieuse et en été. Les résultats sont discutés et des mesures de contrôle à prendre en fonction de l'influence saisonnière sont présentées.

INTRODUCTION

Le mûrier (*Morus alba* L.), principale plante hôte du ver à soie (*Bombyx mori* L.), est reproduit de manière végétative dans les zones tropicales. Les plantules sont cultivées à partir de boutures de tige plantées en pépinière, ce qui permet de réduire les coûts et d'uniformiser le développement de la plantation. Compte tenu des programmes de développement de la sériciculture indienne dans le cadre du *National Sericulture Project* financé par la Banque mondiale, plusieurs organismes envisagent de mettre en place des pépinières destinées à la production commerciale de plantules (Dandin, 1990).

Le mûrier est affecté par quatre principales maladies foliaires, à savoir la tache foliaire causée par *Cercospora moricola* Cooke (Patel et coll., 1949), la rouille foliaire causée par *Peridiospora mori* Prasad (Prasad et coll., 1993), l'oïdium causé par *Phyllactinia corylea* (Pers.) Karst (Ramakrishnan et Sudan, 1954) et la tache foliaire bactérienne causée *Pseudomonas mori* Bayer et Lambert (Sinha et Saxena, 1966), ainsi que par une maladie de la tige, le chancre, causé par *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon et Maubl. (Luke and Sathiya Paul, 1982). Les maladies foliaires entraînent une diminution de la vigueur de la plante tandis que le chancre de la tige provoque la mort des boutures et des plantules (Sukumar et coll., 1991). Malgré les dommages importants occasionnés par ces maladies, on manque d'informations sur leur incidence et leur intensité saisonnières en pépinière. Cette étude décrit l'incidence et l'intensité saisonnière de ces maladies dans les pépinières de mûrier.

MATERIELS ET METHODES

On a choisi la variété de mûrier M-5 (*Morus alba*) pour cette étude, qui a été réalisée sur deux ans (1991-92 1992-93). Des boutures de mûrier de 15 à 20 cm de long et comportant chacune 3 à 4 bourgeons actifs ont été préparées à partir de plants parentaux âgés d'un an et dont l'épaisseur de la tige est de 1,0 à 1,5 cm. Les litières de bouturage, d'une surface de 2,4 m × 1,2 m, ont été préparées dans une pépinière de cinq ans utilisée de manière répétée pour cultiver les plantules. Les boutures ont été plantées à espacement de 8 × 20 cm. Environ 20 kg de fumier de ferme ont été appliqués et on a planté 150 boutures par litière. Les litières ont été arrosées régulièrement tous les 4 à 5 jours. De l'urée à raison de 500 g/litière a été appliquée après 60 jours.

On a identifié trois saisons, à savoir la saison pluvieuse, l'hiver et l'été. La plantation a été effectuée le premier ou le deuxième jour du premier mois de chacune des saisons. Les données sur l'incidence saisonnière des maladies foliaires et sur le pourcentage de surface foliaire infestée ont été relevées toutes les semaines, selon le protocole de Stoven (Stoven, 1971) (échelle de 0 à 6 pour la tache foliaire et l'oïdium et échelle de 0 à 10 pour la rouille et la tache foliaire bactérienne). Les données ont été notées pendant 3 mois et demi. Les données météorologiques ont été relevées à l'aide d'instruments standard installés sur le terrain.

RESULTATS

Les données enregistrées de 1991 à 1993 sont présentées dans les figures 1 et 2. Les données météorologiques ont permis d'identifier trois saisons. La mousson du sud-ouest, qui apporte la majeure partie des pluies annuelles, commence généralement au cours de la première semaine de juin et dure jusqu'à la fin du mois d'octobre. La température se situe entre 22 et 26 °C et l'humidité relative entre 70 et 90 %. En hiver, de novembre à mi-février, les températures sont basses (18 à 24 °C) et l'humidité relative est habituellement de 50 à 70 %. De la mi-février au mois de mai, la température est élevée (32 à 36 °C) et l'humidité relative faible (40 à 60 %) ; cette saison a été désignée comme étant l'été.

Au cours de nos investigations, nous avons observé quatre maladies foliaires, à savoir la tache foliaire, l'oïdium, la rouille et la tache foliaire bactérienne, et une maladie chronique de la tige, le chancre. Les maladies foliaires sont saisonnières tandis que le chancre de la tige est présent tout au long de l'année.

Tache foliaire :

La tache foliaire a été observée à la saison pluvieuse. La courbe de développement de la maladie est identique pour les deux années considérées. Les dommages sont maximaux en août et en septembre en 1992-93 avec 50 % des plantules atteintes par la maladie et 20 % de la surface foliaire détruite.

Oïdium :

Cette maladie a été observée dans la deuxième partie de la saison pluvieuse (août à octobre) et en hiver. Les données indiquent que l'oïdium commence à la saison pluvieuse et atteint son pic en hiver (décembre-janvier). En 1991-92, l'incidence est maximale en décembre et en janvier, mois au cours desquels environ 45 % des plants sont infestés et 15 % de la surface foliaire est détruite. En 1992-93, 50 % des plants étaient infestés et 25 % de la surface foliaire était colonisée par l'agent pathogène.

Rouille foliaire :

Cette maladie a été observée en hiver pour les deux années considérées, l'infestation étant maximale en décembre-janvier. En 1991-92, l'infestation était maximale, avec 50 % des plants infestés et 20 % de la surface foliaire détruite. Par comparaison, en 1992-93, 35 % des plants étaient infestés et 10 % de la surface foliaire était détruite.

Tache foliaire bactérienne :

Cette maladie se limite également à la saison pluvieuse pour les deux années considérées. L'incidence est plus élevée en 1992-93 avec 40 % des plants infestés et 3 % de la surface foliaire détruite. En 1991-92, 30 % des plants étaient infestés et 1 % de la surface foliaire était détruite. Sur l'ensemble des maladies foliaires, la tache foliaire bactérienne semble être une maladie mineure.

Chancre de la tige :

Cette maladie est persistante d'une année à l'autre et est présente tout au long de l'année quelle que soit la saison ; elle entraîne la mort des boutures et des plantules. Les symptômes se manifestent 15 jours après la plantation, entraînant la mort et le pourrissement des boutures et le dessèchement des bourgeons. Bien que cette maladie ait été observée à toutes les saisons, la mortalité des bourgeons est maximale en hiver. En 1991-92, la mortalité des boutures était de 18, 45 et 20 % respectivement

à la saison pluvieuse, en hiver et en été, les valeurs correspondantes pour 1992-93 sont de 25, 40 et 28 %.

DISCUSSION

Les maladies foliaires du mûrier en pépinière peuvent être classées dans le groupe des maladies saisonnières tandis que le chancre de la tige est présent tout au long de l'année. La tache foliaire et la flétrissure bactérienne sont présentes à la saison pluvieuse ; l'oïdium apparaît sur les plants dans la deuxième partie de la saison pluvieuse et atteint une intensité maximale en novembre et en janvier (hiver). Le profil d'apparition de ces maladies est identique à celui de leur présence dans les plantations bien établies (Sukumar et Ramalingam, 1989 ; Krishnaprasad et Siddaramaiah, 1979). Les agents pathogènes de la tache foliaire (*Cercospora moricola* et *Pseudomonas mori*) apparaissent sur les plants seulement à la saison pluvieuse en raison de leur adaptation à la propagation par les gouttes (Sukumar et Ramalingam, 1981, 1989). Ces deux agents pathogènes sont portés par le sol et les feuilles des boutures sont d'accès facile pour l'inoculum. Ceci explique l'augmentation de l'incidence de la maladie lorsque les pluies sont abondantes. L'agent pathogène de l'oïdium (*Phyllactinia corylea*) et le champignon responsable de la rouille (*Peridiospora mori*) sont des maladies portées par l'air, c'est pourquoi elles se propagent plus rapidement en pépinière et occasionnent des dommages plus importants que la tache foliaire. La plantation à espacement rapproché favorise le développement des maladies en pépinière. Les maladies foliaires entraînent une défoliation prématurée, ce qui diminue la vigueur de la plante. Les plantules se détériorent et deviennent impropres à la plantation.

Parmi les maladies observées en pépinière, le chancre de la tige, causé par *Lasiodiplodia theobromae*, provoque davantage de dommages en tuant les boutures. Cette maladie sévit dans la totalité du Karnataka et entraîne une mortalité de 30 à 70 % des boutures en pépinière (Sukumar et coll., 1992).

Les sols deviennent malades du fait de l'utilisation répétée de la pépinière année après année, ce qui crée d'importants problèmes liés au site.

Les informations obtenues dans cette étude permettent de dégager les suggestions suivantes pour minimiser les pertes dues aux maladies dans les pépinières :

1. La culture répétée des plantules dans une même pépinière doit être évitée.
2. La plantation des boutures en hiver doit être évitée.
3. Les meilleures saisons pour la culture des plantules sont la saison pluvieuse et l'été (en milieu irrigué).
4. Avant la plantation, les boutures doivent être trempées dans une solution de carbendazim à 0,2 % pendant 30 minutes, puis traitées 15 quinze jours après la plantation par vaporisation de carbendazim à 0,1 %.
5. Il est possible d'enrayer la tache foliaire, l'oïdium et la rouille en vaporisant deux fois une solution de carbendazim à 0,1 % à 10 jours d'intervalle comme mesure préventive générale. Pour la tache foliaire bactérienne, on préconise une solution de streptocycline à 100 ppm deux fois à une semaine d'intervalle.

SOME RECORDS OF PESTS AND PREDATORS OF PRIMARY MUGA FOOD PLANTS AND MUGA SILKWORMS (*ANTHERAEA ASSAMA* WW.) IN ASSAM

P.K. SINGH & P.K. DAS

Regional Muga Research Station, Boko - 781 123, India.

Keywords: *Machilus bombycina*, *Litsaea polyantha*, food plant, *Antheraea assama*, silkworm pests, predators.

The primary muga food plants Som (*Machilus bombycina* King) and Soalu (*Litsaea polyantha*) are abundantly grown in forests stretching along the Brahmaputra valley. An estimated amount of 2237 hectares of village-grazing reserves were brought under muga plantation and 2466 hectares in the homestead of rearers (Chaudhury, 1981), whereas 1414.69 were recorded to be under muga food plants in seventeen districts of Assam (Thangavelu, 1988). Som and Soalu plants are used for rearing of the muga silkworm, *A. assama*, which produces precious golden yellow silk of high economic importance. Being wild in nature the food plants as well as the muga silkworms are exposed to a wide range of pests, parasites and predators. During Jarua crop (December-February), the muga silkworm suffers heavy loss due to infestation by the uzi fly, *Blepharipa zebina*, to the extent of as high as 86% in the Boko area (Singh *et al.*, 1993). Considering the economic importance of the food plants and muga silkworms, the present study has been undertaken to identify pests, parasites and predators.

MATERIALS AND METHODS

For the present study the existing plantation at the Regional Muga Research Station, Boko, (latitude 25.9 N, longitude 1.2 E) situated at an altitude of 95 m ASL in the subtropical region of North East India has been considered.

The survey was conducted during 1991-92. Visiting insects were collected mechanically and the direct counting method was applied. The immature stages were cultured for adult emergence to facilitate identification. The sorting of the different species was done group-wise under a stereoscopic binocular microscope. The specimens were identified at the International Institute of Entomology, British Museum (Natural History) UK. A total thirty-nine insect specimens belonging to twenty-five families were identified and are presented in Tables I and II. Besides, nine birds, five mammals and four reptiles were also collected and identified at the Zoological Survey of India, Shillong, India.

REFERENCES

- CHAUDHURY S.N. (1981) Muga Silk Industry. Directorate of Sericulture and Weaving, Govt. of Assam, Guwahati, India, pp. 3-13.
SINGH P.K., DAS P.K., NEGI B.K. (1993) Studies on seasonal incidence of uzi fly. Annual Report. Regional Muga Research Station, Boko, Assam, India, p. 7.
THANGAVELU K., CHAKRABORTY A.K., BHAGOWATI A.K., ISA MD. (1988) Handbook of Muga Culture. Central Silk Board, Bangalore, India, pp. 4-6.

Table I. Insect pests of the primary food plants, *Machilus bombycina* and *Litsaea polyantha*.

Tableau I. Insectes infestant les plantes nourricière primaires *Machilus bombycina* et *Litsaea polyantha*.

Order Ordre	Family Famille	Genus/Species Genre/Espèce	Common name Nom vernaculaire
Hemiptera	Aphididae	<i>Pseudonipponaphis himalayensis</i> Ghose & Ray Choudhury	Plant louse <i>Aphis</i>
	Triozidae	<i>Aiceona titibarensis</i> <i>Aiceona robustiseta</i>	Plant louse / <i>Aphis</i> Plant louse / <i>Aphis</i>
	Psyllidae	<i>Pauropsylla beesoni</i>	Leaf gall of Soalu <i>Psylle foliaire de Soalu</i>
Thysanoptera	Thripidae	<i>Thrips flavus</i> <i>Thrips hawaiiensis</i>	Thrips <i>Thrips</i>
Lepidoptera	Cossidae	<i>Zeuzera indica</i> Herrich Schaffer	Carpenter moth / <i>Zeuzère</i>
	Metarbelidae	<i>Inderabeta phaga</i> Swinhoe	Bark eater / <i>Mangeur d'écorce</i>
	Pyalidae	<i>Pleuroptya scienisalis</i> (Walker)	Leaf roller / <i>Pyrale enrouleuse</i>
		<i>Gibovalva quadrifasciata</i> (Walker)	Leaf minor / <i>Pyrale mineuse</i>
	Nymphalidae	<i>Charaxes brenardus</i> Fabricius	Defoliating insect <i>Chenille défoliatrice</i>
	Papilionidae	<i>Graphium sarpedon</i> Linnaeus	Defoliating insect <i>Chenille défoliatrice</i>
	Saturniidae	<i>Cricula trifenestrata</i>	Defoliating insect <i>Chenille défoliatrice</i>
	Lymantriidae	<i>Leucoma</i> sp. <i>Redoa</i> sp.	Defoliating insect <i>Chenille défoliatrice</i>
	Arctiidae	<i>Cyana</i> sp.	Defoliating insect <i>Chenille défoliatrice</i>
Diptera	Cecidomyiidae	<i>Asphondylia</i> sp.	Leaf gall of Som <i>Cécidomyie de Som</i>
		<i>Sarcophaga misera</i>	Leaf gall of Som <i>Cécidomyie de Som</i>
		<i>Sarcophaga sericea</i>	Leaf gall of Som <i>Cécidomyie de Som</i>
Coleoptera	Coccinellidae	<i>Harmonia dimidiata</i> (Fabricius)	Ladybird / <i>Coccinelle</i>
	Chrysomelidae	<i>Sastroides lividus</i> (Laboissie)	Ladybird / <i>Coccinelle</i>
		<i>Dercetina histrio</i> (Baly)	Ladybird / <i>Coccinelle</i>
		<i>Lamprolabus spiculatus</i> (Boheman)	Ladybird / <i>Coccinelle</i>

Table II. Parasites and predators of the muga silkworm (*A. assama*).Tableau II. Parasites et prédateurs du ver à soie muga (*A. assama*).

Order Ordre	Family Famille	Genus/Species Genre/Espèce	Common name Nom vernaculaire
Diptera	Tachinidae	<i>Blepharipa zebina</i> <i>Exorista sorbillans</i> <i>Carcelia</i> sp. <i>Sturmia sericariae</i>	Uzi fly / Mouche uzi Uzi fly / Mouche uzi Uzi fly / Mouche uzi Tachinid fly / Tachine
Hemiptera	Pentatomidae Reduviidae	<i>Canthecona furcellata</i> <i>Reduvius cincticus</i>	Sting bug / Pentatome Reduviid bug / Rèduve
Hymenoptera	Chalcididae Ichneumonidae Vespidae Formicidae Braconidae	<i>Brachymeria</i> <i>Xanthopimpla</i> sp. <i>Polistes hebraeus</i> <i>Vespa orientalis</i> <i>Solenopsis</i> sp. <i>Camponotus</i> sp. <i>Oecophylla smangdine</i> <i>Apanteles stantoni</i>	Chalcid fly / Chalcide Ichneumon fly / Ichneumon Vespa / Poliste Wasp / Guêpe Fire ant / Fourmi rousse Carpenter ant / Fourmi du bois Red ant / Fourmi rouge Braconid fly / Braconide
Dictyotera	Mantidae	<i>Hierodula Westwoodi</i>	Mantid / Mantide
Aves		<i>Pycnonotus jocosus</i> <i>Aeridotheras tristis</i> <i>Amandava amandava</i> <i>Motacilla alba</i> <i>Docyris acrorhynches</i> <i>Oriolus xanthornus</i> <i>Corvus splendens</i> <i>Ciacidium radiatum</i> <i>Passer domesticus</i>	Bulbul Myna / Mainate Myna / Mainate Wagtail / Bergeronnette Drongo Golden oriole / Loriot Jungle crow / Corneille Owl / Hibou House sparrow / Moineau domestique
Mammalia		<i>Canis aureus</i> <i>Pteropus giganteus</i> <i>Macaca</i> sp. <i>Vulpus bengalensis</i> <i>Mus musculus</i>	Jackal / Chacal Fox / Renard Monkey / Macaque Fox / Renard Mouse / Souris
Reptiles		<i>Naia naia</i> <i>Calotis versicolor</i> <i>Hemidactylus flaviviridis</i> <i>Bungarus fasciatus</i>	Cobra snake / Cobra Garden lizard / Lézard Wall lizard / Lézard des murailles Snake / Serpent

OBSERVATION DE PARASITES ET DE PREDATEURS DES PLANTES NOURRICIERES PRIMAIRES MUGA ET DU VER A SOIE MUGA (*ANTHERAEA ASSAMA* WW.) DANS L'ASSAM

P.K. SINGH & P.K. DAS

Regional Muga Research Station, Boko - 781 123, India.

Les plantes nourricières primaires muga Som (*Machilus bombycina* King) et Soulu (*Litsaea polyantha*) sont cultivées en grandes quantités dans les forêts de la vallée du Brahmapoutre ; 2 237 hectares de réserves de pâturage et 2 466 hectares d'exploitations fermières ont été plantés en muga (Choudhury, 1981); on a par ailleurs relevé une surface d'exploitation de plantes nourricières muga de 1 414.69 hectares dans dix-sept districts de l'Assam (Thangavelu, 1988). Les plantes Som et Soulu sont utilisées pour l'élevage du ver à soie muga *Antheraea assama*, qui produit une soie de couleur jaune d'or précieuse pour l'économie locale. Etant donné leur nature sauvage, les plantes nourricières et le ver à soie muga sont exposés à un grand nombre de parasites et de prédateurs. Au cours de l'élevage de Jarua (décembre à février), l'infestation par la mouche uzi *Blepharipa zebina* occasionne de fortes pertes pouvant atteindre 86% dans la région de Boko dans les récoltes de vers à soie muga (Singh et coll., 1993). Compte tenu de leur importance économique, cette étude a été réalisée afin d'identifier les parasites et les prédateurs des plantes nourricières et du ver à soie muga.

MATERIELS ET METHODES

La plantation de la *Regional Muga Research Station* de Boko (latitude 25°9' N, longitude 1°2' E) située à une altitude de 95 m dans la région subtropicale du nord-est de l'Inde a été retenue comme site expérimental.

L'étude a été réalisée en 1991-92. Les insectes parasites ont été prélevés manuellement et la méthode du comptage direct a été appliquée. Les stades immatures ont été élevés jusqu'à émergence des adultes pour faciliter l'identification. Le classement des différentes espèces a été réalisé par regroupement à la loupe binoculaire. Les spécimens ont été identifiés à l'*International Institute of Entomology* du *British Museum* (histoire naturelle), Royaume-Uni. Au total, trente-neuf spécimens d'insectes appartenant à 25 familles ont été identifiés et sont détaillés dans les tableaux I et II; en outre, neuf oiseaux, cinq mammifères et quatre reptiles ont été prélevés et identifiés au *Zoological Survey of India* de Shillong (Inde).

BIBLIOGRAPHIE - BIBLIOGRAPHY

Sériciculture générale	771
General sericulture	
Mûrier	774
Mulberry	
<i>Bombyx mori</i> : élevage, nutrition, pathologie	780
<i>Bombyx mori</i> : rearing, feeding, pathology	
Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie	786
Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology	
Vers à soie : génétique	789
Silkworms: genetics	
Vers à soie : physiologie, biochimie	794
Silkworms: physiology, biochemistry	
Vers à soie : oeufs, embryologie	802
Silkworms: eggs, embryology	
Vers à soie : glandes séricigènes	804
Silkworms: silk glands	
Soie	805
Silk	

INDICATIFS DES LANGUES UTILISEES - LANGUAGE SYMBOLS USED

(Bg) Bulgare / <i>Bulgarian</i>. (D) Allemand / <i>German</i>. (F) Français / <i>French</i>. (I) Italien / <i>Italian</i>. (K) Coréen / <i>Korean</i>. (Pt) Portuguais / <i>Portuguese</i>. (Ro) Roumain / <i>Rumanian</i>.	(C) Chinois / <i>Chinese</i>. (E) Anglais / <i>English</i>. (J) Japonais / <i>Japanese</i>. (Pl) Polonais / <i>Polish</i>. (R) Russe / <i>Russian</i>. (S) Espagnol / <i>Spanish</i>.
--	---

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

L'élevage des vers à soie dans les pays tropicaux.

Silkworm rearing in tropical countries.

BOEDTS B.

1996 Echos du COTA (Belgium), Vol. 71, 3-9. (F)

Scientific books and articles on plant protection and sericulture in North Korea.

Ouvrages et articles scientifiques sur la protection des végétaux et la sériciculture en Corée du Nord.

BOO K.S.

College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Suwon, Korea Republic.

1995 Korean Journal of Applied Entomology (Korea Republic), Vol. 34(1), 53-60. (Ko,e)

Good results from the long-term and strict prevent of pebrine disease.

Les bons résultats de la prévention stricte et à long-terme contre la pébrine.

CHEN D.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(3), 39-40. (C)

The developmental history of sericulture in Zhejiang Province.

L'histoire du développement de la sériciculture dans la province de Zhejiang.

CHEN Q.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(3), 7-9. (C)

Comparative studies on the price of cocoon and other agricultural products.

Etude comparative sur le prix du cocon et d'autres produits agricoles.

CHEN Q.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(4), 15-17. (C)

Production de la soie au Viêt-nam : les aléas d'une "transition".

Silk production in Vietnam: the hazards of a 'transition'.

CLAVAIROLLE F.

UPR 191, CNRS "Techniques et culture", 6 passage Montbrun, 75014 Paris, France.

1996 Cahiers Agriculture (France), Vol. 5, 435-444. (F,e)

La nouvelle mue du ver à soie.

New moulting of the silkworm.

DELOBETTE H.

1996 Biofutur (France), Vol. 153, 33-34. (F)

Glutathione transferase in silkworm larvae and honeybee workers.

La glutathion transférase chez les sériciculteurs et les apiculteurs.

EL-GHARFEEB A.M., OMAR M.O.M.

Faculty of Agriculture, Assiut University, Egypt.

1994 Assiut Journal of Agricultural Sciences (Egypt), Vol. 25(4), 181-189. (E,ar)

Test on the change of arrangement of the autumn crop in Tongxian County.

Test sur le changement de l'aménagement de l'élevage d'automne dans le comté de Tongxian.

GUO W.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(4), 46. (C)

Productivity club - a quality circle in silk.

Club de productivité : un cercle de qualité pour la soie.

NADIGER G.S.

Central Silk Technological Research Institute, Madivala, CSB Complex, Bangalore 560 068, India.

1996 Indian Silk, Vol. 35(4-5), 9-12. (E)

Preferential sources of information by sericulturists - A study in Karnataka.

Les sources d'informations préférées par les sériciculteurs - Une étude au Karnataka.

PRADHAN D.K., DOLLI S.S., IYENGAR M.N.S., DATTA R.K.

Department of Sericulture, Orissa, India.

1996 Indian J. Seric., Vol. 35(1), 28-31. (E)

How is silk produced ?

Comment la soie est-elle produite ?

RAO C.G.P.

Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.

1996 Indian Silk, Vol. 35(6/7), 18. (E)

Utilization of sericultural by-products - A Chinese example.

Utilisation des produits séricicoles dérivés : un exemple chinois.

SATYANARAYANA RAJU C.

Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.

1996 Indian Silk, Vol. 35(6/7), 19-20. (E)

Effect of feeding muga silkworm pupae waste as a substitute for fish-meal in broiler ration.

Effet du nourrissage des poulets de batterie avec des déchets de chrysalides du ver à soie muga comme substitut de farine de poissons.

SENGUPTA S., CHOUDHURY K., BHATTACHARYYA I.K., CHOUDHARY S.K.

Department of Chemistry, Cotton College, Guwahati, India.

1995 Indian Journal of Animal Sciences (India), Vol. 65(7), 827-829. (E)

To consider the reform and development of silk industry by analysing the reasons for great rise and decline in the silk market.

Etude de la réforme et du développement de l'industrie de la soie en analysant les raisons des fortes fluctuations du marché de la soie.

SHENG J.R.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(3), 27-29. (C)

Socio-economic factors and their relation to adoption of improved sericultural practices.

Facteurs socio-économiques et leur lien avec l'adoption de pratiques séricoles améliorées.

SRINIVASA G., DOLLI S.S., RAVEENDRA M., IYENGAR M.N.S.

Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.

1996 Indian J. Seric., Vol. 35(1), 43-45. (E)

Prospect of the development of sericultural production in Zhuji County.

Perspective du développement de production séricicole dans le comté de Zhuji.

WANG J.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(4), 42-43. (C)

To accelerate the modern construction of sericultural production in Shaoxin area.

Accélérer la construction moderne de la production séricicole dans la région de Shaoxin.

WANG J.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(4), 39-41. (C)

Current situation of silkworm races for spring crop in Zhejiang Province and our policy.

Situation actuelle des races de vers à soie pour les élevages de printemps dans la province de Zhejiang et notre politique.

XU C.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(3), 1-2. (C)

Analysis of the cocoon production in Zhejiang Province during the 8th five-year period.

Analyse de la production de cocons dans la province du Zhejiang au cours du huitième plan quinquennal.

ZHOU J.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(4), 9-11. (C)

Mûrier

Mulberry

Fortification of chlorotic leaf of mulberry (*Morus indica* L. variety M-5) with sucrose for improvement of its feed value to the silkworm, *Bombyx mori* L.

Fortification des feuilles chlorotiques du mûrier (*Morus indica* L. variété M-5) avec du saccharose pour l'amélioration de sa valeur nutritive pour le ver à soie *Bombyx mori* L.

BONGALE U.D., KRISHNA M.

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

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(1), 64-66. (E)

Effect of multinutrient foliar spray on chlorosis in M-5 variety of mulberry.

Effet d'un spray foliaire multi-nutriments sur la chlorose de la variété M-5 de mûrier.

BONGALE U.D., KRISHNA M., CHALUVACHARI.

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

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(1), 9-12. (E)

Nitrate reductase activity in relation to leaf maturity in mulberry (*Morus indica* L.)

Activité de la nitrate réductase en relation avec la maturité des feuilles chez le mûrier (*Morus indica* L.)

BONGALE U.D., LEELAVATHI B.C.

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

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(1), 71-72. (E)

Studies on the relationship between gas exchange traits and genetic variability in mulberry (*Morus alba* L.) under irrigated and rainfed conditions.

Etudes sur les relations entre les caractères des échanges gazeux et la variabilité génétique chez le mûrier (*Morus alba* L.) en conditions d'irrigation et pluviale.

CHAKRABARTI S., SINGHAL B.K., THIPPESWAMY T., REKHA M.

Central Sericultural Res. and Training Inst., Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(1), 54-56. (E)

Evaluation of procedures for interspecific protoplast fusion in mulberry.

Evaluation des procédures pour la fusion des protoplastes interspécifiques chez le mûrier.

CHAND P.K., SAHOO Y., PATTHAIK S.K., PATTHAIK S.N.

Plant Tissue and Cell Culture Facility, Post-Graduate Department of Botany, Utkal University, Bhubaneswar 751 004, India.

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(1), 46-49. (E)

Study on the chemicals for the control of mulberry white fly.

Etude sur les produits chimiques utilisés dans la lutte contre la mouche blanche du mûrier.

CHANG Z.

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(3), 23-26. (C)

Suppressive effects of N-triacontanol on symptoms of mulberry dwarf disease and on the causal phytoplasma.

Effets supprimeurs du N-triacontanol sur les symptômes du nanisme du mûrier et sur le phytoplasme causal.

DAI Q., SUN Z.

Department of Biology, Shandong University, Jinan 250100, China.

1995 Plant Pathology (United Kingdom), Vol. 44(6), 979-981. (E)

Response of different mulberry cultivars to azotobacter biofertilizer under irrigated conditions.

Réponse de différents cultivars du mûrier à l'engrais biologique azotobacter en conditions d'irrigation.

DAS P.K., HANUMANTHA GOWDA M., KATYAR R.S., GHOSH A., CHOUDHURY P.C.

Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.

1996 Indian J. Seric., Vol. 35(1), 35-38. (E)

Studies on awareness and adoption of plant protection measures by sericulturists.

Etudes sur la prise de conscience et l'adoption de mesures de protection des végétaux par les sériculteurs.

GOVINDAIAH *et al.*

Regional Sericultural Research Station, Salem 636 003, India.

1996 Indian J. Seric., Vol. 35(1), 19-23. (E)

Possibilities of rearing foreign hybrids and varieties of white mulberry (*Morus alba* L.) in Yugoslav conditions.

Possibilités d'élever des hybrides étrangers et des variétés de mûrier blanc (*Morus alba* L.) dans les conditions yougoslaves.

GRBOVIC B.

Institut za sumarstvo, Beograd, Yugoslavia.

1995 Zbornik radova - Institut za sumarstvo (Yugoslavia), Vol. 36-37, 51-57. (Sr,e)

An essential balm method for preparing chromosome specimens of mulberry.

Une méthode pour la préparation de spécimens de chromosomes du mûrier.

HE F.

1996 Canye Kexue, Vol. 22(4), 262-263. (C)

Influence of plant growth stage and season on the release of root phenolics by mulberry as related to development of phytoremediation technology.

Influence du stade de croissance et de la saison sur la libération des phénols radiculaires chez le mûrier en fonction de la technique de désherbage.

HEDGE R.S., FLETCHER J S

1996 Chemosphere, Vol. 32, 2471-2479. (E)

Pathogenicity and physiological properties of the *Phoma* sp. isolated from browning spots on mulberry leaves.

Action pathogène et propriétés physiologiques de *Phoma* sp. isolé à partir des taches brunes sur les feuilles de mûrier.

ITAYA T., SHIRATA A., YOSHIDA S., MURAKAMI R.

National Institute of Sericultural and Entomological Sci., 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1996 Bull. Natl Inst. Seric. Entomol. Sci., Vol. 17, 63-82. (J,e)

Study, extension and application of the quarantine techniques for mulberry saplings.

Etude, extension et application des techniques de quarantaine pour les pousses de mûriers.

JIN Y.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(4), 18-20. (C)

Isolation and characterization of NaCl resistant cell line of mulberry.

Isolement et caractérisation d'une lignée de cellules résistantes au NaCl chez le mûrier.

KATHIRAVAN K., SHAJAHAN A., GANAPATHI A.

Department of Biotechnology, Bharathidasan University, Tiruchirapalli, India.

1995 *Biologia Plantarum (Czech Republic)*, Vol. 37(3), 449-451. (E)

Effects of foliar application of gibberellin, TIBA and morphactin on the characteristics of mulberry leaves.

Effets de l'application foliaire de gibbérelline, de TIBA et de morphactine sur les caractéristiques des feuilles de mûrier.

KUNO K.

Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(5), 371-377. (J,e)

Morphologic changes of mulberry roots caused by the application of niobium and tantalum.

Variations morphologiques des racines de mûrier causée par l'application de niobium et de tantale.

KUNO K.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(5), 403-405. (J)

Malformed mulberry leaves appeared by the foliar application of glyphosate.

Des feuilles de mûrier malformées apparaissent après l'application foliaire de glyphosate.

KUNO K.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(5), 406-407. (J)

Characteristics of mulberry callus proliferated by the application of brassinolide and coumarin.

Caractéristiques des cals de mûriers obtenus par l'application de brassinolide et de coumarine.

KUNO K., JI D.

Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(5), 347-351. (J,e)

Effects of niobium and tantalum on nutrient and water uptake of mulberry roots.

Effets du niobium et du tantale sur la consommation en éléments nutritifs et en eau des racines de mûrier.

KUNO K., OHMAE T.

Faculty of Agriculture, Tokyo University and Technology, Fuchu, Tokyo 183, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(6), 490-493. (J,e)

Effect of NaCl on photosynthesis parameters in two cultivars of mulberry.

Effet du NaCl sur les paramètres de photosynthèse chez deux cultivars du mûrier.

LAKSHMI A., RAMANJULU S., VEERANJANEYULU K., SUDHAKAR C.

Sri Krishnadevaraya University, Anantapur, India.

1996 *Photosynthetica (Czech Republic)*, Vol. 32(2), 285-289. (E)

The comparisons of bud dormancy and changes of carbohydrates, nitrogen among various strains of mulberry.

Comparaisons de la dormance des bourgeons et des variations des hydrates de carbone et de l'azote entre différentes espèces de mûriers.

LIN J., YU S., LIN C.

1996 *Zhonghua Nongxue Huibao*, Vol. 46(2), Vol. 173, 120-129. (C)

Review of studies on the endogenous hormones and physiological effects of mulberry.

Revue d'études sur les hormones endogènes et les effets physiologiques du mûrier.

LOU C., TAN J.

Department of Sericulture, Zhejiang Agriculture University, Hangzhou 310029, China.

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(4), 241-247. (C,e)

Transient expression of GUS gene introduced into mulberry plant by particle bombardment.

Expression transitoire du gène GUS introduit dans le mûrier par bombardement de particules.

MACHII H., SUNG G.B., YAMANOUCI H., KOYAMA A.

National Institute of Agrobiological Resources, 2-1-2 Kaonondai, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 65(6), 503-506. (E)

Bacterial leaf spot disease of mulberry in West Bengal.

Maladie bactérienne des taches sur les feuilles de mûrier au Bengale occidental.

MAJI M.D., QADRI S.M.H., PAL S.C.

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

1996 *Indian Silk*, Vol. 35(6/7), 11-12. (E)

Studies on the development of a package of cultivation for mulberry garden exclusively for young age silkworm rearing.

Etudes sur le développement d'un ensemble de techniques culturales pour les mûraies réservées exclusivement à l'élevage des jeunes vers à soie.

MISHRA R.K., CHOUDHURY P.C., MATHUR V.B., GHOSH A.

Central Sericultural Res. and Training Inst., Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(1), 13-18. (E)

Mulberry trees: the basis and remnant of the Utah silk industry.

Les mûriers : la base et le vestige de l'industrie de la soie dans l'Utah.

MONSON C.S.

Brigham Young University, Provo, Utah, USA.

1996 *Economic Botany (USA)*, Vol. 50(1), 130-138. (E,f)

Mite pests of mulberry - A review.

Les mites parasites du mûrier - Une revue.

NARAYANASWAMY K.C., GEETHABAI M., RAGHURAMAN R.

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

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(1), 1-8. (E)

Effect of some growth regulators on the germination of white mulberry *Morus alba* L.

Effet de quelques régulateurs de croissance sur la germination du mûrier blanc *Morus alba* L.

PETKOV Z.

1995 *Rastenievud. Nauki*, Vol. 32(7/8), 149-152. (E)

Studies on the factors contributing for disease resistance in mulberry against *Cercospora moricola*.

Etudes sur les facteurs contribuant à la résistance du mûrier à *Cercospora moricola*.

PHILIP T., GOVINDAIAH.

Central Sericultural Res. and Training Inst., Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(1), 39-42. (E)

Defence mechanism in mulberry.

Mécanisme de défense chez le mûrier.

PHILIP T., GOVINDAIAH.

Central Sericultural Res. and Training Inst., Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.

1996 *Indian Silk*, Vol. 35(6/7), 9-10. (E)

Reproduccion y variedades de la morera: ventajas del estaquillado lenoso en el enraizamiento.

/ Mulberry tree reproduction and varieties: advantages of the cutting in rooting.

Multiplication et variétés du mûrier : avantages de la taille sur le racinement.

RODRIGUEZ NAVARRO J., GONZALEZ MARIN F.

1995 *Vida Rural (Spain)*, Vol. 24, 64-67. (S)

PCR detection of mulberry dwarf disease-phytoplasmas in mulberry tissues, phloem sap collected by laser stylectomy and insect vector *Hishimonus sellatus*.

Détection PCR des phytoplasmes du nanisme du mûrier dans des tissus de mûrier, dans la sève élaborée prélevée par stylectomie au laser et chez l'insecte vecteur *Hishimonus sellatus*.

SATO M., MITSUHASHI W., WATANABE K., KAWAKITA H.

National Institute of Sericultural and Entomological Sci., 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(5), 352-358. (E,j)

Effect of seasons, spacings, host genotypes and fertilizer doses on the incidence of major foliar diseases in mulberry.

Effet des saisons, des espacements, des génotypes des hôtes et des doses d'engrais sur l'incidence des principales maladies foliaires chez le mûrier.

SHARMA D.D., GOVINDAIAH, GHOSH A., PHILIP T., AMBIKA P.K., CHOUDHURY P.C.

Central Sericultural Res. and Training Inst., Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(1), 57-61. (E)

pH value analysis of soil in mulberry field in Hangzhou, Jiaxing and Huzhou area.

Analyse du pH du sol dans les mûraies dans la région de Hangzhou, Jiaxing et Huzhou.

SHENG G.

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(3), 49-50. (C)

Measurement of nitrate reductase activity in mulberry leaf being short of iron and the reason causing the decline of the enzyme activity.

Mesure de l'activité de la nitrate réductase dans les feuilles de mûrier manquant de fer et la cause du déclin de l'activité de l'enzyme.

SHI Q.

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(3), 19-20. (C)

Biological characteristics of *Trichomalopsis apanteloctena* Crawford - A parasitoid of *Blepharipa zebina* Walker.

Caractéristiques biologiques de *Trichomalopsis apanteloctena* Crawford - Un parasitoïde de *Blepharipa zebina* Walker.

SINGH R.N., THANGAVELU K.

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

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(1), 62-63. (E)

Genotype and hormonal effects on callus formation and regeneration in mulberry.

Génotype et effets hormonaux sur la formation et la régénération des cals chez le mûrier.

SUSHEELAMMA B.N., SHEKAR K.R., SARKAR A., RAO M.R., DATTA R.K.

Central Sericultural Res. and Training Inst., Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.

1996 *Euphytica*, Vol. 90(1), 25-29. (E)

Evaluation of resistance of mulberry germplasm resources to *Pseudomonas syringae* pv. *mori* Van Hall.

Évaluation de la résistance des germoplasmes du mûrier à *Pseudomonas syringae* pv. *mori* Van Hall.

TIAN L., LI X.

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

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(4), 205-207. (C,e)

Effects of plant hormones on the callus induction from mulberry cotyledons.

Effets des hormones végétales sur l'induction des cals à partir des cotylédons du mûrier.

TOHJIMA F., YAMANOUCHI H., KOYAMA A., MACHII H.

Kagoshima Sericultural Experiment Station, 1678 Yuda, Higashi Ichiki-cho, Kagoshima 899-22, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(6), 510-513. (E)

Effects of various enzymes on the efficiency of protoplast isolation from mulberry mesophylls.

Effets de diverses enzymes sur l'efficacité d'isolement des protoplastes des mésophylles du mûrier.
TOHJIMA F., YAMANOUCHI H., KOYAMA A., MACHII H.

National Inst. of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1996 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 65(6), 485-489. (E,j)

Factors influencing the formation of adventitious buds from mulberry cotyledons.

Facteurs influençant la formation de bourgeons adventifs à partir des cotylédons du mûrier.

WANG Y., CHEN A., NI G.

Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China.
1996 Canye Kexue, Vol. 22(4), 208-213. (C,e)

Antioxidative activity of mulberry leaves at various maturity stages.

Activité antioxydante des feuilles de mûrier à différents stades de maturité.

WU S., YEN G.

1996 Shipin Kexue (Taipei), Vol. 23(3), 412-421. (E)

A report on breeding of mulberry variety 'Huang Lu Xuan'.

Un rapport sur la culture de la variété de mûrier "Huang Lu Xuan".

WU Y. *et al.*

1996 Canye Kexue, Vol. 22(4), 248-249. (C)

Occurrence of the mulberry sooty mold disease and its control.

Présence et lutte contre la moisissure noire du mûrier.

XIE T.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(3), 51. (C)

Relationship between the harvest method of Guangdong hybrid mulberry and the leaf production.

Relation entre la méthode de récolte du mûrier hybride de Guangdong et la production de feuilles.

YE H.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(4), 23-26. (C)

Status quo of mulberry cultivation technique and its development strategy in China.

Statu quo de la technique culturale du mûrier et sa stratégie de développement en Chine.

YE W.

Sericultural Institute, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430070, China.

1996 Canye Kexue, Vol. 22(4), 235-240. (C,e)

Extraction and identification of antioxidant components from the leaves of mulberry (*Morus alba* L.).

Extraction et identification de composants antioxydants à partir des feuilles de mûrier (*Morus alba* L.).

YEN G., WU S., DUH P.

1996 J. Agric. Food Chem., Vol. 44(7), 1687-1690. (E)

Effects of different cutting level during winter heavy pruning on mulberry.

Effets de différents niveaux de coupe au cours de la grande taille d'hiver sur le mûrier.

ZHANG J. *et al.*

1996 Canye Kexue, Vol. 22(4), 260-261. (C)

Some problems existing in soil and fertilization for mulberry field in Jiaxing, Zhejiang.

Quelques problèmes existant dans le sol et fertilisation des mûraies à Jiaxing, Zhejiang.

ZHANG Y.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(3), 47-48. (C)

***Bombyx mori* : élevage, nutrition, pathologie**

***Bombyx mori*: rearing, feeding, pathology**

Mechanism of silkworm feeding abnormalities. Selective taste-blind of bitter substances.

Mécanismes des anomalies de prise de nourriture chez le ver à soie. Test aveugle sélectif de substances amères.

ASAOKA K.

1996 *Iden*, Vol. 50(4), 72-79. (E)

Chlorine dioxide and virkon-s as disinfectants against pathogens of silkworm, *Bombyx mori* L.

Dioxyde de chlore et virkon-s comme désinfectants contre les pathogènes du ver à soie *Bombyx mori* L.

BALAVENKATASUBBAIAH M., NATARAJU B., DATTA R.K.

Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(1), 50-53. (E)

Occurence of silkworm aspergillosis and its control technique.

L'aspergillose du ver à soie et technique de lutte.

CHEN S.

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(3), 41. (C)

Studies on PCR inspection technique of *Nosema bombycis*.

Inspection de *Nosema bombycis* par PCR.

CHEN X. *et al.*

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

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(4), 229-234. (C,e)

Results of creating N12, N16 bivoltine silkworm races reared in spring and autumn.

Resultats de la création des races de vers à soie bivoltins N12 et N16 élevés au printemps et en automne.

DNA D.D.

1994 *Nong Nghiep Cong Nghiep Thuc Pham (Vietnam)*, Vol. 10, 373-375. (Vi,e)

Nutritional efficiency of two multivoltine breeds of *Bombyx mori* L. native to Assam.

Performance alimentaire de deux races polyvoltines de *Bombyx mori* L. originaire d'Assam.

DUTTA L.C., SAIKIA M.K., DUTTA S.K.

Assam Agricultural University, Jorhat 785 013, India.

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(1), 32-34. (E)

A polymerase chain reaction for the detection of nucleopolyhedroviruses in infected insects: the fate of the *Spodoptera littoralis* virus in *Locusta migratoria*.

Une PCR pour la détection des virus de la polyédrose nucléaire chez les insectes infestés : le sort du virus de *Spodoptera littoralis* chez *Locusta migratoria*.

FAKTOR O., RAVIV D.

Department of Entomology, Faculty of Agriculture, The Hebrew University of Jerusalem, P.O. Box 12, Rehovot 76100, Israel.

1996 *Journal of Virological Methods*, Vol. 61, 95-101. (E)

Degradation of silkworm excrement crude chlorophyll and synthesis of chlorin e6 ether derivatives.

Dégradation de la chlorophylle brute des excréments du ver à soie et synthèse des dérivés de la chlorine.

FANG Y., XU D.Y.

1995 *Youji Huaxue*, Vol. 15(5), 493-498. (E)

Good cocoon production by rearing the silkworm race Fengyi Furi in the area with heavy fluoride pollution.

Bonne production de cocons par l'élevage de la race de ver à soie Fengyi Furi dans la région fortement polluée par le fluorure.

FEI A.

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(3), 34-36. (C)

To maintain and improve the inherent characters of grandparent silkworm races.

Maintenir et améliorer les caractères propres aux races de ver à soie grand-parentales.

FENG J.

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(3), 3-4. (C)

Survival of Kenchu virus of *Bombyx mori* L. in manure pit through the alimentary canal of the domestic fowl.

Survie du virus Kenchu de *Bombyx mori* L. dans le fumier domestique par le canal alimentaire des volailles.

GOVINDAN R. et al.

Department of Sericulture, University of Agricultural Sciences, GKVK, Bangalore 560 065, India.

1996 *Mysore J. agric. Sci.*, Vol. 30(4), 380-388. (E)

Studies on effect of heavy metals on mulberry silkworm (*Bombyx mori* L.) development.

Effet des métaux lourds sur le développement du ver à soie du mûrier (*Bombyx mori* L.).

GREKOV D., IVANOV K., SENGALOVICH G.

Vissh Selskostopanski Institut, Plovdiv, Bulgaria.

1995 *Zhivotnov'dni Nauki (Bulgaria) - Animal Science*, Vol. 32(3-4), 173-175. (Bg,r,e)

Studies on the aseptic rearing system of silkworms (*Bombyx mori*) on artificial diet in the period from the first instar until the end of the fourth instar. 3.

Etudes sur le système aseptique d'élevage des vers à soie (*Bombyx mori*) avec aliment artificiel du premier âge à la fin du quatrième. 3.

HARADA T., WATANABE T.

Sericultural Experiment Station, Gifu-ken, Mino-kamo, Japan.

1995 *Bulletin of the Gifu Prefectural Institute of Sericultural Science (Japan)*, Vol. 5, 26-31. (J)

Comparative rearing test of silkworm larvae from the trimolter and common egg.

Test comparatif d'élevage des larves issues d'oeufs trimuants et d'oeufs communs.

JIN A.

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(4), 32-33. (C)

Effect of feeding mulberry leaf obtained by application of phosphorous from different sources and P solubilizing fungus (*Aspergillus awamori* N.) on silkworm growth and cocoon production.

Effet du nourrissage avec des feuilles de mûrier obtenues par l'application de phosphore de différentes sources et du champignon solubilisant le phosphore (*Aspergillus awamori* N.) sur la croissance du ver à soie et la production de cocons.

KRISHNA BABU K.S., SHANKAR M.A.

Department of Sericulture, University of Agricultural Sciences, Bangalore 560 024, India.

1996 *Mysore J. agric. Sci.*, Vol. 30(4), 389-393. (E)

New 'trap' to contain uzyflies.

Un nouveau "piège" pour les mouches uzy.

KUMAR P. *et al.*

Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.

1996 *Indian Silk*, Vol. 35(4-5), 13-15. (E)

Investigation on fluorine-resistance of silkworm (*Bombyx mori* L.) germplasm resources.

Investigation sur la résistance au fluor des germoplasmes du ver à soie (*Bombyx mori* L.).

LIN C. *et al.*

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(4), 253-255. (C)

Stability of silkworm variety characters.

Stabilité des caractères des variétés de ver à soie.

LIU X. *et al.*

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(4), 256-257. (C)

Laboratory evaluation of disinfectant for rearing house and tools.

Evaluation en laboratoire d'un désinfectant pour les locaux et les outils d'élevage.

LU X. *et al.*

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(4), 6-8. (C)

Effects of water content in the artificial diet on the larval growth, cocoon quality and food utilization in the silkworm, *Bombyx mori*.

Effets de la teneur en eau dans l'aliment artificiel sur la croissance larvaire, la qualité du cocon et l'utilisation de la nourriture chez le ver à soie *Bombyx mori*.

MACHIDA J., TOYODA Y., HIRAYAMA C., KONNO K., SHINBO H.

Gunma-Ken Sericultural Experiment Station, Soja, Maebashi, Gunma 371, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(5), 359-364. (J,e)

Study on the vitamin, antiseptics and antioxidants in the artificial diet for rearing the silkworm, *Bombyx mori*.

Etude sur les vitamines, les antiseptiques et les antioxydants dans l'aliment artificiel pour l'élevage du ver à soie *Bombyx mori*.

MORI H., NAKAZAWA H., SUMIDA M., MATSUBARA F., IMAMURA Y., UMEZAWA I.

1996 *Kyoto Kogei Sen'i Daigaku Sen'igakubu Gakujutsu Hokoku*, Vol. 20, 37-41. (E)

Genetic study of viability and cocoon quality of silkworm.

Etude génétique de la viabilité et de la qualité des cocons de ver à soie.

MU Z., LIU Q., LIU X.

College of Forestry, Shandong Agricultural University, Taian, China.

1995 *Journal of Shandong Agricultural University (China)*, Vol. 26(2), 157-164. (C,e)

Effect of 'Sericare' - A feed additive on silkworm productivity in silkworm *Bombyx mori* L.

Effet de "Sericare", un additif nutritif, sur la productivité en soie chez le ver à soie *Bombyx mori* L.
NAGESH S., DEVAIAH M.C.

University of Agricultural Sciences, Bangalore 560 065, India.

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(1), 67-68. (E)

Effect of mutations on the intracellular localization of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus polyhedrin.

Effet des mutations sur la localisation intracellulaire de la polyédrine du virus de la polyédrose cytoplasmique de *Bombyx mori*.

NAKAZAWA H. et al.

1996 *J. General Virology*, Vol. 77, 147-153. (E)

Utilization of 20-hydroxyecdysone extracted from a plant in sericulture.

Utilisation en sériciculture de la 20-hydroxyecdysone extraite d'un végétal.

NINAGI O., MARUYAMA M.

1996 *J.A.R.Q.*, Vol. 30(2), 123-128. (E)

Comparative investigation of *B. mori* L. fed with *Morus alba* and *Morus nigra* leaves.

Enquête comparative sur *B. mori* L. nourris avec des feuilles de *Morus alba* et de *Morus nigra*.

OVESENSKA L., PANAJOTOV M.

Vissh Institut po Zootehnika i Veterinarna Meditsina, Stara Zagora, Bulgaria.

1995 *Zhivotnov'dni Nauki (Bulgaria) - Animal Science*, Vol. 32(5-8), 138-140. (Bg,r,e)

Manifestation of heterosis in *B. mori* L. hybrids product of homogenous and heterogenous selection according to the cocoon fluorescence.

Manifestation de l'hétérosis chez des hybrides de *B. mori* L. produits par sélection hétérogène et homogène sur la fluorescence des cocons.

PANAJOTOV M.

Vissh Institut po Zootehnika i Veterinarna Meditsina, Stara Zagora, Bulgaria.

1995 *Zhivotnov'dni Nauki (Bulgaria) - Animal Science*, Vol. 32(5/8), 268-269. (Bg,r,e)

The method of preserving, evaluating and choosing gene fund of mulberry silkworm breeds.

La méthode de conservation, d'évaluation et de choix d'une banque génétique des souches de vers à soie du mûrier.

PETKOV N., PHUC H.V., BINH N.T.T.

1994 *Nong Nghiep Cong Nghiep Thuc Pham (Vietnam)*, Vol. 10, 372-373. (Vi,e)

Preliminary results of research on several exotic silkworm breeds.

Résultats préliminaires des recherches sur plusieurs souches de vers à soie exotiques.

PHUC H.V., DAM N.T.

1994 *Nong Nghiep Cong Nghiep Thuc Pham (Vietnam)*, Vol. 9, 355-356. (Vi,e)

Economic effect of concentratedly rearing young silkworm.

Effet économique des élevages concentrés de jeunes vers à soie.

PHUC H.V., VUONG P.H., DAM N.T.

1994 *Nong Nghiep Cong Nghiep Thuc Pham (Vietnam)*, Vol. 10, 379-380. (Vi,e)

Characteristics of local silkworm varieties in tropic area of Hainan.

Caractéristiques des variétés de ver à soie locales dans la région tropicale de Hainan.

QIN W.

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(4), 264. (C)

Rearing test of twice feeding daily in 5th instar with shoot rearing in spring crop.

Test d'élevage au printemps avec deux nourrissages quotidiens au cours du cinquième âge.

RUI M.

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(4), 37-38. (C)

Pebrine - monitoring and disease management strategies.

Pèbrine : stratégies de gestion et de surveillance de la maladie.

SAMSON M.V., SASIDHARAN T.O., SINGH R.N.

Silkworm Seed Technological Laboratory, Kodathi, Bangalore, India.

1996 *Indian Silk*, Vol. 35(4-5), 21-24. (E)

Demonstration of the Kairomonal activity in the pupae of uzi fly to its parasitoid.

Démonstration de l'activité kairomonale chez la pupa de la mouche uzi vis à vis de son parasitoïde.

SINGH R.N., SINHA S.S.

Central Silk Board, Guwahati 781 005, India.

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(1), 73-75. (E)

Influence of certain physical factors on the grasserie disease of silkworm, *Bombyx mori* L.

Influence de certains facteurs physiques sur la maladie de la grasserie chez le ver à soie *Bombyx mori* L.

SIVAPRAKASAM N., JAYARANI S., RABINDRA R.J.

Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore 641 003, India.

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(1), 69-70. (E)

Behaviour of injurious ants in silkworm room and the utilization of 'Mie-yi-zhang' for ant control.

Comportement des fourmis nuisibles dans les pièces d'élevages des vers à soie et l'utilisation du "Mie-yi-zhang" pour la lutte contre ces fourmis.

TIAN W., LI D.

Guangdong Institute of Insects, Guangzhou, China.

1995 *Guangdong Agricultural Sciences*, Vol. 5, 29-32. (C)

Densonucleosis viruses constitute an increasingly diversified subfamily among the parvoviruses.

Les virus de la densonucléose constitue une sous-famille de plus en plus diversifiée parmi les parvovirus.

THIJSSEN P., BERGOIN M.*

* Laboratoire de Pathologie comparée (INRA-CNRS UA 1184), Université de Montpellier II, CC 101, Place Bataillon, 34000 Montpellier, France.

1995 *Seminars in Virology*, Academic Press Ltd, Vol. 6, 347-355. (E)

Researches on the effect of chemicals to control silkworm hamring fly *Exorista bombycis* Louis.

Recherches sur les effets des produits chimiques utilisés pour la lutte contre la mouche *Exorista bombycis* Louis, un nuisible du ver à soie.

TRI N.H.

1994 *Nong Nghiep Cong Nghiep Thuc Pham (Vietnam)*, Vol. 10, 384-385. (Vie)

Effect of nutrition with zinc polluted mulberry leaves on the nitrogen balance of the silkworm (*Bombyx mori* L.) organism.

Effet du nourrissage avec des feuilles de mûrier polluées au zinc sur l'équilibre en azote de l'organisme du ver à soie (*Bombyx mori* L.).

TSENOV P., PETKOV Z., PETKOV N.

Opitna Stantsiya po Buharstvo, Vratsa, Bulgaria.

1995 *Selskostopanska Nauka i Proizvodstvo (Bulgaria) - Agricultural Science and Production*, Vol. 33(6), 6-7. (Bgr,e)

Circumferential room heater for silkworm rearing.

Appareil de chauffage circulaire pour l'élevage des vers à soie.

VIJAYA KUMAR S., BIRAM SAHEB N.M., MAHESH, GOWDA P., SAMSON M.V.

Silkworm Seed Technology Laboratory, Bangalore, India.

1996 Indian Silk, Vol. 35(6/7), 13-14. (E)

Preliminary report on the Longdong type-92 cocoon drying chamber.

Rapport préliminaire sur le séchoir à cocons de type Longdong 92.

WANG H.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(4), 36. (C)

Rearing technique for grown silkworm with two times feeding daily by applying polythene paper.

Technique d'élevage pour les vers à soie à deux nourrissages par jour par application de papier en polyéthylène.

XIA Y.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(3), 14-17. (C)

Effects of methanol on mulberry growth and silkworm rearing.

Effets du méthanol sur la croissance du mûrier et l'élevage du ver à soie.

XU X., ZHOU L., SONG H.

Department of Sericulture, Anhui Agricultural University, Hefei, China.

1995 Journal of Anhui Agricultural University (China), Vol. 22(1), 69-72. (C,e)

Characters of the new silkworm race Fangcao, Chen xing and its hybrid for summer and autumn.

Caractères des nouvelles races de ver à soie Fangcao, Chen xing et de leur hybride pour l'été et l'automne.

YANG M.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(3), 5-6. (C)

Studies on resistance of current silkworm races *Bombyx mori* to fluoride and nuclear polyhedrosis virus.

Etudes sur la résistance des races courantes de ver à soie *Bombyx mori* au fluorure et au virus de la polyédrose nucléaire.

ZHAO Y., QIAN H., CHEN K., HE S.

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

1996 Canye Kexue, Vol. 22(4), 219-223. (C,e)

Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie

Non mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology

Effect of containers on cooking and reeling of cocoon of muga silkworm (*Antheraea assama* Ww) and on quality of raw silk fibers.

Effet des conteneurs sur la cuisson et le dévidage des cocons du ver à soie muga (*Antheraea assama* Ww) et sur la qualité des fibres de soie grège.

BARUAH B., SARKAR C.R., CHAULKAR B.N.

1995 *J. Assam Sci. Soc.*, Vol. 37(3), 135-140. (E)

Effect of magnesium on *Quercus serrata* in relation to oak tasar silkworm (*Antheraea proylei*).

Effet du magnésium sur *Quercus serrata* en relation avec le ver à soie tasar du chêne (*Antheraea proylei*).

GHOSH M.K., SRIVASTAVA R.C.

1995 *Geobios (Jodhpur, India)*, Vol. 22(2/3), 89-95. (E)

Impact of total sugar and total mineral content of food leaves on larval weight of oak tasar silkworm. *Antheraea proylei* J. (Saturniidae: Lepidoptera).

Effet des sucres totaux et du contenu total en minéraux des feuilles nourricières sur le poids larvaire du ver à soie tasar du chêne, *Antheraea proylei* J. (Saturniidae : Lepidoptera).

GHOSH M.K., SRIVASTAVA R.C., PRASAD B.

1995 *Shaspa*, Vol. 2(2), 113-117. (E)

Fats and fatty acid composition of muga silkworm and its host plants.

Composition en graisses et acides gras du ver à soie muga et de ses plantes hôtes.

HAZARIKA L.K., KATAKY A., KATAKY J.C.S., HAZARIKA A.K., HAZARIKA J.

1995 *J. Assam Sci. Soc.*, Vol. 37(1), 45-50. (E)

Study on the correlation between specific protein in haemolymph of wild silkworm and cocoon characters.

Etude sur la corrélation entre la protéine spécifique dans l'hémolymph du ver à soie sauvage et les caractères du cocon.

HE K.

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(3), 10-11. (C)

Effects of chilling treatment on oviposition and hatching of eggs, pupa and moth in Japanese oak silkworm (*Antheraea yamamai*).

Effets du traitement au froid sur l'oviposition et l'éclosion des oeufs, les chrysalides et les papillons chez le ver à soie du chêne japonais (*Antheraea yamamai*).

KIM J.U.

College of Agriculture, Chungbuk National University, Cheongju, Korea Republic.

1995 *Journal of Agricultural Science - Chungbuk National University (Korea Republic)*, Vol. 12(2), 12-17. (Ko,e)

Initial observation of biological properties of the silkworm (*Antheraea yamamai*).

Observation des propriétés biologiques du ver à soie (*Antheraea yamamai*).

LIN Z.

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(4), 258-259. (C)

Package for tasar chawki rearing.

Un jeu de techniques pour l'élevage des jeunes vers à soie tasar.

MATHUR S.K., SINHA B.R.R.P., SINHA S.S.

Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi 835 303, Bihar, India.

1996 *Indian Silk*, Vol. 35(6/7), 23-26. (E)

Seasonal occurrence and the timing of flight activity of adults in *Antheraea yamamai* (Guérin-Méneville) and *Caligula japonica* (Moor).

L'activité de vol des adultes chez *Antheraea yamamai* (Guérin-Méneville) et *Caligula japonica* (Moor) en fonction des saisons.

MITAMURA T.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(6), 514-516. (J)

Use of wild males for obtaining fertilized eggs in *Antheraea yamamai* breeding.

Utilisation de mâles sauvages pour l'obtention d'oeufs fertilisés chez *Antheraea yamamai*.

MITAMURA T.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(6), 517-518. (J)

Development of tasar in Bhandara: problems & prospects.

Développement du tasar au Bhandara : problèmes et perspectives.

RAJADURAI S., THANGAVELU K.

Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.

1996 *Indian Silk*, Vol. 35(6/7), 21-22. (E)

Juvenile shoot cutting and large scale plantation of som.

Boutures de jeunes pousses et plantation de som à grande échelle.

SIDDIQUI A.A., BASUMATARY B.K., LAL B., DAS P.K.

Regional Muga Research Station, Central Silk Board, Boko, Assam, India.

1996 *Indian Silk*, Vol. 37(6/7), 15-17. (E)

Aminotransferase activity of Indian tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera: Saturniidae).

Activité de l'aminotransférase chez le ver à soie tasar indien *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera: Saturniidae).

SINHA R.K., KAR P.K., SRIVASTAVA P.P., THANGAVELU K.

Silkworm and Mulberry Germplasm Station, Hosur 635 109, India.

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(1), 24-27. (E)

Studying on the nutritive content of pupa and moth of the oak silkworm *Antheraea pernyi*.

Etude de la valeur nutritive de la chrysalide et du papillon du ver à soie du chêne *Antheraea pernyi*.
SU X.

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(4), 265. (C)

Rejuvenating tasar industry of Madhya Pradesh.

Renouveau de l'industrie du tasar au Madhya Pradesh.

TIWARI S.K.

Research Extension Centre, Central Tasar Research and Training Institute, Katghora, Bilaspur, Madhya Pradesh, India.

1996 *Indian Silk*, Vol. 35(4-5), 28-30. (E)

Lipid and fatty acid composition of muga silkworm, *Antheraea assama*, host plant in relation to silkworm growth.

Composition en acides gras et en lipides de la plante hôte du ver à soie muga *Antheraea assama* en relation avec la croissance du ver à soie.

UNNI B.G. *et al.*

1996 *J. Lipid Mediators Cell Signalling*, Vol. 13(3), 295-300. (E)

Inhibiting effect of antibacterial polypeptides from cocoons of oak silkworms on some pathogenic bacteria of vegetables.

Effet inhibiteur de polypeptides antibactériens provenant de cocons de ver à soie du chêne sur quelques bactéries pathogènes des plantes.

WANG F., ZHAO S., ZHANG S.

Institute of Biological Technology, Liaoning Provincial Academy of Agricultural Sciences, Dalian, China.

1995 *Liaoning Agricultural Sciences (China)*, Vol. 5, 17-19. (C)

Vers à soie : génétique

Silkworms: genetics

Combining ability analysis of seven silk yield attributes in silkworm, *Bombyx mori* L.

Analyse de capacité combinatoire pour sept attributs du rendement en soie chez le ver à soie *Bombyx mori* L.

BHARGAVA S.K.

Regional Station, Central Sericultural Research and Training Institute, Coonoor, India.

1995 *Journal of Applied Genetics (Poland)*, Vol. 36(1), 59-67. (E)

Experimental research of microcarrier culture of silkworm BmN cell and high efficiency expression of HufN-alpha gene.

Recherche expérimentale d'une culture micro-porteuse de cellules BmN du ver à soie et expression à haute efficacité du gène HufN-alpha.

DENG X., ZHANG L., ZHOU Y., CHENG Y., LI G., DIAO Z.

1994 *Yaowu Shengwu Jishu*, Vol. 1(2), 1-4. (C)

Genetic analysis of hemolymph chymotrypsin inhibitors-3 and 4 in the silkworm, *Bombyx mori*.

Analyse génétique des inhibiteurs 3 et 4 de la chymotrypsine de l'hémolymph chez le ver à soie *Bombyx mori*.

FUJII H., ARATAKE H., DOIRA H.

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

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(5), 385-389. (E,j)

Genetic analysis of chymotrypsin inhibitors in the hemolymph of *Bombyx mori*.

Analyse génétique des inhibiteurs de chymotrypsine dans l'hémolymph de *Bombyx mori*.

FUJII H., ARATAKE H., DOIRA H., KOGA K.

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

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(5), 334-341. (J,e)

Genetical studies on the 'contractile' mutant of *Bombyx mori* and revision of the genetical map of the 15th linkage group.

Etudes génétiques sur le mutant "contractile" de *Bombyx mori* et révision de la carte génétique du 15e groupe de liaison.

FUJII H., DOIRA H., MIKI M., KIHARA H.

Faculty of Agriculture, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(6), 452-455. (J,e)

Detection of mixoploid by using egg color genes in parthenotes of the silkworm, *Bombyx mori*.
Détection de mixoploïdes par les gènes de coloration des oeufs chez les parthénontes du ver à soie *Bombyx mori*.

HIROKAWA M.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(5), 390-391. (J)

A cell specific glycosylated silk protein from *Chironomus thummi* salivary glands - Cloning, chromosomal localization, and characterization of cDNA.

Une protéine de soie glycosylée spécifique des cellules des glandes salivaires de *Chironomus thummi* - Clonage, localisation chromosomique et caractérisation de l'ADNc.

HOFFMAN R.T., SCHMIDT E.R., CASE S.T.*

* University of Mississippi, Medical Center, Department of Biochemistry, 2500N State Street, Jackson, MS 39216, USA.

1996 *Journal of Biological Chemistry*, Vol.271(16), 9809-9815. (E)

Sek, a new polyphagous gene discovered in a Japanese indigenous race of the silkworm.

Sek, un nouveau gène de polyphagie découvert chez une race indigène japonaise du ver à soie.

HONUMA A., TAZIMA Y.

Institute of Silkworm Genetics and Breeding, Iikura 1054, Amimachi, Ibaraki-ken 30003, Japan.

1996 *Reports of the Silk Science Research Institute*, Vol. 44, 1-13. (J,e)

Immediate-early baculovirus vectors for foreign gene expression in transformed or infected insect cells.

Vecteurs contenant le promoteur précoce du baculovirus pour l'expression d'un gène étranger dans des cellules d'insectes transformées ou infestées.

JARVIS D.L., WEINKAUF C., GUARINO L.A.

Center for Advanced Invertebrate Molecular Sciences, Texas A&M University, College Station, Texas 77843, USA.

1996 *Protein Expression and Purification*, Vol. 8, 191-203. (E)

Male meiosis in polyploid silkworms, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae).

Méiose mâle chez les vers à soie polyploïdes *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae).

KAWAMURA N.

Laboratory of Applied Molecular Entomology, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, N-9, W-9, Kita-ku, Sapporo 060, Japan.

1994 *International Journal of Insect Morphology and Embryology (U.K.)*, Vol. 23(4), 311-317. (E)

Sequence analysis of a small early chorion gene subfamily interspersed within the late gene locus in *Bombyx mori*.

Analyse séquentielle d'une sous-famille de petits gènes précoces du chorion éparpillés dans le locus du gène tardif chez *Bombyx mori*.

KRAVARITI L., LECANIDOU R., RODAKIS G.C.

1995 *J. Mol. Evol.*, Vol. 41, 24-33. (E)

Detection of baculovirus gene expression in insect cells and larvae by low light video image analysis.

Détection de l'expression du gène du baculovirus dans des cellules et des larves d'insectes par analyse d'images vidéo à faible lumière.

LANGRIDGE W.H.R., KRAUSOVA V.I., SZALAY A.A., FODOR I.

Department of Microbiology & Molecular Genetics, 142 Mortensen Hall, Loma Linda University, Loma Linda, CA 92350, USA.

1996 *Journal of Virological Methods*, Vol. 61, 151-156. (E)

Genetic relationship among silkmoths by mtDNA RFLP.

Etude des relations génétiques entre les séricigènes par RFLP de l'ADNmt.

LEE J.S., HWANG J.S., SUH D.S., LEE S.M., KANG H.A., SOHN H.R.

1996 *Korean J. Genet.*, Vol. 18(1), 49-58. (K)

Nucleotide sequence and transitional analysis of the gp41 gene of *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus.

Séquence de nucléotides et analyse transitionnelle du gène gp41 du virus de la polyédrose nucléaire de *Spodoptera frugiperda*.

LIU J.C., MARUNIAK J.E.

Entomology and Nematology Department, University of Florida, PO Box 110620, Gainesville, FL 32611-0620, USA.

1995 *Journal of General Virology (U.K.)*, Vol. 76(6), 1443-1450. (E)

The genes encoding the P39 and CG30 proteins of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus.

Les gènes codant pour les protéines P39 et CG30 du virus de la polyédrose nucléaire de *Bombyx mori*.

LU M., IATROU K.

Department of Medical Biochemistry, The University of Calgary, 3330 Hospital Drive NW, Calgary, Alberta T2N 4N1, Canada.

1996 *Journal of General Virology*, Vol. 77, 3135-3143. (E)

A alanin tRNA gene cluster from *Nephila clavipes*.

Un groupement de gènes d'ARNt alanine chez *Nephila clavipes*.

LUCIANO E., CANDELAS G.C.

1996 *Gene*, Vol. 171, 301-302. (E)

***Antennapedia* variations in the E mutant group of *Bombyx mori* analyzed by Southern blot hybridization.**

Variations d'*Antennapedia* chez le groupe mutant E de *Bombyx mori* analysées par hybridation Southern blot.

MASE K., HARA W., YAMAMOTO T., DOIRA H.

Research Team of Silkworm Breeding, National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-9-1 Agata, Matsumoto, Nagano 390 Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(6), 428-435. (J,e)

Developmental expression of the *Bombyx Antennapedia* homolog and homeotic changes in the Nc mutant.

Expression au cours du développement de l'homologue chez *Bombyx* d'*Antennapedia* et changements homéotiques chez le mutant Nc.

NAGATA T., SUZUKI Y., UENO K., KOKUBO H., XU X., HUI C., HARA W., FUKUTA M.

1996 *Gene Cells*, Vol. 1(6), 555-568. (E)

Genetical studies of the 'skunk' mutant in the silkworm, *Bombyx mori*.

Etudes génétiques du mutant "skunk" chez le ver à soie *Bombyx mori*.

NINAGI O., DOIRA H., YOSHITAKE N.

National Inst. of Sericultural and Entomological Sci., 1-9-1 Agata, Matsumoto, Nagano 390, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(6), 436-440. (J,e)

A common random amplified polymorphic DNA in the silkworm, *Bombyx mori*, is shared by W chromosomes onto which the normal marking, Sable and Black genes are translocated respectively.

Un RAPD commun chez le ver à soie *Bombyx mori* est porté par les chromosomes W sur lesquels les gènes de marquage normaux Sable et Noir sont respectivement transloqués.

OHBAYASHI F. et al.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(5), 395-398. (J)

Structural analysis of TRAS 1, a novel family of telomeric repeat-associated retrotransposons in the silkworm, *Bombyx mori*.

Analyse structurale de TRAS 1, une nouvelle famille de rétrotransposons associés à la répétition télomérique chez le ver à soie *Bombyx mori*.

OKAZAKI S., ISHIKAWA H., FUJIWARA H.

1995 *Mol. Cell. Biol.*, Vol. 15, 4545-4552. (E)

A simple revised manual microinjection method of gene transfer into *Bombyx mori* eggs.

Une méthode manuelle, simple et révisée de microinjection pour le transfert de gènes dans les oeufs de *Bombyx mori*.

SHAMILA Y., MATHAVAN S.

Department of Genetics, School of Biological Sciences, Madurai Kamaraj University, Madurai 625 021, India.

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(1), 80-82. (E)

Artificial modification of silkworm reproduction.

Modification artificielle de la reproduction du ver à soie.

STRUNNIKOV V.A.

N.K. Koltzov Institute of Developmental Biology, Moscow, Russia.

1995 in 'Control over reproduction, sex, and heterosis of the silkworm', Harwood Academic Publishers, Luxembourg, 1-103. (E)

Genetic engineering in the silkworm.

Ingénierie génétique chez le ver à soie.

STRUNNIKOV V.A.

N.K. Koltzov Institute of Developmental Biology, Moscow, Russia.

1995 in 'Control over reproduction, sex, and heterosis of the silkworm', Harwood Academic Publishers, Luxembourg, 105-223.(E)

Nature of hybrid vigour (heterosis) and new methods for its intensification.

Nature de la vigueur hybride (hétérosis) et nouvelles méthodes pour son intensification.

STRUNNIKOV V.A.

Laboratory of Cytogenetics & Sex Control, N.K. Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia.

1995 in 'Control over reproduction, sex, and heterosis of the silkworm', Harwood Academic Publishers, Luxembourg, 225-301.(E)

Control over reproduction, sex, and heterosis of the silkworm.

Maîtrise de la reproduction, du sexe et de l'hétérosis chez le ver à soie.

STRUNNIKOV V.A.

N.K. Koltzov Institute of Developmental Biology, Moscow, Russia.

1995 *Harwood Academic Publishers, L-2449 Luxembourg*. 343 p. (E)

Expression of human growth hormone in silkworm larvae through recombinant *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus.

Expression de l'hormone de croissance humaine chez le ver à soie grâce au virus recombinant de la polyédrose nucléaire de *Bombyx mori*.

SUMATHY S., PALHAN V.B., GOPINATHAN K.P.*

* Institute of Indian Science, Department of Microbiology and Cell Biology, Bangalore, Karnataka, India.

1996 *Protein Expression and Purification*, Vol. 7(3), 262-268. (E)

Developmental expression patterns and target assignment of the *Bombyx* fork head and POU-M1 genes.

Expression au cours du développement et détermination de la cible des gènes POU-M1 et "fork head" de *Bombyx*.

SUZUKI Y., KOKUBO H., OHNO K.

1996 *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, Vol. 41(8), 1083-1087. (E)

Nucleotide sequence of 5'-upstream region and expression of a silkworm gene encoding a new member of the attacin family.

Séquence de nucléotides de la région 5'-amont et expression du gène du ver à soie codant pour un nouveau membre de la famille de l'attacine.

TANAI K., ISHII T., SUGIYAMA M., MIYANOSHITA A., YAMAKAWA M.*

* National Institute of Sericultural and Entomological Science, Laboratory of Biological Defense, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1996 *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 220(3), 594-599. (E)

Characterization of oligosaccharides associated with feline interferon omega produced in recombinant baculovirus-infected *Bombyx mori*.

Caractérisation des oligosaccharides associés à l'interféron félin oméga produit chez *Bombyx mori* infecté par un baculovirus recombinant.

UEDA Y., SAKURAI T., MIZUNO Y., HUIJI Y., YANAI A.*

* Basic Research Laboratories, Toray Industries, Inc., 1111 Tebiri, Kamakura, Kanagawa 248, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 65(6), 472-476. (E)

Cloning of the diapause hormone gene of the silkworm (*Bombyx mori*).

Clonage du gène de l'hormone de diapause du ver à soie (*Bombyx mori*).

XU W., SATO Y., YAMASHITA O.

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

1995 *Yichuan Xuebao*, Vol. 22(3), 178-184. (E)

Molecular cloning of pheromone biosynthesis activating neuropeptide in silkworm, *Bombyx mori*.

Clonage moléculaire du neuropeptide activant la biosynthèse de la phéromone chez le ver à soie *Bombyx mori*.

XU W., SATO Y., YAMASHITA O.

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

1996 *Science in China (Series C)*, Vol. 39(1), 63-70. (E)

Expression of triplet ribozyme targeting *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) immediate early gene mRNA in Bm-N cells.

Expression du gène précoce du virus de la polyédrose nucléaire de *Bombyx mori* (BmNPV) chez des cellules BmN.

ZHANG X., CHEN N., LU C., QI G.

1996 *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Jinzhan*, Vol. 23(1), 83-84. (E)

Structure and function analysis of the promoter of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus P10 gene.

Structure et analyse de la fonction du promoteur du gène P10 du virus de la polyédrose nucléaire de *Bombyx mori*.

ZHANG Y., ZHANG Z., ZHANG Y.

1995 *Bingdu Xuebao*, Vol. 11(3), 255-261. (E)

Vers à soie : physiologie, biochimie

Silkworms: physiology, biochemistry

Neural pathways for cardiac reflexes triggered by external mechanical stimuli in larvae of *Bombyx mori*.

Trajectoires nerveuses des réflexes cardiaques provoqués par des stimuli mécaniques externes chez les larves de *Bombyx mori*.

AI H., KAWASAWA K.

Department of Biology, Tokyo Metropolitan University, Minami-Ohsawa 1-1, Hachioji-shi, Tokyo 192-03, Japan.

1995 *Journal of Insect Physiology (United Kingdom)*, Vol. 41(12), 1119-1131. (E)

Development and secretory function of neurosecretory A cell in brain of *Bombyx mori*.

Développement et fonction sécrétrice des cellules neurosécrétrices A du cerveau de *Bombyx mori*.

AKAI H. *et al.*

Lab. of Entomology, Tokyo Univ. of Agriculture, Sakuragaoka 1-1-1, Setagaya-ku, Tokyo 156, Japan.

1996 *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, Vol. 32, 333-340. (E)

Termination of sex pheromone production in mated females of the silkworm moth.

Arrêt de la production de phéromone sexuelle chez les femelles matures du papillon du ver à soie.

ANDO T., KASUGA K., YAJIMA Y., KATAOKA H., SUZUKI A.

1996 *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, Vol. 31(2), 207-218. (E)

Effect of gamma radiation on the vitality of the silkworm.

Effet des rayons gamma sur la vitalité des vers à soie.

BINH N.T.T., CANH D.H., HA T.T.

1994 *Nong Nghiep Cong Nghiep Thuc Pham (Vietnam)*, Vol. 10, 380-382. (Vi,e)

Effect of gamma irradiation on the protein and microelements content of silkworm.

Effet des rayons gamma sur le titre en protéine et en micro-éléments chez le ver à soie.

BINH N.T.T., DO N.K., HA T.T.

1994 *Nong Nghiep Cong Nghiep Thuc Pham (Vietnam)*, Vol. 10, 382-383. (Vi,e)

Alkaline phosphatase isozymes in insects and comparison with mammalian enzyme.

Isoenzymes de la phosphatase alcaline chez les insectes et comparaison avec l'enzyme de mammifère. EGUCHI M.

Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Kyoto 606, Japan.

1995 *Comparative Biochemistry and Physiology. B. Biochemistry and Molecular Biology (U.K.)*, Vol. 111(2), 151-162. (E)

Effect of preparation 'Manta' on the biologic and technologic indices of the silkworm.

Effet de la préparation "Manta" sur les indices technologiques et biologiques du ver à soie.

GREKOV D.

Vissh Selskostopanski Institut, Plovdiv, Bulgaria.

1995 *Zhivotnov'dni Nauki (Bulgaria) - Animal Science*, Vol. 32(3-4), 171-172. (Bg,r,e)

Regulation of juvenile hormone biosynthesis by ecdysteroid levels during the early stages of the last two larval instars of *Bombyx mori*.

Régulation de la biosynthèse de l'hormone juvénile par les niveaux d'ecdystéroïdes au cours des stades précoces des deux derniers âges larvaires de *Bombyx mori*.

GU S., CHOW Y.

1996 *J. Insect Physiol.*, Vol. 42, 625-632. (E)

Silkworm hemolymph as a substitute for fetal bovine serum in insect cell culture.

L'hémolymph du ver à soie utilisée comme substitut du sérum foetal bovin dans la culture de cellules d'insectes.

HA S.H., PARK T.H., KIM S.E.

1996 *Biotechnol. Tech.*, Vol. 10(6), 401-406. (E)

Isolation and alpha-amidation of the non-amidated form of cecropin D from larvae of *Bombyx mori*.

Isolément et alpha-amidation de la forme non amidée de la cécropine D provenant des larves de *Bombyx mori*.

HARA S., TANAI K., KATO Y., YAMAKAWA M.

Noda Institute for Scientific Research, Noda, Chiba 278, Japan.

1994 *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Biochemistry and Molecular Biology (U.K.)*, Vol. 108(3), 303-308. (E)

Production in *Escherichia coli* of moricin, a novel type antibacterial peptide from the silkworm, *Bombyx mori* [erratum].

Production de la moricine chez *Escherichia coli*, un nouveau type de peptide antibactérien du ver à soie *Bombyx mori* [erratum].

HARA S., YAMAKAWA M.

Noda Institute for Scientific Research, Noda, Chiba 278, Japan.

1996 *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 224, 877-878. (E)

Cooperative antibacterial relationship between lebecin and cecropin D, antibacterial peptides isolated from the silkworm *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae).

Relation antibactérienne coopérative entre la lébocine et la cécropine D, peptides antibactériens isolés à partir du ver à soie *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae).

HARA S., YAMAKAWA M.

1995 *Appl. Entomol. Zool*, Vol. 30, 606-608. (E)

Influence of low temperature during egg incubation on spermatogenesis of the silkworm, *Bombyx mori*.

Influence d'une température basse au cours de l'incubation des oeufs sur la spermatogénèse du ver à soie *Bombyx mori*.

HE L., NAKAGAKI M., KAJIURA Z., TAKEI R.

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Tokida 3-15-1, Ueda 386, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(6), 464-471. (J,e)

Variability of olfactory receptor neuron responses of female silkmoths (*Bombyx mori* L.) to benzoic acid and (+ or -) linalool.

Variabilité des réponses des neurones récepteurs olfactifs des papillons femelles (*Bombyx mori* L.) à l'acide benzoïque et (+ ou -) au linalol.

HEINBOCKEL T., KAISLING K.E.

1996 *J. Insect Physiol.*, Vol. 42, 565-578. (E)

Discovery of a new tetrahydrobiopterin-synthesizing enzyme in the lemon mutant of the silkworm *Bombyx mori*.

Découverte d'une nouvelle enzyme synthétisant la tétrahydrobiopterine chez le mutant citron du ver à soie *Bombyx mori*.

IINO T., SAWADA H., TSUSUE M., TAKIKAWA S.I.

Department of General Education, Nihon University, Sakurajosui 3-25-40, Setagayaku, Tokyo 156, Japan.

1996 *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1297, 191-199. (E)

cDNA cloning and expression of a novel type protease inhibitor (FPI-F) from the silkworm, *Bombyx mori*.

Clonage de l'ADNe et expression d'un inhibiteur de protéase d'un nouveau type (FPI-F) provenant du ver à soie *Bombyx mori*.

ITOH M., TAKENAKA T., ASHIKARI T., EGUCHI M.

Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 65(5), 326-33. (E,j)

Bombyxin-related peptides: cDNA structure and expression in the brain of the hornworm *Agrius convolvuli*.

Peptides apparentés à la bombyxine : structure de l'ADNe et expression dans le cerveau d'*Agrius convolvuli*.

IWANMI M., FURUYU I., KATAOKA H.

Department of Biology, Faculty of Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-11, Japan.

1996 *Insect Biochemistry and Molecular Biology (United Kingdom)*, Vol. 26(1), 25-32. (E)

Killing action of antibacterial peptides *Bombyx mori* against K562 myelogenous leukemia cells and influence on ultrastructure.

Action tueuse des peptides antibactériens de *Bombyx mori* sur les cellules de la leucémie myélogène K562 et influence sur l'ultrastructure.

JIA H., ZHANG S., DAI Z.

Department of Biology, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China.

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(4), 224-228. (C,e)

Purification and partial characterization of a lutein-binding protein from the midgut of the silkworm *Bombyx mori*.

Purification et caractérisation partielle d'une protéine se liant à la lutéine provenant de l'intestin moyen du ver à soie *Bombyx mori*.

JOUNI Z.E., WELLS M.A.

1996 *J. Biol. Chem.*, Vol. 271, 14722-14726. (E)

Effects of a juvenile hormone analog, fenoxycarb, on larval growth of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae).

Effet d'un analogue de l'hormone juvénile, le fénoxycarbe, sur la croissance larvaire du ver à soie *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae).

KAMIMURA M.

1995 *Appl. Entomol. Zool.*, Vol. 30(3), 487-489. (E)

Pheromone-triggered 'flipflopping' neural signals correlate with activities of neck motor neurons of a male moth, *Bombyx mori*.

Les signaux neuraux "flipflopping" déclenchés par phéromone sont corrélés avec les activités des neurones moteurs du cou du papillon mâle *Bombyx mori*.

KANZAKI R., MISHIMA T.

1996 *Zool. Sci.*, Vol. 13(1), 79-87. (E)

Features and growth of the stemmata in the varnished eye mutant of *Bombyx mori*.

Caractères et croissance des stemmats chez le mutant "yeux vernis" de *Bombyx mori*.

KAWAGUCHI Y., SUMIDA K., BANNO Y., KOGA K., DOIRA H.

Laboratory of Sericultural Science, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 65(6), 441-446. (Ej)

Ecdysteroid concentration inducing cell proliferation brings about the imaginal differentiation in the wing disc of *Bombyx mori* in vitro.

La concentration d'ecdystéroïdes induisant la prolifération des cellules provoque la différenciation imaginaire des disques alaires de *Bombyx mori* in vitro.

KAWAZAKI H.

1995 *Dev. Growth Differ.*, Vol. 37, 575-580. (E)

Influence of low temperature on the synthesis of some *Galleria mellonella* proteins.

Influence d'une température basse sur la synthèse de quelques protéines de *Galleria mellonella*.

KLUDKIEWICZ B., GODLEWSKI J., GRZELAK K., CYMBOROWSKI B., LASSOTA Z.

Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, A. Pawinskiego 5a, 02-106 Warsaw, Poland.

1996 *Acta Biochimica Polonica*, Vol. 43(4), 639-644. (E)

The prophenoloxidase from the wax moth *Galleria mellonella* : purification and characterization of the proenzyme.

La prophénoloxydase du papillon *Galleria mellonella* : purification et caractérisation de la proenzyme.

KOPACEK P., WEISE C., GOTZ P.

Institute of Entomology, Czech Academy of Sciences, Braniskova 31, 370 05 Ceske Budejovice, Czech Republic.

1995 *Insect Biochemistry and Molecular Biology (United Kingdom)*, Vol. 25(10), 1081-1091. (E)

Functional significance of the cocoon in two arctic *Gynaephora* moth species.

Signification fonctionnelle du cocon chez deux espèces arctiques du papillon *Gynaephora*.

LYON B.E., CARTAR R.V.

Kananaskis Field Stations and Department of Biological Sciences University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada T2N 1N4.

1996 *Proc. R. Soc. Lond. B*, Vol. 263, 1159-1163. (E)

High-level production of human parathyroid hormone in *Bombyx mori* larvae and BmN cells using recombinant baculovirus.

Production élevée de l'hormone parathyroïde humaine chez les larves de *Bombyx mori* et les cellules de BmN utilisant un baculovirus recombinant.

MATHAVAN S. et al.

1995 *Gene*, Vol. 167, 1-2. (E)

Spider or cobweb silk: an old and questionable remedy for wounds.

L'araignée ou la soie de sa toile : un remède ancien et discutable pour les plaies.

MCKINSTRY D.M., PIERCE S.S.

1995 *Wilderness and Environmental Medicine (U.K.)*, Vol. 6(2), 228. (E)

Ecdysteroid receptor binding activity and ecdysteroid agonist activity at the level of gene expression are correlated with the activity of dibenzoyl hydrazines in larvae of *Bombyx mori*.

L'activité de liaison au récepteur d'ecdystéroïde et l'activité agoniste d'ecdystéroïde au niveau de l'expression du gène sont corrélés avec l'activité des hydrazines dibenzoyl chez les larves de *Bombyx mori*.

MIKITANI K.

Agricultural Chemicals Research Laboratory, Sumitomo Chemical Co., Ltd, 4-2-1, Takatsukasa, Takarazuka, Hyogo 665, Japan

1996 *J. Insect Physiol.*, Vol. 42(10), 937-941. (E)

Expression of the *Bombyx mori* tubuline encoding gene in testis.

Expression du gène codant pour la tubuline de *Bombyx mori* dans les testicules.

MITA K. *et al.*

1995 *Gene*, Vol. 162, 629-330. (E)

Structural characterization and stage-specific change of the silkworm, *Bombyx mori*, hemolymph proteins.

Caractérisation structurelle et variation spécifique du stade, des protéines de l'hémolymph du ver à soie *Bombyx mori*.

MURAKAMI R., YAMANOUCHI H., HIRANO H.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(6), 417-427. (J,e)

Electrophoresis of larval hemolymph proteins in 25 strains of the silkworm, *Bombyx mori*.

Electrophorèse des protéines de l'hémolymph larvaire dans 25 souches du ver à soie *Bombyx mori*.

MURAKAMI R., YAMANOUCHI H., HIRANO H.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(6), 519-522. (J)

Identification of the receptor-recognition site of bombyxin-2, a silkworm insulin-like peptide.

Identification du site de reconnaissance du récepteur de la bombyxine 2, un peptide analogue à l'insuline.

NAGATA K. *et al.*

1995 *Pept. Chem.*, Vol. 33, 257-260. (E)

Tertiary structure and functional sites of bombyxin, an insect insulin-like peptide. Comparison with those of insulin.

Structure tertiaire et sites fonctionnels de la bombyxine, un peptide d'insecte analogue à l'insuline. Comparaison avec ceux de l'insuline.

NAGATA K., INAGAKI F., SUZUKI A.

1996 *Tampakushitsu Kakusan Koso*, Vol. 41(10), 1485-1496. (E)

Occurrence of novel types of hemolymph esterases in the silkworm, *Bombyx mori*.

Nouveaux types d'estérases de l'hémolymph chez le ver à soie *Bombyx mori*.

OKIDO T., ARAI H., FUJII H., DOIRA H.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(6), 500-502. (J)

Preparation of primary cultures and acute slices of the nervous system of the moth *Manduca sexta*.

Préparation des cultures primaires et de coupes fines du système nerveux du papillon *Manduca sexta*.

OLAND L.A., MÜLLER T., KETTENMANN H., HAYASHI J.

Arizona Research Laboratories, Division of Neurobiology, 624 Gould-Simpson Building, University of Arizona, Tucson, AZ 85721, USA.

1996 *Journal of Neuroscience Methods*, Vol. 69, 103-112. (E)

A new family of serine protease inhibitors (*Bombyx* family) as established from the unique topological relation between the positions of disulfide bridges and reactive site.

Une nouvelle famille d'inhibiteurs de protéase à sérine (*Bombyx*) établie à partir de la relation topologique unique entre les positions des ponts disulfure et le site réactif.

PHAM T.N. *et al.*

1996 *J. Biochem. (Tokyo)*, Vol. 119, 428-434. (E)

Expression of *Bombyx* family fungal protease inhibitor F from *Bombyx mori* by baculovirus vector.

Expression de l'inhibiteur F de la protéase fongique de la famille de *Bombyx* par un vecteur baculovirus.

PHAM T.N. *et al.*

1996 *J. Biochem. (Tokyo)*, Vol. 119, 1080-1085. (E)

Juvenile hormone III hydrolyzing activity in the last instar larval hemolymph of tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Drury.

L'activité d'hydrolyse de l'hormone juvénile III dans l'hémolymphe du ver à soie tasar *Antheraea mylitta* Drury au dernier âge larvaire.

RAO R.V.S., MEHROTRA K.N.

1995 *Entomon*, Vol. 20(2), 1-6. (E)

Effects of antibiotics on the lipid and water contents of silkworm, *Bombyx mori*.

Effets des antibiotiques sur les teneurs en eau et en lipides du ver à soie *Bombyx mori*.

SAHA A.K., RAHMAN M.S., SAHA B.N., ALAM R.A., MANDAI S.P., YASMEEN F.

1995 *Pak. J. Zool.*, Vol. 27(4), 291-294. (E)

Molecular characterization of prothoracicotropic hormone (PTTH) from the giant silkworm *Antheraea pernyi*: developmental appearance of PTTH-expressing cells and relationship to circadian clock cells in central brain.

Caractérisation moléculaire de l'hormone prothoracicotrope (PTTH) du papillon à soie géant *Antheraea pernyi*: apparition au cours du développement de cellules exprimant la PTTH et relation avec les cellules de l'horloge circadienne dans le cerveau.

SAUMAN I., REPPERT S.M.*

* Laboratory of Developmental Chronobiology, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA 02114, USA.

1996 *Developmental Biology*, Vol. 178, 418-429. (E)

***In vivo* and *in vitro* effects of the nonsteroidal ecdysteroid agonist tebufenozide on cuticle formation in *Spodoptera exigua*: an ultrastructural approach.**

Effets *in vivo* et *in vitro* du tébufénozide agoniste non stéroïdien de l'ecdystéroïde sur la formation de l'épiderme chez *Spodoptera exigua*: une approche ultrastructurale.

SMAGGHE G., VINUELA E., BUDIA F., DEGHEELE D.

Laboratory of Agrozoology, Faculty of Agricultural and Applied Biological Sciences, Coupure Links 653, B-9000 Gent, Belgium.

1996 *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, Vol. 32, 121-134. (e)

Precocious metamorphosis induced by 1,5 disubstituted imidazoles is counteracted by tebufenozide (RH-5992), an ecdysteroid antagonist.

La métamorphose précoce induite par les imidazoles 1,5 disubstitués est neutralisée par le tébufénozide (RH-5992), un antagoniste d'ecdystéroïde.

SONODA M., KUWANO E., TANIGUCHI E.

1995 *Nippon Noyaku Gakkaishi*, Vol. 20(3), 325-327. (J)

Immunolocalization of pheromone-binding protein and general odorant-binding protein in olfactory sensilla of the silk moths *Antheraea* and *Bombyx*.

Immuno-localisation de la protéine liante à la phéromone et de la protéine liante aux substances odorantes générales dans les sensilles olfactives des papillons à soie *Antheraea* et *Bombyx*.

STEINBRÉCHT R.A., LAUE M., ZIEGELBERGER G.

1995 *Cell & Tissue Research*, Vol. 282, 203-217. (E)

Sperm precedence and sperm movement under different copulation intervals in the silkworm, *Bombyx mori*.

Préséance et mouvement du sperme à différents intervalles de copulation chez le ver à soie *Bombyx mori*.

SUZUKI N., OKUDA T., SHINBO H.

Nagasaki Prefectural University, Sasebo, Nagasaki 858, Japan.

1996 *Journal of Insect Physiology (United Kingdom)*, Vol. 42(3), 199-204. (E)

The silkworm homolog of the *Drosophila* ecdysone receptor (B1 isoform): cloning and analysis of expression during follicular cell differentiation.

L'homologue chez le ver à soie du récepteur d'ecdysone de la *Drosophile* (isoforme B1) : clonage et analyse de l'expression au cours de la différenciation cellulaire folliculaire.

SWEVERS L., DREVET J.R., LUNKE M.D., IATROU K.

Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Calgary, 3330 Hospital Drive N.W., Calgary, AB T2N 4N1, Canada.

1995 *Insect Biochemistry and Molecular Biology (U.K.)*, Vol. 25(7), 855-866. (E)

Elicitors triggering the simultaneous gene expression of antibacterial proteins of the silkworm, *Bombyx mori*.

Révéléateurs déclenchant l'expression simultanée des gènes des protéines antibactériennes du ver à soie *Bombyx mori*.

TANIAI K., FURUKAWA S., SHONE T., YAMAKAWA M.*

* Laboratory of Biological Defense, National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1996 *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 226, 783-790. (E)

Purification and characterization of three storage proteins in the common cutworm, *Spodoptera litura*.

Purification et caractérisation de trois protéines de stockage chez le ver gris commun *Spodoptera litura*.

TOJO S., YOSHIGA T.

Lab. of Entomology, Department of Applied Biological Sciences, Saga University, Saga 840, Japan.

1994 *Insect Biochemistry and Molecular Biology (U.K.)*, Vol. 24(7), 729-738. (E)

BmCF1, a *Bombyx mori* RXR-type receptor related to the *Drosophila* ultraspiracle.

BmCF1, un récepteur de type RXR de *Bombyx mori* apparenté à l'ultraspiracle de la *Drosophile*.

TZERTZINIS G., MALECKI A., KAFATOS F.C.

Dept of Cellular and Developmental Biology, Harvard University, Cambridge, MA 02138, U.S.A.

1994 *Journal of Molecular Biology (U.K.)*, Vol. 238(3), 479-486. (E)

Immunoaffinity purification of juvenile hormone-binding protein from *Galleria mellonella* hemolymph.

Purification par immuno-affinité de la protéine liante à l'hormone juvénile provenant de l'hémolymphe de *Galleria mellonella*.

WIECZOREK E. et al.

Institute of Organic Chemistry, Biochemistry & Biotechnology, Technical University of Wrocław, Wybrzeże S. Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, Poland.

1996 *Acta Biochimica Polonica*, Vol. 43(4), 603-610. (E)

Site-directed mutations in the third domain of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIAa affect its ability to increase the permeability of *Bombyx mori* midgut brush border membran vesicles.

Les mutations orientées dans le troisième domaine de la delta-endotoxine CryIAa de *Bacillus thuringiensis* affectent sa capacité à augmenter la perméabilité des vésicules de la membrane pileuse de l'intestin moyen de *Bombyx mori*.

WOLVERSBERGER M.G., CHEN X.J., DEAN D.H.
1996 *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.62(1), 279-282. (E)

Pheromone receptor cells in the antenna of the male moth *Philosamia cynthia ricini* in response to sex pheromone components.

Les cellules réceptrices de phéromone dans les antennes du papillon mâle de *Philosamia cynthia ricini* en réponse aux composants de la phéromone.

WU C., LIU Q.
1996 *Kunchong Xuebao*, Vol. 39(2), 121-125. (E)

Analysis of truncated forms of *Bombyx mori* glycyl tRNA synthetase : function of an N-terminal structure in RNA binding.

Analyse des formes tronquées de la glycyl-tRNA synthétase de *Bombyx mori* : fonction d'une structure N-terminale dans la fixation de l'ARN.

WU H., NADA S., DIGNAM J.D.
1995 *Biochemistry*, Vol. 34, 16327-16336. (E)

The brain neurosecretory cells of the moth *Samia cynthia ricini*: immunohistochemical localization and developmental changes of the *Samia* homologs of the *Bombyx* prothoracicotropic hormone and bombyxine.

Les cellules neurosécrétrices du cerveau du papillon *Samia cynthia ricini* : localisation immunohistochimique et variations au cours du développement des homologues chez *Samia* de l'hormone prothoracicotrope de *Bombyx* et de la bombyxine.

YAGI Y. et al.
1995 *Dev. Growth Differ.*, Vol. 37, 505-515. (E)

Expression of gene encoding diapause hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide during post embryonic development in silkworm, *Bombyx mori*.

Expression du gène codant pour l'hormone de diapause et le neuropeptide activant la biosynthèse de phéromone au cours du développement post-embryonnaire chez le ver à soie *Bombyx mori*.

YAMASHITA O.
1996 *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao*, Vol. 28(2), 214-217. (E)

Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* CryI toxins in the midgut of three forest insects and *Bombyx mori*.

Localisation immunocytochimique des toxines CryI de *Bacillus thuringiensis* dans l'intestin moyen de trois insectes des forêts et de *Bombyx mori*.

YI S., PANG A.S.D., VAN FRANKENHUYSEN K.
1996 *Can. J. Microbiol.*, Vol. 42(7), 634-641. (E)

Juvenile hormone regulation of an insect gene: a specific transcription factor and a DNA response element.

Régulation par l'hormone juvénile d'un gène d'insecte : un facteur de transcription spécifique et un élément de réponse de l'ADN.

ZHANG J., SALEH D.S., WYATT G.R.*
* Department of Biology, Queen's University, Kingston, Ontario K7L 3N6, Canada.
1996 *Molecular and Cellular Endocrinology*, Vol. 122, 15-20. (E)

Vers à soie : oeufs, embryologie

Silkworms: eggs, embryology

Acid treatment in relation to refrigeration of silkworm eggs.

Traitement à l'acide en relation avec la réfrigération des oeufs de ver à soie.

BIRAM SAHEB N.M., KUMAR V., NEGI B.B.S., SAMSON M.V.

Silkworm Seed Technology Laboratory, Bangalore 560 035, India.

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(1), 77-79. (E)

Yolk of 'scanty vitellin' mutant, vit, of *Bombyx mori* is lacking in vitellin and 30 KDa proteins.

Le vitellus du mutant à vitelline rare, "vit", de *Bombyx mori* manque de vitelline et de protéines 30 KDa.

FUJIKAWA K., KAWAGUCHI Y., BANNO Y., KOGA K., DOIRA H.

1995 *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 112A, 585-589. (E)

Correct opinion and measures about the control of pebrine disease in egg production.

Opinion et mesures adéquates pour la lutte contre la pébrine dans la production d'oeufs.

JIN W. *et al.*

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(4), 1-5. (C)

Reasons causing the heavy occurrence of non-diapause eggs in the race Qiufeng x Baiyu.

Les causes de la forte présence d'oeufs non-diapausants dans la race Qiufeng x Baiyu.

NI C.

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(3), 39-40. (C)

The technique of hatching silkworm egg.

La technique d'éclosion des vers à soie.

PHUC H.V., DAM N.T.

1994 *Nong Nghiep Cong Nghiep Thuc Pham (Vietnam)*, Vol. 10, 377-379. (Vi, e)

Improvment of hatching of cold stored bivoltine eggs through hot water treatment.

Amélioration par traitement à l'eau chaude de l'éclosion des oeufs bivoltins conservés au froid.

SRINIVASABABU G.K., ASTAGI S.G., BASAVARAJU N., THANGAVELU K.

National Silkworm Seed Project, Silkworm Seed Production Centre Gadhinglaj 416 502, India.

1996 *Indian J. Seric.*, Vol. 35(1), 76. (E)

Effect of chilling on diapause termination of pharate first-instar larvae in the wild silkmoth, *Antheraea yamamai*.

Effect du froid sur la terminaison de la diapause chez les larves embryonnaires du papillon à soie sauvage *Antheraea yamamai*

SUZUKI K., KUMAGAI T., NAYA S.I., KUWANO E.

Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka 020, Japan.

1994 *Int. J. Wild Silkmoth & Silk*, Vol. 1, 60-64. (E)

Impaired yolk protein uptake by oocytes of a *Bombyx mori* mutant.

L'entrée perturbée des protéines du vitellus dans les ovocytes d'un mutant de *Bombyx mori*.

TAKEDA H., KAWAGUCHI Y., OSHIKI T., MAEKAWA H., TSUCHIDA K.*

* Division of Radiological Protection, National Institute of Health, Shinjuku, Tokyo 162, Japan.

1996 *Insect Biochem. Molec. Biol.*, Vol. 26(6), 607-616. (E)

Development of new method for artificial insemination of the silkworm, *Bombyx mori*.

Développement d'une nouvelle méthode pour l'insémination artificielle du ver à soie *Bombyx mori*.

TAKEMURA Y., KANDA T., TAMURA T., SHINBO H., HORIE Y.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(6), 256-263. (J,e)

Induction of non-diapause eggs by imidazole derivative KK-42 in the diapause type of *Bombyx mori* silkworm.

Induction d'oeufs non-diapausants par le KK-42 dérivé d'imidazole chez le type diapausant de ver à soie *Bombyx mori*.

WU C., SUZUKI K., KUWANO E.*

* Department of Agricultural Chemistry, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan.

1996 *Biosci. Biotechn. Biochem.*, Vol. 60(7), 1201-1203. (E)

Free nucleotides related to the induction of diapause in the silkworm, *Bombyx mori*.

Nucléotides libres liés à l'induction de la diapause chez le ver à soie *Bombyx mori*.

WU C., YAMASHITA T., TAIRA H., SUZUKI K.

1996 *J. Insect Physiol.*, Vol. 42, 441-447. (E)

Isolation of L(+)-methionine sulfoxide related to diapause induction in the silkworm, *Bombyx mori*.

Isolement du sulfoxyde de L(+)-méthionine lié à l'induction de la diapause chez le ver à soie *Bombyx mori*.

YANG J., KIMURA M., KUWANO E., SUZUKI K.

Faculty of Agriculture, Iwata University, Morioka 202, Japan.

1995 *Insect Biochemistry and Molecular Biology (United Kingdom)*, Vol. 25(9), 975-980. (E)

***In vitro* association of plasma pAy5.8 with nuclear matrix of the fertilized eggs of *Bombyx mori*.**

Association *in vitro* de pAy5.8 avec la matrice nucléaire des oeufs fertilisés de *Bombyx mori*.

ZHOU C., LI Z.

1995 *Zhongguo Kexue Jishu Daxue Xuebao*, Vol. 25(3), 353-356. (E)

The reasons for occurrence of non-colored eggs and its control technique.

Les raisons de la présence d'oeufs non colorés et la technique de contrôle.

ZHOU M.

1996 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 27(3), 12-13. (C)

Glandes séricigènes

Silk glands

Protein ubiquitination in the posterior silk glands of *Bombyx mori*.

Ubiquitines dans les glandes séricigènes postérieures de *Bombyx mori*.

ICHIMURA S., MITA K., NUMATA M.

Division of Biology, National Institute of Radiological Sciences, Anagawa, Inage-ku, Chiba-shi 263, Japan.

1994 *Insect Biochemistry and Molecular Biology (U.K.)*, Vol. 24(7), 717-722. (E)

Estimation of fibroin in posterior silk gland of *Bombyx mori* feeding mulberry leaves under different cultivation forms.

Estimation de la fibroïne dans la glande séricigène postérieure de *Bombyx mori* nourri avec des feuilles de mûriers cultivés de différentes façons.

QADER M.A., HAQUE T.

1996 *Pak. J. Zool.*, Vol. 28(1), 9-12. (E)

YAC-based transfer of fibroin gene from *Antheraea yamamai* to domestic silkworm *Bombyx mori*. 1. Identification of fibroin clones from a YAC library of *Antheraea yamamai* constructed from its posterior silk glands.

Transfert du gène de la fibroïne d'*Antheraea yamamai* chez le ver à soie domestique *Bombyx mori*.

1. Identification des clones de fibroïne issus d'une librairie YAC d'*Antheraea yamamai* construite à partir de ses glandes séricigènes postérieures.

TANG H., CAI J., LI Z.

1995 *Sci. China, Ser. B*, Vol. 38(5), 590-595. (E)

Juvenile hormone restores larval pattern of sericin genes transcripts.

L'hormone juvénile restaure le modèle larvaire des transcriptions des gènes de la sérécine.

YANG C., SEHNAL F., SCHELLER K.

1996 *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, Vol. 32(3/4), 353-362. (E)

Study of fibroin composition of *Bombyx mori* silk proteins by SDS-PAGE.

Etude de la composition en fibroïne des protéines de la soie de *Bombyx mori* par SDS-PAGE.

YU T., CAI Z., HUANG W.

1996 *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao*, Vol. 17(4), 829-831. (E)

Soie

Silk

Solution characteristics of silk fibroin in the systems CaCl₂-H₂O, CaCl₂-H₂O-ROH.

Caractéristiques des solutions de fibroïne de soie dans les systèmes CaCl₂-H₂O, CaCl₂-H₂O-ROH.

CHOE T.H., RI Y.S.

1995 Choson Minjujuui Inmin Konghwaguk Kwahagwon Tongbo, Vol. 5, 40-42. (C)

Primary structure of archeological silk and ancient climate.

Structure primaire de la soie archéologique et climat ancien.

CHUJO R.

1996 Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.) Vol. 37(2), 184-185. (E)

Primary structure of archeological silk and ancient climate.

Structure primaire de la soie archéologique et ancien climat.

CHUJO R., SHIMAOKA A., NAGAOKA K., KURATA K., KURATA A., INOUE M.

1996 Polymer, Vol. 37(16), 3693-3696. (E)

Spider silks : a biomaterial for the future.

Les soies d'araignée : un matériau biologique pour l'avenir.

COLGIN M.A., LEWIS R.V.

1995 Chem. Ind. (London), Vol. 24, 1009-1012. (E)

Influence of the protein sericin on cellular interactions of immune relevant cells.

Influence de la sérécine sur les interactions des cellules impliquées dans l'immunité.

DEGWERT J., HOPPE U.

1996 Parfum. Kosmet., Vol. 77(2), 94-100. (E)

Treatment of waste water from the silk degumming processes for protein recovery and water reuse.

Traitement des eaux usées provenant du décreusage de la soie pour la récupération des protéines et la réutilisation de l'eau.

FABIANI C., PIZZICHINI M., SPADONI M., ZEDDITA G.

1996 Desalination, Vol. 105(1/2), 1-9. (E)

Immobilization of invertase onto silk fabrics enriched in amino groups.

Immobilisation de l'invertase sur les tissus de soie enrichis en groupements aminés.

FURUHATA K.I., DENO S., SAKAMOTO M.

Department of Organic & Polymeric Materials, Faculty of Engineering, Tokyo Institute of Technology, 2-12-1 O-okayama, Meguro-ku, Tokyo 152, Japan.

1996 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 65(5), 378-384. (Ej)

Introduction of amino groups into silk.

Introduction de groupes aminés dans la soie.

FURUHATA K.I., DENO S., YAMAUCHI T., SAKAMOTO M.

Fac. Engineering, Tokyo Inst. Technol., 2-12-1 O-okayama, Meguro-ku, Tokyo 152, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 65(5), 319-325. (Ej)

Optothermal properties of fibers. 5. Optical anisotropy in silk fibers as a function of annealing process.

Propriétés optothermiques des fibres. 5. L'anisotropie optique dans les fibres de soie est fonction du processus de recuisson.

HAMZA A.A., FOUDA I.M., SOKKAR T.Z., EL-BAKARY M.A.

1996 *J. Appl. Polym. Sci.*, Vol. 60, 1289-1299. (E)

Bullets and silk in the Old West.

Les balles et la soie au Far-West.

HARP J.M.

1996 *Science*, Vol. 271, 580-581. (E)

Degumming method for silk thread reeled from yellow cocoon filaments of a sex-limited variety 'Ouhaku'.

Méthode de décreusage pour le fil de soie filé à partir des filaments de cocons jaunes d'une variété à caractère limité au sexe "Ouhaku".

HATA T., KATO H.

National Inst. of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 65(6), 494-499. (J,e)

New application of silk.

Nouvelle application de la soie.

HIRABAYASHI K.

1996 *Kobunshi Kako*, Vol. 45(7), 294-298. (E)

The pupal body temperature and inner space temperature of cocoon under microwave irradiation.

La température corporelle de la chrysalide et la température de l'espace intérieur du cocon sous irradiation aux micro-ondes.

KAGAWA T.

Saitama Cocoon Testing Station, Akebono, Kumagaya, Saitama 360, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 65(5), 365-370. (J,e)

Antibacterial property of chitosan-treated silk fabrics.

Propriété antibactérienne des tissus de soie traités au chitosan.

KAKO T., MATSUMOTO T.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 65(6), 507-509. (J)

Mechanical dyeing properties for the silk fibers of *Caligula japonica*.

Propriétés tinctoriales mécaniques pour les fibres de soie de *Caligula japonica*.

KAWAHARA Y.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 65(5), 399-400. (J)

Changes of the hue on raw silk fibers of *Antheraea yamamai* by the irradiation of ultraviolet rays and the heat treatment.

Variations de la teinte des fibres de soie grège d'*Antheraea yamamai* par irradiation aux ultra-violets et traitement à la chaleur.

KAWAHARA Y., ASAKURA M., YOSHIDA S., SUGITA H.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 65(5), 401-402. (J)

Possibility of application of an artificially deteriorated silk for restoration by ultraviolet rays.
Possibilité d'application d'une soie détériorée artificiellement pour la restauration par les rayons ultraviolets.

KAWANOBE W., SANO C., YONEYAMA M., MIURA S., TAGURO T., OKA I.
1996 *Hozon Kagaku*, Vol. 35, 40-48. (E)

Thin-layer chromatography of sericin, adipocers and fibroin from natural silk.
Chromatographie en couche mince de la sérécine, des adipocères et de la fibroïne de la soie naturelle.
KHOLMUMINOV A.A., BEKMIRZAEVA G.Z., YULDASHEV M.K., KABULOV B.D.
1995 *Khim. Prir. Soedin.*, Vol. 4, 588-590. (E)

Study on silk fibroin for food use.

Etude sur la fibroïne de soie pour une utilisation alimentaire.

LIU C.

Department of Sericulture, Anhui Agricultural University, Hefei, China.

1995 *Journal of Anhui Agricultural University (China)*, Vol. 22(2), 173-176. (C,e)

Feature for an amperometric ferrocyanide-mediating H₂O₂ sensor for organic-phase assay based on regenerated silk fibroin as immobilization matrix for peroxidase.

Caractéristiques d'un capteur ampérométrique d'H₂O₂ au ferrocyanure pour un dosage en phase organique basé sur la fibroïne de soie régénérée utilisée comme matrice d'immobilisation de la peroxydase.

LIU Y., LIU H., QIAN J., DENG J., YU T.

1996 *Electrochim. Acta*, Vol. 41(1), 77-82. (E)

Blend membrane of regenerated silk fibroin, poly(vinyl alcohol), and peroxidase and its application to a ferrocene mediating hydrogen peroxide sensor.

Membrane mixte de fibroïne de soie régénérée, de poly(vinyl alcool) et de peroxydase et son application à un capteur de peroxyde d'hydrogène.

LIU Y., QIAN J., LIU H., ZHANG X., DENG J., YU T.

1996 *J. Appl. Polym. Sci.*, Vol. 61(4), 641-647. (E)

Immobilization of glucose oxidase onto the blend membrane of poly(vinyl alcohol) and regenerated silk fibroin: morphology and application to glucose biosensor.

Immobilisation de la glucose oxydase sur une membrane mixte de poly(vinyl alcool) et de fibroïne de soie régénérée : morphologie et application au biocapteur de glucose.

LIU Y., ZHANG X., LIU H., YU T., DENG J.

1996 *J. Biotechnol.*, Vol. 46(2), 131-138. (E)

Production of tussah silk powder by hydrochloric acid hydrolysis.

Production de poudre de soie tussah par hydrolyse à l'acide chlorhydrique.

LU A., ARAI M., HIRABAYASHI K.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 65(5), 392-394. (J)

Mechanical properties of silk string.

Propriétés mécaniques du fil de soie.

MATSUMOTO Y., SAKAGUCHI A., TORIUMI K., HARAKAWA K.

Shinshu University, Faculty of Textile Science and Technology, 3-15-1, Tokida, Ueda 386, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 65(6), 411-416. (J,e)

Presence of phosphorus in *Nephila clavipes* dragline silk.

Présence de phosphore dans la soie de la toile de l'araignée *Nephila clavipes*.

MICHAL C.A., SIMMONS A.H., CHEW B.G.M., ZAX D.B., JELINSKI L.W.

Cornell University, Ithaca, New York, U.S.A.

1996 *Biophysical Journal (USA)*, Vol. 70(1), 489-493. (E)

Investigation of properties of solution of sericin mixtures with sodium carboxymethylcellulose.

Propriétés de solutions de mélanges de sérécine avec de la carboxyméthylcellulose de sodium.

NURGALIEVA F.F., KHOLMUMINOV A.A., KUCHCAROVA O.R., TILLAIEV R.S.

1995 *Uzb. Khim. Zh.*, Vol. 5/6, 59-62. (E)**Spider silk cloning method might lead to new biomaterials.**

La méthode de clonage de la soie d'araignée peut conduire à de nouveaux biomatériaux.

POTERA C.

1996 *Genetic Engineering News : GEN (USA)*, Vol. 16(1), 1,25. (E)**Biodegradation of chemical constituents in tasar silk cocoons after infection with fungi.**

Biodégradation des constituants chimiques chez les cocons de soie tasar après infection par des champignons.

PRASAD M.M., SINGH H.N.P.

University Department of Botany, Bhagalpur University, Bhagalpur 812007, India.

1995 *Letters in Applied Microbiology (U.K.)*, Vol. 21(4), 235-236. (E)**Aspects of the morphology of the silk of *Bombyx mori*.**Aspects de la morphologie de la soie de *Bombyx mori*.

PUTTHANARAT S., ADAMS W.W., LIU G.F.

1996 *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.*, Vol. A33(7), 899-911. (E)**An amperometric new methylene blue N-mediating sensor for hydrogen peroxide based on regenerated silk fibroin as an immobilization matrix for peroxidase.**

Un nouveau détecteur ampérométrique à bleu de méthylène pour le peroxyde d'hydrogène basé sur la fibroïne de soie régénérée utilisée comme matrice d'immobilisation pour la peroxydase.

QIAN J.H., LIU Y.C., YU T.Y., DENG J.Q.*

* Fudan University, Department of Chemistry, Shanghai 200433, China.

1995 *Analytical Biochemistry*, Vol. 236(2), 208-214. (E)**Characterization of blend membranes of regenerated silk fibroin and PVA for immobilizing glucose oxidase and its application to a first generation of glucose sensors.**

Caractérisation des membranes de mélange de fibroïne de soie régénérée et de PVA pour l'immobilisation de la glucose oxydase et son application à la première génération de capteurs de glucose.

QIAN J., LIU H., LIU Y., YU T., DENG J.

1996 *Electroanalysis*, Vol. 8(5), 480-484. (E)**Characterization of regenerated silk fibroin membrane for immobilizing peroxidase and construction of an amperometric hydrogen peroxide sensor employing phenazine methosulfate as electron shuttle.**

Caractérisation de la membrane de fibroïne de soie régénérée pour l'immobilisation de la peroxydase et construction d'un capteur de peroxyde d'hydrogène ampérométrique employant le méthosulfate de phénazine comme transporteur d'électron.

QIAN J., LIU Y., LIU H., YU T., DENG J.

1995 *J. Electroanal. Chem.*, Vol. 397(1/2), 157-162. (E)**Water sorbed on raw silk using differential scanning calorimetry.**

Eau sorbée sur la soie grège par utilisation de la calorimétrie à balayage différentiel.

SAKABE H.

1996 *Kiito Kensa Kenkyu Hokoku*, Vol. 45, 37-43. (E)**Influence of degumming processes on the mechanical and drying properties of silk fabrics.**

Influence des procédés de décreusage sur les propriétés mécaniques et de séchage des tissus de soie.

SCHMODE E., STRUCKMEIER S., DITTRICH J.H., REUMANN R.D.

1996 Textilvereldlung, Vol. 31(5/6), 90-95. (E)

Studies on the high speed reeling method of complex silk yarn.

Etudes sur la méthode de dévidage à haute vitesse des fils de soie complexes.

SHIMIZU S.

1996 Reports of the Silk Science Research Institute, Vol. 44, 15-76. (J,e)

Measurement method for detecting cleanness and neatness defects of raw silk in rereeling process and its application to a control of cocoon cooking process.

Méthode de mesure pour la détection des défauts de propreté et de netteté de la soie grège dans le procédé de dévidage et son application au contrôle du procédé d'étouffage des cocons.

TAJIMA F., TAKABAYASHI C., ISHIGURAO Y., KINOSHITA H.

Faculty of Education, Yokohama National University, Hodogaya-ku, Yokohama 240, Japan.

1996 J. Seric. Sci. Jpn. Vol. 65(6), 447-451. (J,e)

Post-buckling behavior of silk fabrics and the prediction.

Comportement post-déformation des tissus de soie et sa prédiction.

TAKATERA M., BAO L., SHINOHARA A.

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, 3-15-1 Tokida, Ueda-shi, Nagano-ken 386, Japan.

1996 J. Seric. Sci. Jpn. Vol. 65(6), 477-484. (E,j)

Spectral and colorimetric parameters of photoluminescence of cocoons.

Paramètres colorimétriques et spectraux de la photoluminescence des cocons.

TAKUCHEV N., PANJOTOV M., OVESENSKA L.

Vissh Institut po Zootehnika i Veterinarna Maditsina, Stara Zagora, Bulgaria.

1995 Zhivotnov'dni Nauki (Bulgaria) - Animal Science, Vol. 32(5-8), 300-302. (Bg,r,e)

Results of research on creating and collecting ends of silk fibres in unwinding silk from different kinds of cocoon at silk unwinding mechanical enterprises.

Résultats des recherches sur la production et le ramassage des bouts de fibres de soie au cours du dévidage de différentes sortes de cocons dans des filature mécaniques.

THOM N.T.H.

1994 Nong Nghiep Cong Nghiep Thuc Pham (Vietnam), Vol. 10, 385-388. (Vi,e)

Cocoon lipids of the mulberry silkworm.

Les lipides du cocon du ver à soie du mûrier.

TOLIBAEV I., MAD'YAROV S.R., GLUSHENKOVA A.I.

1995 Khim. Prir. Saedin., Vol. 5, 664-666. (E)

Structure and molecular conformation of Tussah silk fibroin films: effect of methanol.

Structure et conformation moléculaire des films de fibroïne de la soie tussah : effet du méthanol.

TSUKADA M., FREDDI G., MONTI P., BERTOLUZZA A., KASAI N.

1995 J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys., Vol. 33(14), 1995-2001. (E)

Mechanics of silk produced by loaded.

Propriétés mécaniques de la soie produite par chargement.

VOLLRATH F., KOHLER T.

Department of Zoology, University Pk B135, 8000 Aarhus C, Denmark.

1996 Proceeding of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences, Vol. 263(1369), 387-391. (E)

Evidence of a cholesteric liquid crystalline phase in natural silk spinning processes.

Mise en évidence de cristaux liquides cholestériques dans le processus de filage de la soie naturelle.

WANG L., QIN J., SHEN B., ZHU J., ZANG Y.

1996 Macromolecules, Vol. 29(15), 5106-5110. (E)

Initial report on the application of hot air chamber to dry cocoon.

Rapport initial sur l'utilisation de chambre chaude pour sécher les cocons.

WANG S.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(3), 45-46. (C)

Correlation between the air humidity and cocoon reelability.

Corrélation entre l'humidité de l'air et la dévidabilité des cocons.

WANG S.

1996 Bulletin of Sericulture, Vol. 27(3), 44. (C)

Evenness test of raw silk using fuzzy image processing.

Test de régularité de la soie grège par procédé d'imagerie flou.

XIANG X.H., KAMIJO M., SAKAGUCHI A., SHIMIZU Y.

1996 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 65(5), 342-346. (J)

Studies on chitosan-fibroin blend membranes. 2. pH and ion sensitivities of semi-IPN membranes.

Etudes sur les membranes composées de chitosan et de fibroïne. 2. pH et sensibilités ionique des membranes semi-IPN.

XIN C., LI W., ZHONG W., GE C., WANG H., YU T.

1996 Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao, Vol. 17(6), 968-972. (E)

An approximate relation expressing sorption isotherms of silk and other fibers at several temperatures based on Halsey equation.

Une relation approximative exprimant les isothermes de sorption de la soie et d'autres fibres à plusieurs températures basée sur l'équation de Halsey.

YAMADA A.

1996 Kiito Kensa Kenkyu Hokoku, Vol. 45, 45-57. (E)

Structural analysis of oriented fiber by solid state NMR. Application of silk fibroin fiber.

Analyse structurale de fibres orientées par NMR en phase solide. Application à la fibre de fibroïne de soie.

YEO J.H., RHEE I.J., PAK P.K.

1996 Han'guk Somyu Konghakhoechi, Vol. 33(2), 116-124. (E)

Characterization of regenerated silk fibroin membranes for immobilizing glucose oxidase and construction of a tetrathiafulvalene-mediating glucose sensor.

Caractérisation des membranes de fibroïne de soie régénérées pour l'immobilisation de la glucose oxydase et construction d'un détecteur de glucose à tétrathiafulvalène.

YU T., LIU H., DENG J., LIU T.

1995 J. Appl. Polym. Sci., Vol. 58, 973-980. (E)

Structures and properties of the blend membrane of regenerated silk fibroin and poly(vinyl alcohol) and its application to glucose sensor.

Structures et propriétés de la membrane mixte de fibroïne de soie et de poly(vinyl alcool) et son application au capteur de glucose.

YU T., SHAO Z., LIU Y., QIAN J., LIU H., DENG J., HU D., ZHAO H.

1996 Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao, Vol. 17(4), 651-654. (E)

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, c. g. Dupont, Durand and Martin, the paper should be cited in the text as Dupont *et al.*, provided this is not ambiguous. If papers by the same author(s) in the same year are cited they should be distinguished by the letters a, b, etc.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

* * *

INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

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

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

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

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

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

- Le titre suivi du nom de l'auteur et de son adresse complète.
- Le résumé qui doit indiquer le contenu et les conclusions de l'article et doit faire référence à des informations nouvelles. Le résumé ne doit pas excéder 200 mots et peut être divisé en paragraphes numérotés.
- Les mots clés. Une petite liste de mots clés permettant une rapide analyse du contenu de l'article et utilisable pour la compilation de l'index.

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

- Remerciements.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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