

sericologia

Revue des Vers à Soie

Journal of Silkworms

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

Directeur Gérant
Rédacteur en Chef
Rédacteur Adjoint

B. MAUCHAMP
G. CHAVANCY
A. FOURNIER

Managing Director
Chief Editor
Deputy Editor

COMITE DE REDACTION **EDITORIAL BOARD**

AKAPANTHU S. (Thaïlande / *Thailand*)
BEAULATON J. (France)
BOSQUET G. (France)
CAPPELLOZZA L. (Italie / *Italy*)
CROIZIER G. (France)
COUBLE P. (France)
DANDIN S.B. (Inde / *India*)
DAS B.C. (Inde / *India*)
DATTA R.K. (Inde / *India*)
DOIRA H. (Japon / *Japan*)
FONSECA T.C. (Brésil / *Brazil*)
FOURCHE J. (France)
FREDDI G. (Italie / *Italy*)
GOLDSMITH M.R. (USA)
HORIE Y. (Japon / *Japan*)
IATROU K. (Canada)
JOLLY M.S. (Inde / *India*)
KOBAYASHI M. (Japon / *Japan*)
LEA H. Z. (Corée / *Korea*)

LEGAY J.-M. (France)
LIU S.-X. (Chine / *China*)
LU H.-S. (Chine / *China*)
MANO Y. (Japon / *Japan*)
MAUCHAMP B. (France)
PRUDHOMME J.-C. (France)
REALI G. (Italie / *Italy*)
SHIMURA K. (Japon / *Japan*)
SHIRATA A. (Japon / *Japan*)
SOMASHEKAR T.H. (Inde / *India*)
SONWALKAR T.N. (Inde / *India*)
J. E. MIRANDA (Brésil / *Brazil*)
TAZIMA Y. (Japon / *Japan*)
TRENCZEK T. (Rép. tchèque / *Czech Republic*)
VAGO C. (France)
VEY A. (France)
XIA J.-G. (Chine / *China*)
YAMASHITA O. (Japon / *Japan*)
YANAGAWA H. (Japon / *Japan*)

SOMMAIRE – CONTENTS

Revues / Reviews

- Studies on some special characters in the silkworm (*Bombyx mori* L.) germplasms in China** 527
 Etudes de certains caractères spéciaux chez les germoplasmes de ver à soie (*Bombyx mori* L.) en Chine 537
 LI MUWANG, YAO QIN, HOU CHENGXIANG, LIN CHANGQI & CHEN KEPING

- Research progress on diapause bioclock protein esterase A4 of silkworm, *Bombyx mori*** 543
 Progrès de la recherche sur la protéine de l'horloge biologique de la diapause, l'estérase A4, chez le ver à soie, *Bombyx mori* 551
 XU SHI-QING, DAI XUAN-YING, HAN YI-FEI, ZHENG BI-PING & TANG BIN

Articles scientifiques / Scientific papers

- Effects of pyriproxyfen on the larval development and silk production of *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombycidae)** 557
 Effets du pyriproxifène sur le développement larvaire et la production de soie chez *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombycidae) 565
 J. E. MIRANDA, S. A. DE BORTOLI & R. TAKAHASHI

- Interaction between some biocontrol agents and mulberry root rot pathogen *Fusarium solani* and *F. oxysporum*** 569
 Interaction entre des agents de lutte biologique et les pathogènes du pourrissement de la racine de mûrier *Fusarium solani* et *F. oxysporum* 577
 TOMY PHILIP, D. D. SHARMA & GOVINDAIAH

Rapports techniques / Technical reports

- Breeding commercial bivoltine silkworm hybrid resistant to Zhenjiang (China) strain of densovirus (DNV-Z)** 581
 Obtention d'un hybride de ver à soie bivoltin commercial résistant à la souche Zhenjiang (Chine) du virus de la densovirose (DNV-Z) 589
 LI MUWANG, HOU CHENGXIANG, YAO QIN & CHEN KEPING

- Direct somatic embryogenesis in *Morus indica* L. cv. S13 : improved embryoid induction and further evidence** 593
 Embryogenèse somatique directe chez le cv. S13 de *Morus indica* L. : amélioration de l'induction d'embryons 601
 U. PAVAN, K. SRINIVASA REDDY, M. RAMESH, A. V. RAO & A. SADANANDAM

Seasonal incidence of mulberry leaf roller, *Diaphania pulverulentalis* (Hampson) (Lepidoptera : pyralidae) in Karnataka (India) 605

Incidence saisonnière de l'enrouleur de la feuille de mûrier, *Diaphania pulverulentalis* (Hampson) (Lepidoptera : pyralidae) dans le Karnataka (Inde) 613
R. SRINIVASA GOWDA, T. K. NARAYANASWAMY & V. T. SANAVEERAPPANAVAR

Natural enemies of *Diaphania pulverulentalis* (Hampson) (Lepidoptera : pyralidea) infesting mulberry 615

Ennemis naturels de *Diaphania pulverulentalis* (Hampson) (Lepidoptera : pyralideae) infestant le mûrier 621
R. SRINIVASA GOWDA, T. K. NARAYANASWAMY & V. T. SANAVEERAPPANAVAR

Bibliographie / Bibliography 623

Sériciculture générale / General sericiculture 625
Mûrier / Mulberry 627
Bombyx mori : élevage, nutrition, pathologie / *Bombyx mori* : rearing, feeding pathology . 631
Séricigènes non mûriers : élevage, nutrition, pathologie : Non mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology 637
Vers à soie : génétique / Silkworms: genetics 639
Vers à soie : physiologie, biochimie / Silkworms: physiology, biochemistry 643
Vers à soie : oeufs, embryologie / Silkworms: eggs, embryology 649
Vers à soie : glandes séricigènes / Silkworms: silk glands 651
Soie / Silk 653

STUDIES ON SOME SPECIAL CHARACTERS IN THE SILKWORM (*BOMBYX MORI* L.) GERMPLASMS IN CHINA

LI MUWANG, YAO QIN, HOU CHENGXIANG, LIN CHANGQI & CHEN KEPING*

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

*China is the cradleland of sericulture and has plenty of silkworm germplasm resources. In recent years, we have engaged in the studies on some special characters in the stocks of silkworm in Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences (SRI-CAAS). Three hundred and twelve preserved silkworm races were investigated for their fluoride-resistance and the major dominant gene controlling the fluoride-resistance was discovered, it could endure 200 mg / kg of fluoride. Resistibility to *B. mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) of 346 races was investigated and the genetic model of resistance to BmNPV was analyzed. One main gene (which was located on autosome) and several tiny effecting genes (which were located on chromosome Z) controlled the resistibility to BmNPV. Eight races and a few individuals of 31 varieties of 206 stocks were nonsusceptible to *B. mori* densovirus virus of Zhenjiang (China) strain (BmDNV-Z). Female moths holding four, five, six, nine or ten ovarian tubes were discovered in 138 races. In 5 races, male cocoons show yellow fluorescence, while female cocoons show purple fluorescence when they were radiated under 365 nm ultraviolet ray. Several cocoon filament properties of silkworm germplasms have been investigated and analyzed. These researches will provide new silkworm breeding materials.*

Keywords: Silkworm (*Bombyx mori* L.), germplasm resources, special characters.

INTRODUCTION

Germplasm resources are the common heritage and sovereign properties of human kind. China is the cradleland of sericulture and has plenty of silkworm germplasm resources. Six hundred and sixty mulberry silkworm races are preserved in SRI-CAAS. Since the 1970s, China strengthened the research on silkworm germplasm resources and has gained some achievements. Fifty five characters of 510 silkworm germplasm have been investigated by SRI-CAAS and other sericultural research units in China until 1987 (He 1983; Xu *et al.*, 1981; Yang *et al.* 1982; SRI-CAAS, 1987). Resistance to several types of silkworm diseases in some silkworm races have been identified by SRI-CAAS. Guangdong Sericultural Research Institute and Zhejiang Sericultural Research Institute (Chen *et al.*, 1983; Hu *et al.*, 1984; Lin, 1984; Meng, 1982; Zhang *et al.*, 1982; Zhang 1986). On the bases of these investigations, lots of fundamental races and commercial have been bred. In recent years, we have engaged in the studies of some special characters in the stocks of silkworm in SRI-CAAS. The details were shown as follows.

* Corresponding author: Email: cjyz17@public.zj.js.cn

MATERIALS AND METHODS

1.1. Materials:

Stocks of silkworm races which are preserved in SRI-CAAS, NaF (analytically pure), BmNPVs, dried silkworm mid gut containing DNV-Z, 365 nm ultraviolet generator, scissors, forceps, drying oven, balance *et al.*.

1.2. Methods:

Bioassays were all conducted at 25° C. Forty silkworms were treated as a group.

1.2.1. Methods of investigation of fluoride resistance:

Three hundred and twelve preserved races were investigated for their fluoride resistance. Mulberry leaves were dipped in the NaF suspension (containing 0, 60, 80, 100, 120, 160 or 200 mg / kg NaF) for five min, and were fed to silkworm larvae since 2nd instar after these leaves were aired. Mortality rate was checked in the course of feeding.

1.2.2. Methods of investigation on the resistibility to BmNPV:

The resistibility to BmNPV of 346 silkworm races was investigated as the method of Chen *et al.*, (1996). Mulberry leaves were punched into round slices (2.5 cm in diameter). Each slice was smeared with 0.15 ml BmNPV suspension (containing 10⁸, 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴ or 0 BmNPV/ml). Second newly moulted silkworm larvae (2nd instar) were fed with those slices (one slice for 5 silkworms) for 24 hours, followed by rearing on uncontaminated fresh mulberry leaves. The mortality rate was investigated during the course of feeding.

1.2.3. Resistibility to BmDNV-Z in silkworm germplasms was investigated with the following methods:

Dried silkworm midgut containing DNV-Z was ground with distilled water until it turned into a dense solution. The solution was filtered with gauze and then centrifuged at 3500 rpm for 20 minutes. After adding an equal volume of 7% acetic acid to the supernatant, the solution was incubated at 25° C for 40 minutes, followed by adjustment to pH 7.0 and progressive dilution to 0.1%, 0.01%, 0.001%, 0.0001% solutions of tissue. Mulberry leaves were managed as 1.2.2. Newly hatched larvae of 206 races were fed with mulberry lamina which had been smeared with a DNV-Z suspension (containing 1, 0.1, 0.01, 0.001 or 0g/L dried DNV-Z silkworm mid gut) for 24 hours, followed by rearing on uncontaminated fresh mulberry leaves. Sick silkworms were checked for densovirus by immunoperoxidase-staining methods and mortality rate was investigated.

1.2.4. Investigation of ovarian tubes: Thirty female moths of each race of 268 races were dissected to check the number of ovarian tube.

1.2.5. Methods of investigation on the cocoon shell production efficiency:

Cocoon shell production efficiency of 251 silkworm races was tested as the method of Lin *et al.*, (1997). Thirty silkworms of each race were reared separately from 5th newly moulted larvae. They were fed three times a day. The mulberry leaves given to the silkworms were weighed each time and some of the same leaves were sampled. The silkworm waste was reserved. The sample, the silkworm waste, the residual leaves were dried and weighed separately. All the cocoon shells of these 30 silkworms were dried and weighed too. The amount of supplied fresh mulberry leaves, supplied dry leaves weight, amount of dry residual leaves, amount of ingested dry leaves, amount of dry leaves digested, ratio of digestion and cocoon shell production efficiency were calculated.

$$\text{Cocoon shell production efficiency} = \frac{\text{Cocoon shell weight}}{\text{Amount of ingested dry leaves}} \times 100\%$$

$$= \frac{\text{Cocoon shell weight}}{\text{Supplied dry leaves weight} - \text{amount of dry residual leaves}} \times 100\%$$

1. 2. 6. Methods of research on cocoon characters: The cocoon fluorescent colours of 348 races were investigated under 365nm ultraviolet (Chen *et al.*, 1988; Lin *et al.*, 1994). Cocoon filament length, reelability and neatness of 218 races were tested in spring. Two hundred and twenty-nine races cocoon shells were boiled in winter to test the ratio of sericin content. These cocoon shells were dried and weighed. Then, they were cut into pieces and boiled respectively. They were boiled for 30 min first and then they were boiled until their dry weight was changeless. Sericin content was calculated as follows:

$$\frac{\text{Dry cocoon shell weight before boiling} - \text{dry cocoon shell weight after boiling}}{\text{Dry cocoon shell weight before boiling}} \times 100\%$$

RESULTS

2. 1. The ability of fluoride resistance in silkworm resources and the discovery of main dominant gene controlling the fluoride-resistance:

Three hundred and twelve preserved silkworm races were investigated for their fluoride resistance and the relativity of fluoride-resistance and other economic characters was clarified. Eight fundamental materials were highly resistant to fluoride (Table I). Using the most susceptible race 733xin and the most resistant race T6 as parent materials, the dominant major gene of fluoride-resistance was discovered; it can resist 200mg/kg fluoride (Table II). This dominant major gene has been transferred into commercial races. Now, the highly resistant to fluoride races—*Luping* × *Qingguang* was bred and were used as commercial hybrids (Lin *et al.*, 2001).

2. 2. Resistance to BmNPV in the silkworm races:

Three hundred and forty-six silkworm races were tested for their resistance to BmNPV. Thirteen silkworm races' resistance to BmNPV was higher than that of others. After several times of judgments, a rare silkworm race—NB that was highly resistant to BmNPV was selected. Its logLC₅₀ (according to Reed-Muench method) was 8.25. The genetic model of resistance to BmNPV was analyzed using NB (the most resistant race) and 306 (the most susceptible race) as parents, and the heredity of the resistance to BmNPV was found to be incomplete dominant (Table III). It was controlled by one main gene (which was located on autosome) and several tiny effecting genes (which were located on chromosome Z) (Chen *et al.*, 1996). The highly resistant to BmNPV race was used as male parent to cross to commercial silkworm races, and one 4-member hybrid was bred. Its economic characters were similar to economical races for autumn rearing and its resistant ability was about 100 times higher than that of the economic hybrids—Jingsong × Haoyue (Li, 2001).

2. 3. DNV-Z resistance of the silkworm races preserved in SRI-CAAS:

Among 206 tested stock races, the individuals of 8 races were all resistant to DNV-Z, but their economic characters were not good. A few individuals of 15 varieties were resistant to DNV-Z indicating that some of the stocks were not genetically uniform. Because nonsusceptibility to DNV-Z was controlled by one recessive gene-nsd-Z (Hu *et al.*, 1984). The offspring of the surviving individuals and their hybrids were nonsusceptible to DNV-Z too (This had been demonstrated by feeding with DNV-Z), suggesting that both homozygous and heterozygous individuals were present in the population and that resistance was genetically based. Now, we have obtained six fundamental races in possession of good economic characters and named them D1, D3 (Chinese strains) and D2.

D4, D6 and D8 (Japanese strains). Using D1 (or D2) as the resistant parent, six new germplasms have been bred. They were completely resistant to DNV-Z and their economic characters were similar to their parents (Chen *et al.*, 2001).

Table 1. The silkworm weight index of the most susceptible and resistant races.

Tableau 1. Indice de poids des races de vers à soie les plus sensibles et les plus résistantes.

Susceptible races <i>Races sensibles</i>			Resistant races <i>Races résistantes</i>			
NaF (mg / kg)	15	30		90	120	150
47xin	58.3	66.1	Fa403	100.9	97.1	100.1
758	62.6	61.8	Luodibenhong	99.7	101.3	93.0
Jia179	63.6	53.2	Jia52	102.8	101.2	99.2
Jia198	65.1	47.1	Jia239	99.8	99.6	95.3
Jia180	66.0	45.8	Xinjiu	99.5	97.3	89.5
Jia48	72.7	66.8	Qiongsi	102.0	97.3	
Su12	68.9	47.2	Sihai102.4	81.5		

* The weight of the same races that were reared with uncontaminated fresh mulberry leaves was taken as control (100). The silkworms were weighted on the 4th day in the 5th instar / *Le poids des mêmes races qui sont élevées avec des feuilles de mûrier fraîches non contaminées est pris comme témoin (100). Les vers à soie sont pesés le 4^{ème} jour du 5^{ème} âge.*

2. 4. The mutants of ovarian tube:

Normally, silkworm female moth has 8 ovarian tubes. We have investigated ovarian tubes of 8645 female moths in 268 silkworm races and found that 217 moths of 138 races had mutants. They have 4, 5, 6, 9 or 10 ovarian tubes. Among them, 9 ovarian tubes was the highest mutant. We found that 36.4% moths of one race had 9 ovarian tubes.

2. 5. The investigation and correlation analysis on cocoon shell production efficiency of silkworm varieties:

Two hundred and fifty-one preserved silkworm varieties were investigated on their cocoon shell production efficiency. The results showed that average efficiency (cocoon shell / food ingested) was 10.11% (highest: 12.19%, lowest: 6.71%). The efficiency of bivoltine varieties ranked the first, followed by those of monovoltine and polyvoltine varieties. The average efficiency of Chinese

bivoltine varieties was the highest (10.54%), followed by Japanese bivoltine strains (10.39%), European monovoltine breeds (9.08%), Japanese monovoltine varieties (8.90%) and polyvoltine races (8.72%). The cocoon shell production efficiency of 14 races was higher than 11.5%. They were Huaba, Zhengai6, Jia24, 47xin, 751, 733, T9, 539, Jia48, Jia164, Jia186, Jia194, 652 and Zhen13. The efficiency was positively correlated with cocoon shell rate, cocoon shell weight, daily cocoon shell weight at the fifth instar. Some of them reached the significant or extremely significant level. It was not correlated with larva-pupa survival rate, ratio of cocoon mortality, cocoon weight and digestibility.

2. 6. The investigation of the fluorescent colours of silkworm cocoons:

The cocoon fluorescent colours of 348 varieties or strains has been observed under 365 nm ultraviolet radiation. The results were as follows.

2. 6.1. White cocoon varieties showed white, yellow, purple fluorescence and continuous spectra of some middle colours and the ratios of cocoons which expressed white fluorescence were Japanese monovoltine > European monovoltine > multivoltine > Chinese monovoltine (4 moult) > Japanese bivoltine > Chinese bivoltine > Chinese monovoltine (3 moult); the ratios of cocoons which expressed yellow fluorescence were Chinese monovoltine (3 moult) > Chinese bivoltine > Japanese bivoltine > multivoltine > Chinese monovoltine (4 moult) > Japanese monovoltine > European monovoltine.

Table II. The mortality of T6, 733xin and their cross under different denseness of NaF (%).

Tableau II. Mortalité de T6, 733xin et de leur croisement avec différentes densités de NaF (%).

NaF (mg / kg)	30	50	100	200	400	800	1600
T6	0	0	0	0	0	41.7	98.3
733xin	2.6	21.5	95.6	100	100	100	100
T6 × 733xin	0	0	0	0	24.2	92.5	100
733xin × T6	0	0	0	6.9	60.0	96.8	100
(T6 × 733xin) F2	0	0	11.6	31.0	72.1	95.2	100
(733xin × T6) F2	0	4.9	17.7	21.3	62.1	92.8	96.6
T6 × (T6 × 733xin)	0	0	0	0	25.2	46.9	92.9
(T6 × 733xin) × T6	0	0	0	0	11.0	47.9	89.1
733xin × (T6 × 733xin)	0	11.3	33.6	48.6	75.4	94.5	100
(T6 × 733xin) × 733xin	0	5.0	29.2	41.7	72.0	100	100

Table III. The LC50 of some silkworm races.

Tableau III. La CL50 chez quelques races de vers à soie.

Race	logLC ₅₀	Race	logLC ₅₀
NB	8.25	306	4.95
N1	6.89	NB × 306	7.42
N2	6.70	306 × NB	7.48
N3	6.42	(NB × 306)F2	6.57
N4	6.32	(306 × NB)F2	6.75
N5	6.65	(NB × 306) × NB	7.59
N6	6.61	NB × (NB × 306)	7.27
N7	6.57	(306 × NB) × NB	7.68
N8	7.10	NB × (306 × NB)	7.32
N9	6.82	(306 × NB) × 306	5.78
N10	6.99	306 × (306 × NB)	5.86
N11	6.48	(NB × 306) × 306	5.15
N12	6.57	306 × (NB × 306)	5.93

2. 6. 2. There was an obvious difference in fluorescence between male and female cocoons. The former strongly showed yellow fluorescence, while purple fluorescence was dominant in the latter. Five fundamental races were discovered which all of their male cocoons showed yellow fluorescence, while female cocoons showed purple fluorescence. According to these results, a hybrid has been bred by Liu *et al.* (1996). Sex of its parents and itself could be distinguished when their cocoons were irradiated under 365 nm ultraviolet ray.

2. 6. 3. Unwinding ratio had positive correlation with yellow fluorescent cocoons, and negative with purple fluorescent cocoons. There were differences among different races and different voltines. Few colour cocoon varieties showed white or purple fluorescence, they basically showed yellow fluorescence.

2. 7. The investigation of cocoon filament properties of silkworm varieties:

Two hundred and eighteen preserved varieties were investigated for their cocoon filament properties. The results were shown as follows:

2.7.1. Average filament length was 840 meters (the longest was 1273m, and the shortest was 344m). Filament length of Chinese bivoltine races ranked the first, followed by that of Japanese bivoltine races and polyvoltine varieties.

2.7.2. Average reelability percentage was 79.4% (the highest was 100%, the lowest was 41.5%). There were 15 varieties with a reelability percentage over 95%. Polyvoltine and Japanese strains are better than that of Chinese and European strains. Average non-broken filament length was 663m (the longest was 1043m and the lowest was 274m). The non-broken filament length of 2 races was higher than 1000m.

2.7.3. Average neatness was 93.0 points (the highest was 99.2 and the lowest was 76.7). There were 18 varieties with a neatness over 98 points. The neatness of polyvoltine races was the best, whereas that of bivoltine varieties was better than univoltine ones.

2.7.4. Average cocoon filament weight was 0.223 gram per cocoon (the highest was 0.354g and the lowest was 0.071g). Japanese univoltine strain varieties were the highest, followed by bivoltine varieties and polyvoltine varieties. Cocoon filament weight of 3 varieties was higher than 0.33g.

2.7.5. Cocoon filament size was tested in spring rearing season. The average size of all varieties tested was 2.80 dtex. The thickest was 3.93 dtex and the finest was 1.55 dtex. The size of different strains was in the order of Japanese strain > European strain > Chinese strain > tropical strain. That of different voltinism was the order of monovoltine > bivoltine > multivoltine. Correlative analysis showed that filament size was negatively correlated with filament length, non-broken filament length, percentage of sericin in cocoon shell and neatness, some of which were significant or extremely significant. It was positively correlated with cocoon shell weight, pupa weight and average cocoon shell weight per day in the 5th instar and filament weight, some of which were significant or extremely significant. It was not related with durations of developmental stages and physique of the larvae. Cocoon filament size of 2 races was thicker than 3.5 dtex and that of 11 races was finer than 1.9 dtex.

2.8. Sericin content of cocoon shells:

The sericin content of cocoon shells of 229 silkworm varieties has been investigated. The average of sericin ratio in cocoon shell was 25.7%, it ranges from 19.8% ~ 31.3% and the sericin ratio of 7 races was lower than 21%. We found that the sericin ratio was negatively correlated with filament size and reelability percentage. Its narrow sense heritability was 62.5%. Sericin dissolution was tested at the same time. When the cocoon shells were boiled for 30 minutes, sericin dissolution ranked from 27.2% to 13.1% respectively, with the average of 20.2%. The ratio of sericin dissolution of 4 races was lower than 14%. It was positively correlated with sericin ratio of cocoon shell and tends to a positive correlation with duration of development and cocoon shell ratio, but negative correlation with reelability and healthiness. There was no remarkable difference between female and male cocoon and among cocoons of different fluorescent colours. These results suggested that it be possible to breed silkworm races with low sericin ratio, high quantity of silk and high level of reelability.

DISCUSSION

3.1. The F1 hybrid of silkworm was firstly used in the early of 1930s in China. Great improvement had been made in silkworm breeding since 1950s, and more than 70 hybridised combinations had been bred until 2000. Most of these varieties were bred using a few stocks with good economic characters as parents. These hybridised combinations have similar characters and close blood relationship. Silkworm diseases were easy to prevail because the main genes in the practical silkworm races were the same. At the same time, along with the development of economy in China, the labour

will become more expensive and extensive cultivation in sericulture would be popularised. Silkworm diseases would be more probably prevalent in rural area. In recent years, we engaged in the study on the investigation of some special characters in silkworm germplasm and tried to analyse the relationship between them and the economic characters. We found that the resistibility to fluoride, BmNPV or BmDNV-Z has little relativity with the characters of cocoon but positively correlate with the vitality. Now, silkworm varieties highly resistant to fluoride had been bred and new silkworm germplasms nonsusceptible to DNV-Z, highly resistant to NPV have been bred too (Li, 2001). On the other hand, we have provided some silkworm races to other sericulturists to breed silkworm varieties which possess other characters (e. g. silkworm varieties own fine size, thick size or high tenacity and so on). We plan to breed silkworm races which possess two or more special characters.

3. 2. Normally, pupae sex can only be judged directly when cocoons are cut. But that of some races can be judged when their cocoon shells were irradiated by 365 nm ultraviolet ray. When these races were bred in the station for producing silkworm eggs, they were laboursaving. Cocoons of these varieties and their hybrids can be divided into male or female, they could be reeled separately because the silk of male was nicer than that of female. The silkworm varieties, Yinnnguang and Chunyu whose sex can be judged by 365 nm ultraviolet ray have been bred by Liu *et al.*, (1996) and their hybrids have been used as commercial races.

3. 3. Many sericulturists have studied on the improvement of efficiency of transforming leaf ingested into silk so that more silk could be produced in same acreage of tillage. Our investigations showed that the cocoon shell production efficiency was different in different silkworm races. These results showed that it was possible to breed silkworm varieties with high silk production efficiency.

REFERENCES

- CHEN H. Y., LI B. Y., LIU S. X. (1983) Studies on the breeding and heredity of some resistant strains to cytoplasmic polyhedrosis virus in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Sericologica Sinica*, 9(4), 214-218.
- CHEN K.-P., LIN C.-Q. (1988) Studies on the fluorescent colours of silkworm cocoons. *Acta Sericologica Sinica*, 14(2), 72-77.
- CHEN K. P., LIN C. Q., YAO Q., *et al.*, (1996) Studies on the resistance to BmNPV and its hereditary regularity in the silkworm (*Bombyx mori* L.). *Acta Sericologica Sinica*, 22(3) 160-164.
- CHEN KEPING, LI M. W., YAO Q., *et al.*, (2001) Breeding of new germplasms of silkworm (*Bombyx mori*) resistant to Zhenjiang (China) strain of denonucleosis virus (DNV-Z). *Sericologia*, 41(1), 21-40.
- HE J. L., YI W. Z. (1983) The blood esterase map in the silkworm varieties. *Acta Sericologica Sinica*, 9(2), 103-106.
- HU X. F., QIAN Y. J., GUO X. J., *et al.*, (1984) Studies on the infectivity of silkworm denonucleosis virus to some silkworm races. *Acta Sericologica Sinica*, 10(2), 87-90.
- LI M. W. (2001) Breeding of new germplasms of the silkworm (*Bombyx mori*) resistant to nuclear polyhedrosis or denonucleosis and identification of RAPD markers linked to the resistant genes. Master paper, Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences.
- LIN C. Q. (1984) Studies on the correlation between the resistance to BmCPV and other economic characters of the silkworm. *Acta Sericologica Sinica*, 10(3), 158-162.
- LIN C. Q., WU D. X., YAO Q., *et al.*, (1997) The investigation and correlation cocoon shell production efficiency of silkworm varieties. *Acta Sericologica Sinica*, 1997(2) 92-95.
- LIN C. Q., YAO Q., CHEN K. P., *et al.*, (1994) Study on the fluorescence of silkworm larvae bollod, liquid substance in silk gland and cocoon shell. *Acta Sericologica Sinica*, 20(1), 43-44.

- LIN C. Q., YAO Q., FANG Q. Q. *et al.* (2001) Breeding of summer-autumn rearing fluoride enduring silkworm variety Lu Ping × Qing Guang and improvement of Guang's endurance to fluoride. *Acta Sericologica Sinica*, 27(1) 24~28.
- LIU J. Q., YU Z. C., CUI Y. M. *et al.* (1996) Breeding of fluorescence cocoon colour sex-limited varieties Yingguang, Chunyu and the preparation of their F1 hybrid. *Acta Sericologica Sinica*, 22(2) 155-159.
- MENG Z. Q. (1982) Inheritance of resistance to nuclear polyhedrosis of the silkworm (*Bombyx mori* L.). *Acta Sericologica Sinica* 8(3), 133-138.
- SRI-CAAS as editor in chief (1987) Record of silkworm races in China. Agricultural publishers, Beijing, China.
- XU F. M., SHEN W. D., LUO Q. (1981) The difference among the diapause of eggs induced by the suboesophageal ganglion of the different voltinism race of silkworm (*Bombyx mori* L.). *Acta Sericologica Sinica*, 7(3), 189-190.
- YANG R. Z., LIN C. Q., CHEN K. P. *et al.* (1982) A survey of the adaptability of different races of parent silkworm (*Bombyx mori* L.) to artificial diet – tests on the ingestion of hatching larvae. *Acta Sericologica Sinica* 8(3), 167.
- ZHANG Y. N., LIU S. X., HUO Y. M. (1982) Identification of the resistance of certain silkworm races to six types of silkworm disease. *Acta Sericologica Sinica*, 8(2), 94-97.
- ZHANG Z. F. (1986) Studies on the heredity and breeding technique of silkworm's resistance against BmCPV disease. *Acta Sericologica Sinica*, 12(4), 211-214.

ETUDES DE CERTAINS CARACTERES SPECIAUX CHEZ LES GERMOPLASMES DE VER A SOIE (*BOMBYX MORI* L.) EN CHINE

LI MUWANG, YAO QIN, HOU CHENGXIANG, LIN CHANGQI & CHEN KEPING*

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

*La Chine est le berceau de la sericiculture et détient de nombreuses ressources en germoplasmes du ver à soie. Récemment, nous nous sommes engagés dans l'étude de certains caractères spéciaux de souches de vers à soie au Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences (SRI-CAAS). La résistance au fluor de trois cent douze races de vers à soie conservées a été étudiée et nous avons découvert un gène majeur dominant contrôlant la résistance au fluor : il permet de supporter jusqu'à 200 mg de fluor / kg. Nous avons étudié la résistance de *B. mori* au virus de la polyédrose nucléaire (BmNPV) de 346 races et analysé le modèle génétique de résistance à BmNPV. Un gène principal (qui est situé sur un autosome) et plusieurs gènes d'efficacité faible (qui sont situés sur le chromosome Z) contrôlent la résistance à BmNPV. Huit races et quelques individus de 31 variétés de 206 souches ne sont pas sensibles au virus de la densomielose de *B. mori* de souche Zhenjiang (Chine) (BmDNV-Z). Nous avons découvert des papillons femelles contenant quatre, cinq, six, neuf ou dix tubes ovariens chez 138 races. Chez 5 races, les cocons mâles présentent une fluorescence jaune, tandis que les cocons femelles présentent une fluorescence violette quand ils sont éclairés sous des rayons ultraviolets de 365 nm. Nous avons étudié et analysé plusieurs propriétés du filament du cocon chez les germoplasmes du ver à soie. Ces recherches permettront d'obtenir de nouveaux matériaux de lignage chez le ver à soie.*

INTRODUCTION

Les ressources des germoplasmes sont l'héritage commun et les propriétés souveraines de l'humanité. La Chine est le berceau de la sericiculture et possède de nombreuses ressources de ver à soie. Six cent soixante races de vers à soie du mûrier sont conservées au SRI-CAAS. Depuis 1970, la Chine a renforcé ses recherches sur les ressources du ver à soie et a progressé. Nous avons étudié cinquante cinq caractères de 510 germoplasmes du ver à soie au SRI-CAAS et dans d'autres unités de recherche sericicole en Chine jusqu'en 1987 (He 1983 ; Xu et coll., 1981 ; Yang et coll., 1982 ; SRI-CAAS, 1987). Le SRI CAAS, Guangdong Sericultural Research Institute et le Zhejiang Sericultural Research Institute (Chen et coll., 1983 ; Hu et coll., 1984 ; Lin, 1984 ; Meng, 1982 ; Zhang et coll., 1982 ; Zhang 1986) ont identifié une résistance à plusieurs types de maladies chez certaines races de vers à soie. Sur la base de ces recherches, de nombreuses races d'intérêt fondamental et commercial ont été isolées. Récemment nous nous sommes engagés dans des études sur certains caractères spéciaux de souches de vers à soie du SRI-CAAS.

* Auteur auquel la correspondance doit être adressée : Email : cjyz17@public.zj.js.cn.

MATERIELS ET METHODES

1. 1. Matériels :

Des souches de races de vers à soie qui sont conservées au SRI-CAAS. Du fluorure de sodium (NaF) (analytiquement pur), des BmNPVs, de l'intestin moyen séché de ver à soie contenant du DNV-Z, un générateur ultraviolet de 365 nm, des ciseaux, des forceps, un four séchant, une balance etc.,

1. 2. Méthodes :

Des évaluations biologiques sont réalisées à 25° C. Quarante vers à soie sont traités comme un groupe.

1. 2. 1. Méthodes d'étude de la résistance au fluor :

Nous étudions la résistance au fluor de trois cent douze races conservées. Des feuilles de mûrier sont trempées dans une suspension NaF (contenant 0, 60, 80, 100, 120 160 ou 200 mg de NaF / kg) pendant cinq minutes et sont données en nourriture aux larves de ver à soie à partir du 2^{ème} âge après avoir aéré ces feuilles. On vérifie le taux de mortalité au cours du nourrissage.

1. 2. 2. Méthodes d'étude de la résistance à BmNPV :

Nous avons étudié la résistance à BmNPV de 346 races de vers à soie selon la méthode de Chen et coll., (1996). Les feuilles de mûrier sont découpées en cercles (2,5 cm de diamètre). Chaque surface circulaire est enduite avec une suspension de 0,15 ml de BmNPV (contenant 10⁸, 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴ ou 0 BmNPV / ml). Des larves de vers à soie ayant effectué leur 2ème mue (2ème âge) sont nourries avec ces morceaux de feuilles (un cercle pour 5 vers à soie) pendant 24 heures, puis on les élève sur des feuilles de mûrier non contaminées. Le taux de mortalité est étudié au cours du nourrissage.

1. 2. 3. Méthodes d'étude de la résistance à BmDNV-Z chez les germoplasmes de ver à soie :

De l'intestin moyen séché de ver à soie contenant du DNV-Z est moulu avec de l'eau distillée jusqu'à ce qu'il constitue une solution dense. La solution est filtrée à travers une gaze puis centrifugée à 3500 tpm pendant 20 minutes. Après avoir ajouté un volume égal d'acide acétique à 7 % au surnageant, la solution est incubée à 25° C pendant 40 minutes, puis le pH est ajusté à 7 et les solutions de tissus sont diluées progressivement à 0,1 %, 0,01 %, 0,001 %, 0,0001 %. On traite les feuilles de mûrier comme en 1. 2. 2. Les larves nouvellement écloses de 206 races sont nourries avec des limbes de mûrier qui ont été enduites avec une suspension de DNV-Z (contenant 1, 0,1 ; 0,01, 0,001 ou 0g / l d'intestin moyen séché de ver à soie avec du DNV-Z) pendant 24 heures, puis sont élevées sur des feuilles de mûrier fraîches non contaminées. Les vers à soie malades sont vérifiés par rapport au virus de la densonucléose grâce à des méthodes de coloration à l'immunopéroxydase et on étudie le taux de mortalité.

1. 2. 4. Etude des tubes ovariens : Trente papillons femelles de chaque race de 268 races sont disséqués pour vérifier le nombre de tubes ovariens.

1. 2. 5. Méthodes d'étude de l'efficacité de production de coques soyeuses :

L'efficacité de production de coques soyeuses de 251 races de vers à soie est testée d'après la méthode de Lin et coll., (1997). Trente vers à soie de chaque race sortant de la 4^{ème} mue sont élevés séparément. Ils sont nourris trois fois par jour. Les feuilles de mûrier données aux vers à soie sont pesées chaque fois et certaines des feuilles sont échantillonnées. Les déchets de vers à soie sont mis de côté. L'échantillon, les déchets de vers à soie, les feuilles résiduelles sont séchés et pesés séparément. Toutes les coques soyeuses de ces 30 vers à soie sont séchées et pesées. La quantité de feuilles de mûrier fraîches fournies, le poids des feuilles sèches fournies, la quantité de feuilles

résiduelles sèches, la quantité de feuilles sèches ingérées, la quantité de feuilles sèches digérées, le ratio de digestion et l'efficacité de production de coques soyeuses sont calculés.

$$\begin{aligned} \text{Efficacité de production de coques soyeuses} &= \frac{\text{Poids de la coque soyeuse}}{\text{Quantité de feuilles sèches ingérées}} \times 100 \% \\ &= \frac{\text{Poids de la coque soyeuse}}{\text{Poids des feuilles sèches fournies} - \text{quantité de feuilles sèches résiduelles}} \times 100 \% \end{aligned}$$

1. 2. 6. Méthodes de recherche sur les caractères du cocon. On a étudié les couleurs fluorescentes du cocon de 348 races sous des rayons ultraviolets à 365 nm (Chen et coll., 1988 ; Lin et coll., 1994). La longueur du filament du cocon, la dévidabilité et la netteté de 218 races sont testées au printemps. Les coques soyeuses de deux cent vingt neuf races sont bouillies en hiver pour mesurer la teneur en sérine. Ces coques soyeuses sont séchées et pesées. Puis, elles sont coupées en morceaux et bouillies respectivement. Elles sont bouillies pendant 30 minutes en premier et puis elles sont bouillies jusqu'à ce que le poids sec demeure inchangé. La teneur en sérine est calculée comme suit.

$$\frac{\text{Poids de la coque soyeuse sèche avant l'ébullition} - \text{poids de la coque soyeuse sèche après l'ébullition}}{\text{Poids de la coque soyeuse sèche avant l'ébullition}} \times 100 \%$$

RESULTATS

2. 1. Capacité de résistance au fluor chez les souches de ver à soie et découverte du gène principal dominant contrôlant la résistance au fluor :

Nous avons étudié trois cent douze races de vers à soie conservées par rapport à leur résistance au fluor et clarifié la relativité de leur résistance au fluor et des autres caractères économiques. Huit souches sont très résistantes au fluor (Tableau I). En utilisant la race la plus sensible 733xin et la race T6 la plus résistante comme matériaux parents, nous avons découvert un gène dominant principal de résistance au fluor; il permet de résister à 200 mg de fluor / kg (Tableau II). Ce gène dominant principal a été transféré chez les races commerciales. Maintenant, nous avons obtenu la lignée très résistante au fluor *Luping* × *Qingguang* et elle est utilisée comme hybride commercial (Lin et coll., 2001).

2. 2. Résistance des races de vers à soie à BmNPV:

Trois cent quarante six races de vers à soie sont testées par rapport à leur résistance à BmNPV. La résistance à BmNPV apparaît plus élevée chez treize races de vers à soie. Après plusieurs jugements, une race de ver à soie rare – NB qui est très résistante à BmNPV a été sélectionnée. Le log de la LC₅₀ (selon la méthode de Reed-Muench) est de 8,25. Le modèle génétique de résistance à BmNPV est analysé en utilisant NB (la race la plus résistante) et 306 (la race la plus sensible) comme parents et l'hérédité de la résistance à BmNPV s'avère être de type dominant incomplet (Tableau III). Elle est contrôlée par un gène principal (qui est situé sur un autosome) et plusieurs gènes mineurs (qui sont situés sur le chromosome Z) (Chen et coll., 1996). La race très résistante à BmNPV est utilisée comme parent mâle pour croisement avec des races de vers à soie commerciales et un hybride à 4 parents a été mis au point. Ses caractères économiques sont similaires à ceux des races commerciales pour l'élevage d'automne et sa capacité de résistance est environ 100 fois supérieure à celle des hybrides commerciaux – Jingsong × Haoyue (Li, 2001).

2. 3. Résistance à DNV-Z de races de vers à soie conservées au SRI-CAAS :

Sur 206 souches de races testées, les individus de 8 races sont tous résistants à DNV-Z, mais leurs caractères économiques ne sont pas bons. Quelques individus de 15 variétés sont résistants à DNV-Z

ce qui indique que certaines des souches ne sont pas génétiquement uniformes parce que la non-sensibilité à DNV-Z est contrôlée par un gène *nsd-Z* récessif (Hu et coll., 1984). La descendance des individus survivants et de leurs hybrides n'est pas aussi sensible à DNV-Z (cela est démontré par l'alimentation avec du DNV-Z), ce qui suggère qu'il y a à la fois des individus homozygotes et hétérozygotes dans la population et que la résistance a une base génétique. Maintenant, nous avons obtenu six races fondamentales possédant de bons caractères économiques et les avons nommées D1, D3 (souches chinoises) et D2, D4, D6 et D8 (souches japonaises). En utilisant D1 (ou D2) comme parent résistant, six nouveaux germoplasmes ont été lignés. Ils sont complètement résistants à DNV-Z et leurs caractères économiques sont similaires à ceux de leurs parents (Chen et coll., 2001).

2. 4. Les mutants du tube ovarien :

Normalement, le papillon femelle du ver à soie a 8 tubes ovariens. Nous avons étudié les tubes ovariens de 8645 papillons femelles chez 268 races de vers à soie et trouvé que 217 papillons de 138 races ont des mutants. Ils ont 4, 5, 6, 9 ou 10 tubes ovariens. Chez une race, 36,4 % des papillons femelles possédaient 9 tubes ovariens.

2. 5. Etude et analyse de corrélation de l'efficacité de production de coques soyeuses de variétés de vers à soie :

On étudie l'efficacité de production de coques soyeuses de deux cent cinquante et une variétés de vers à soie conservées. Les résultats montrent que l'efficacité moyenne (coque soyeuse / nourriture ingérée) est de 10,11 % (la plus élevée : 12,19 %, la plus faible : 6,71 %). L'efficacité des races bivoltines se classe en premier, suivie par les variétés monovoltine et polyvoltine. L'efficacité moyenne des variétés chinoises bivoltines est la plus élevée (10,54 %), suivies par les souches bivoltines japonaises (10,39 %), les lignées monovoltines européennes (9,08 %), les variétés monovoltines japonaises (8,90 %) et les races polyvoltines (8,72 %). L'efficacité de production de coques soyeuses de 14 races est supérieure à 11,5 %. Il s'agit de Huaba, Zhengai6, Jia24, 47xin, 751, 733, T9, 539, Jia 48, Jia164, Jia186, Jia194, 652 et Zhen13. L'efficacité est corrélée positivement avec le taux de coques soyeuses, le poids de la coque soyeuse, le poids quotidien de la coque soyeuse au 5^{ème} âge. Certains d'entre eux atteignent un niveau significatif ou extrêmement significatif. Elle n'est pas corrélée au taux de survie larve-nymphé, au taux de mortalité dans le cocon, au poids du cocon et à la digestibilité.

2. 6. Etude des couleurs fluorescentes des cocons du ver à soie :

Nous avons observé les couleurs fluorescentes du cocon de 348 variétés ou souches sous des rayons ultraviolet à 365 nm. Les résultats sont les suivants.

2.6. 1. Les variétés à cocons blancs présentent une fluorescence blanche, jaune, violette et un spectre continu de certaines couleurs moyennes et la valeur du ratio de cocons qui expriment une fluorescence blanche va des monovoltines japonaises > aux monovoltines européennes > aux polyvoltines > aux monovoltines chinoises (4 mues) > aux bivoltines japonaises > aux bivoltines chinoises > aux monovoltines chinoises (3 mues) ; la valeur du ratio de cocons qui expriment une fluorescence jaune va des monovoltins chinois (3 mues) > aux bivoltins chinois > aux bivoltins japonais > aux polyvoltins > aux monovoltins chinois (4 mues) > aux monovoltins japonais > aux monovoltins européens.

2. 6. 2. Il y a une différence évidente de fluorescence entre les cocons mâles et femelles. Les premiers présentent une forte fluorescence jaune, tandis que la fluorescence violette est dominante chez ces derniers. On a découvert cinq races dont tous les cocons mâles présentent une fluorescence jaune tandis que les cocons femelles présentent une fluorescence violette. A partir de ces résultats, un hybride a été produit par Liu et coll., (1996). On peut distinguer le sexe de ses parents et son sexe quand leurs cocons sont irradiés sous des rayons ultraviolet à 365 nm.

2.6. 3. Le rendement de dévidage donne une corrélation positive avec les cocons fluorescents jaunes et négative avec les cocons fluorescents violets. Il y a des différences entre les différentes races et les différents voltinismes. Peu de variétés de cocons de couleur présentent une fluorescence blanche ou violette, en général ils présentent une fluorescence jaune.

2.7. Etude des propriétés du filament du cocon chez les variétés de ver à soie :

Nous avons étudié les propriétés du filament du cocon chez deux cent dix huit variétés conservées. Les résultats sont les suivants :

2.7. 1. La longueur moyenne du filament est de 840 mètres (le plus long est de 1273 m, et le plus court de 344 m). La longueur du filament des races bivoltines chinoises se classe en premier, suivie par celle des races bivoltines japonaises et des variétés polyvoltines.

2. 7. 2. Le pourcentage de dévidabilité moyen est de 79,4 % (le plus élevé est de 100 %, le plus bas de 41,5 %). Il y avait 15 variétés avec un pourcentage de dévidabilité de plus de 95 %. Les souches polyvoltines et japonaises sont meilleures que les souches chinoises et européennes. La longueur moyenne du filament sans casse est de 663m (la plus longue est de 1043m et la plus courte de 274m). La longueur du filament sans casse est supérieure à 1000 m chez deux races.

2. 7. 3. La netteté moyenne est de 93 points (la plus élevée est de 99,2 et la plus faible de 76,7). Il y avait 18 variétés avec une netteté supérieure à 98 points. La netteté des races polyvoltines est la meilleure, tandis que celle des variétés bivoltines est meilleure que celle des monovoltines.

2.7. 4. Le poids moyen du filament du cocon est de 0,223 g par cocon (le plus élevé est de 0,354g et le plus bas de 0,071g). Les variétés de souche monovoltine japonaise ont le poids le plus élevé, suivies par les variétés bivoltines et polyvoltines. Le poids du filament du cocon est supérieur à 0,33g chez 3 variétés.

2.7. 5. Le titre du filament du cocon a été testé pendant la saison d'élevage du printemps. Le titre moyen de toutes les variétés testées est de 2,80dtex. Le plus épais est de 3,93 dtex et le plus fin est de 1,55 dtex. Le titre des différentes souches se classe dans l'ordre suivant : souches japonaises > souches européennes > souches chinoises > souches tropicales. Par rapport au voltinisme l'ordre est : monovoltins > bivoltins > polyvoltins. L'analyse de corrélation montre que le titre du filament est négativement corrélé avec la longueur du filament, la longueur du filament sans casse, le pourcentage de séricine dans la coque soyeuse et la netteté. Il est positivement corrélé avec le poids de la coque soyeuse, le poids de la nymphe et le poids moyen du cocon par jour au 5^{ème} âge et le poids du filament avec des résultats très significatifs ou extrêmement significatifs. Il n'est pas lié aux durées des stades de développement et à la constitution physique des larves. Le titre du filament du cocon de 2 races est plus épais que 3,5 dtex et celui de 11 races est plus fin que 1,9 dtex.

2. 8. Teneur en séricine dans les coques soyeuses :

Nous avons étudié la teneur en séricine des coques soyeuses de 229 variétés de vers à soie. La moyenne du ratio en séricine dans la coque soyeuse est de 25,7 % ; il est compris entre 19,8 % et 31,3 % et le ratio de séricine de 7 races est inférieur à 21 %. Nous avons trouvé que le ratio de séricine est corrélé négativement avec le titre du filament et le pourcentage de dévidabilité. Son héritabilité au sens restreint est de 62,5 %. Parallèlement, nous avons aussi testé la dissolution de la séricine. Quand les coques soyeuses sont bouillies pendant 30 minutes, la dissolution de la séricine est comprise respectivement entre 27,2 % et 13,1 %, avec une moyenne de 20,2 %. Le ratio de dissolution de

séricine de 4 races est inférieur à 14 %. Il est positivement corrélé avec le ratio de sérécine de la coque soyeuse et tend à une corrélation positive avec la durée de développement et le ratio de coques soyeuses mais à une corrélation négative avec la dévidabilité et la robustesse. Il n'y a pas de différence remarquable entre le cocon femelle et mâle et parmi les cocons de différentes couleurs fluorescentes. Ces résultats suggèrent qu'il est possible de ligner des races de vers à soie avec un faible ratio de sérécine, une quantité élevée de soie et un niveau élevé de dévidabilité.

DISCUSSION

1. 1. L'hybride F1 du ver à soie a été utilisé à partir du début des années 1930 en Chine. Des progrès importants ont été faits dans le lignage du ver à soie depuis les années 1950 et plus de 70 combinaisons d'hybrides ont été lignées jusqu'en 2000. La plupart de ces variétés sont lignées en utilisant comme parents quelques souches avec de bons caractères économiques. Ces combinaisons hybrides ont des caractères similaires et une consanguinité importante. Il est facile de lutter contre les maladies du ver à soie parce que les gènes principaux des races utilisées sont les mêmes. Parallèlement, avec le développement de l'économie en Chine, la main d'œuvre deviendra plus chère et la culture extensive en séréciculture se popularisera. Les maladies du ver à soie seront probablement plus développées dans les zones rurales. Récemment, nous nous sommes engagés dans l'étude de certains caractères spéciaux chez les vers à soie en collections et nous avons essayé d'analyser leur relation avec les caractères économiques. Nous avons trouvé que la résistance au fluor, à BmNPV ou à BmDNV-Z a peu de rapport avec les caractères du cocon mais est positivement corrélée avec la vitalité. Maintenant, des variétés de vers à soie très résistantes au fluor ont été lignées et de nouveaux germoplasmes non sensibles à DNV-Z, très résistants à NPV ont été également lignés (Li, 2001). D'autre part, nous avons fourni des races de vers à soie à d'autres séréciculteurs pour ligner des variétés de ver à soie qui possèdent d'autres caractères (par exemple des variétés de ver à soie avec un titre fin, un titre épais ou une ténacité élevée, etc). Nous avons l'intention de ligner des races de vers à soie qui possèdent au moins deux caractères spéciaux.

1. 2. Normalement, on peut déterminer directement le sexe des nymphes quand on découpe les cocons. Mais celui de certaines races ne peut être déterminé que quand on irradie les coques soyeuses aux rayons ultraviolet à 365 nm. Quand nous lignons ces races à la station pour produire des œufs de vers à soie, cela allège le travail. Les cocons de ces variétés et de leurs hybrides peuvent être divisés entre les mâles et les femelles, ils peuvent être dévidés séparément parce que la soie du mâle est meilleure que celle des femelles. Les variétés de vers à soie, Yinngguang et Chunyu dont on peut déterminer le sexe aux rayons ultraviolet à 365 nm ont été lignées par Liu et coll., (1996) et leurs hybrides sont utilisés comme races commerciales.

1. 3. De nombreux séréciculteurs ont étudié l'amélioration de l'efficacité de transformation de la feuille ingérée en soie pour produire plus de soie pour la même superficie de culture. Nos études montrent que l'efficacité de production de coques soyeuses est différente chez les différentes races de vers à soie. Ces résultats montrent qu'il est possible de ligner des variétés de vers à soie avec une efficacité de production de soie élevée.

RESEARCH PROGRESS ON DIAPAUSE BIOBLOCK PROTEIN ESTERASE A4 OF SILKWORM, *BOMBYX MORI*

XU SHI-QING, DAI XUAN-YING, HAN YI-FEI, ZHENG BI-PING & TANG BIN

Biotechnology Lab. for Silkworm and Silk, School of Life Science, Soochow University,
Suzhou 215006, China.

*The diapause bioblock of **Bombyx mori** depends on the esterase A4 (EA4) to percept messages, such as low temperature, hydrochloric acid stimulation and prompt gene and begin the embryonic development. EA4, consisting of 155 amino acid residues from His to Tyr, is combined with a glycoside at the 22nd, where is Asn. The timer function of EA4 is connected with its own structure, and controlled by peptidic inhibition needle (PIN). PIN is a kind of polypeptide, which is composed of 38 amino acid residues from Ser to Asn, and processed from egg special protein (ESP).*

Keywords: *Bombyx mori*, diapause bioblock, structure function.

INTRODUCTION

The bioblock phenomenon of insect is present in a lot of processes, such as locomotion, breathing, hormone action, cell division period, nyctinasty to external stimulus like narcotic and pesticide, chemical constitution variations of hemolymph, activity variations of enzyme in cells etc.

In the circadian rhythm insects, such as *Periplaneta americana* and *Teleogryllus commodus*, the driving part is the cells in ventral part of optic lobe edge. Light message is transmitted to brain by eye; and the driving part connects with action part through brain neurosecretory cells (Brady, 1969; Lohr, 1974; Sokolove & Lohr, 1975). In other circadian rhythm insects, such as *Hyalophora decrepit*, brain is the driving part of bioblock. The brain percept light together with the compound eye and sets up driving time, instructs nerves to secret hormone, which is delivered through bloodstream and cause reaction of all nerve knots in the abdomen, just like eclosion and flying. But compound eye can make certain adjustment for control of brain (Truman *et al.*, 1974). In some kinds of insect, there are some other periodic life activities, another kind of bioblock, which is neither driven by optic lobe nor by brain. And the deepest study in this field is the diapause bioblock in *Bombyx mori*.

1. Advancements in diapause bioblock of *Bombyx mori*:

1. 1. Diapause regulation of *Bombyx mori*:

Bombyx mori is egg-diapausing insect. The environmental stimulus (ex. high temperature, long light) starting from the stage of parent embryonic organogenesis, affect the suboesophageal ganglion (SG) of parent pupa to secret diapause hormone (DH), and result in the laid eggs having diapausing character, but whether it can begin diapause or not depends on temperature after oviposition (Hasegawa, 1957; Kai, 1977; Kai & Kawai, 1981b; Shimada, 1986). In the initial stage of embryogeny, embryonic tissue differentiation has not begun yet, and there is neither tangible tissue and organ nor nerve cell to percept temperature variation and to drive diapause bioblock. So, the

diapause bioblock in silkworm eggs can be explained more possibly and directly from gene and molecule level.

Diapause is a positive method for silkworm and other insects to survive in poor environment, such as low temperature in winter. Even if diapause eggs are transferred to good environment, they cannot terminate diapause at once. In order to complete diapause, low temperature for a certain time is needed to finish diapause development and then eggs can finish diapause and start their activation (Denlinger, 1985). Different from the slow action of chilling, stimulus such as hydrochloric acid and hot water can urge diapausing egg to finish diapause development in a short time, these are artificial activation methods commonly used in sericulture production. Low temperature (Kai *et al.*, 1995b) or acid treatment (Xu *et al.*, 2000b) needed in activating diapause eggs correlate positively to the diapause degree of eggs, that is diapause development duration, and the acid treatment has positive correlation with the protecting period of high temperature (25°C) after oviposition.

1. 2. The relationship between variation of esterase A4 activity and egg diapause:

Kai and Hasegawa (1972a) found 11 bands from acid alcohol (0.5% TCA, 90% alcohol) soluble proteins in ovary and eggs using starch gel electrophoresis method. Among these bands, only one band was intensive in ovary and mature eggs of the non-diapausing type but weak in those of the diapausing type. That band was named band S. The amounts of S band in ovary arise when excising SG (no DH formed) and decreases when injecting SG extract. They also found the esterase, a kind of enzyme protein which relates closely to utilization of energy in silkworm, such as vitellus protein metabolism, was effected with DH. Using β -naphthyl as the substrate, it was found that esterase had 4 bands, A, B, C and D in ovary and eggs, among which the electrophoresis mobility of esterase A (EA) was the same with the S band mentioned above and its activity and amount in ovary were inhibited by SG and SG extract (Kai & Hasegawa, 1972a). EA activity was very low in the diapausing eggs 20 hrs after oviposition, and would peak at 30 minutes after acid treatment (Kai & Hasegawa, 1972b; Kai & Kawai, 1981a); EA activity also peaked by chilling the diapausing eggs for a definite period at 5°C (Kai & Nishi, 1976; Kai, 1983).

Having done further isoelectric focusing (IEF) on EA, Kai *et al.*, (1981c) found five bands A1~A5 (EA1, EA2, EA3, EA4 and EA5) using C108 silkworm race for investigation and found that EA4 activity peak was very sharp and characteristic. The egg of C108 silkworm race began diapause 2 days after oviposition at 25°C, its EA activity arose suddenly and then declined at once 14 days after being chilled at 5°C, just at the same time there appeared active eggs (Kai *et al.*, 1984). When we purified EA4 from eggs 2 days after oviposition at 25°C and then chilled the esterase-protein *in vitro* at 5°C, the characteristic activity peak also appeared at about fourteenth day of chilling. If we purified EA4 from eggs which had been kept at 5°C 2 days after oviposition and kept on refrigerating the esterase-protein for a few days, the characteristic peak appeared when the total time of chilling both *in vitro* and *in vivo* arrived about 14 days (Kai *et al.*, 1987; 1988a). EA4 activity in the diapausing eggs of C108 race, which have been chilled at 5°C just from the 10th day after oviposition, appeared 40~50 days later, and eggs began to hatch after about 50 days (Kai *et al.*, 1982). Among the chilled eggs (at 5°C) which have been protected for different periods at 25°C after oviposition, the EA4 activity peaking time *in vivo* was very close to the time when the same egg began to hatch. If EA4 activity appeared but did not reach its peak, put the chilling eggs at 25°C, then EA4 activity would decline and eggs would continue their diapause. So egg's hatchability always appears following the appearance of EA4 characteristic activity peak (Kai *et al.*, 1984; 1995a).

The diapause development duration of silkworm eggs has positive correlation with the protecting period of high temperature (25°C) after oviposition (Kai *et al.*, 1995b). Using the eggs treated with hydrochloric acid, Xu *et al.*, (1998a; 1998b; 2000b) showed that the time of EA4 activity peak appearance was also affected with the protecting period at 25°C *in vitro* or *in vivo*. That is to say the above time was delayed with the longer period of EA4 protein at 25°C *in vitro* and *in vivo*. On the

other hand, the above time was moved up with larger artificial hatching stimulus quantity *in vitro* or *in vivo*, but was stabilized when the stimulus was enough to make eggs hatching.

1.3. Molecular structure of esterase A4:

Kai *et al.*, (1986) designed effective method for separation and purification of EA4. These included the preparation of acetone power, heat treatment at 85° C, precipitation with 80% saturated ammonium sulphate, gel filtration through Sephadex G-25 (medium) column, identification with polyacrylamide gel electrophoresis with sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE). The EA4 was eluted later than the void volume and earlier than the ammonium sulphate when the G-25 (medium) column was thrown. Then the EA4 fractions were collected and concentrated with Centricon-10. The concentrated sample was through reverse phase chromatography Sep-Pak C18 and concentrated and separated and was submitted to high pressure chromatofocusing on an YMC-Protein-RP column at last. Xu *et al.*, (1999a) got more than 11 µg EA4 from 10g eggs using the method above and identified it with matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI/MS); it proved that highly purified EA4 protein had been got. EA4 consisted of 155 amino acids residues from His to Tyr and the molecular weight of the protein part is 16 601. There was a glycoside combined with Asn at the N-terminus 22nd, whose molecular weight was about 740, and there was a bond of S-S between the 61st amino acid residues Cys and the 150th Cys (Xu *et al.*, 1999a).

1.4. Bioclock action mechanism of esterase A4:

1.4.1. Activity appearance of EA4 was not due to synthesis and modification of protein :

Amounts of protein had not marked change between the diapausing eggs and non-diapausing eggs just after oviposition. The kinds of protein and RNA synthesis activity have no marked difference between artificial hatching eggs and its control (diapausing eggs) during 10 hours after the treatment (Xu, 1994). Diapause of silkworm could be terminated by hydrochloric acid treatment before fertilization of eggs (Yokoyama *et al.*, 1987). Radioactive labelled amino acid was injected into eggs chilled for different periods; it was found that no great quantity of EA4 was synthesised when the activity arose. So, silkworm eggs activation driving may not depend on the synthesis of EA4 protein. When mixing active EA4 with inactive EA4, there was no phenomenon to show whether they both became active or inactive. Purified EA4 protein had no proteinase activity and EA4 activity still existed when added kinds of proteinase inhibitors. Other more, the electrophoresis mobility of EA4 protein did not change after its activity peaked. The appearance of EA4 activity may not depend on the structure modification of itself (Kai *et al.*, 1987; 1988b).

Normally, EA4 activity arose only one time after chilling a certain time at 5° C. Once EA4 had gone through its cycle of activation, it could no longer be activated by chilling but could only be re-activated by treatment with guanidine-HCl (GuHCl). The GuHCl effect was also observed during the initial activation of the EA4. Thus, EA4 timer was returned to zero point with GuHCl treatment (Kai *et al.*, 1995a). Hydrochloric acid treatment commonly used in sericulture production can terminate the diapause eggs promptly. ATPase activity of EA4 in acid-treated eggs appeared about a few hours after the treatment (Xu *et al.*, 1998a); similar results appeared in the hot water-treated eggs (Xu *et al.*, 1999d). So it was inferred that time message consist in the stereoscopic structure of EA4 protein.

1.4.2. Glycoside does not participate in EA4 biochronometry directly:

It is found by homology search, that EA4 in silkworm had a high accordance with Cu, Zn-SOD (superoxide dismutase) amino acid sequence in ox, human erythrocyte and horse's liver. There were the same Thr amino residues, which in SOD was combined with Cu and Zn and closely with SOD active center, especially the same bonds of S-S between two Cys of 61st and 150th, which connected with stereoscopic structure of the protein. But EA4 was not highly similar with the SOD in N-terminus.

which was peculiar structure of EA4 and was β -fold duplicated stereoscopic structure, which is soft and movable. It suggested that EA4 active center is in such an area mentioned above. Because Glycoside of EA4 was at the N-terminus, and in order to study the function of glycoside, we mixed EA4 and glucoproteinase PNGase for 7 days at 5°C, then incubated them for 1 hour at 25°C to cut N-glycosidic bond, at last got non-glycoside EA4. This EA4 activity peaked at the same time as the complete EA4, instead of being affected by cutting glycoside. So glycoside did not participate in EA4 biochronometry action adjustment directly (Kai, lecture source at Suzhou, 1999).

1. 4. 3. Finding and molecular structure of PIN:

A kind of polypeptide of small molecular weight was found during the purification of EA4, which could effectively inhibit EA4 activity. It was called peptide inhibitory needle (PIN). Isobe *et al.*, (1995) and Kai *et al.*, (1996) prepared the PIN as follows. The precipitation from 80% saturated ammonium sulphate, shown above for purification of EA4, was filtered and separated with Sephadex G-25 (medium) column. The PIN was eluted earlier than EA4 fraction as confirmed with SDS-PAGE. Then the PIN fraction was filtered through Centricon-10. The retentate was diluted with same buffer and filtered through Centricon-10 in order to wash the retentate and to obtain an efficient recovery of PIN. All the filtrates were combined and the combined solution was further filtered through Centricon-3. The retentate was separated with Superdex 75HR10/30 column, and identified with Tricine SDS-PAGE. Then the retentate was further separated with reverse phase column chromatography in Develosil ODS-5 column and in HPLC system. There appeared many peaks within 15~35 min, among them F4 had about 70% PIN activity, and a clear band was found with Tricine SDS-PAGE, whose molecular weight was about 2500. Through further concentrating and analyzing amino acid sequence, it was found that F4 was a kind of peptide mixtures that had several amino acid residues different at the C-terminus and N-terminus, and the molecular weights of every kinds of peptide were determined by HPLC-ESI/MS (ESI/MS). The longest was composed of 38 amino acid residues with its molecular weight 4620, the shortest of 26 amino acid residues with its molecular weight 3 420. Amino acid sequence of the longest was SIFMTKQHSQ DDIIQHPLDY VEQQIHQQKQ KLQKQTLN. The sequence was the same as the amino acid residues of egg special protein (ESP) from 19th to 56th in the whole deduced 559 residues, in which the 1st-18th residues were likely to be a signal peptide and the 57th-58th residues (K-R) were possibly alkaline amino acid (Lys-Arg). These sequences were special recognition and cleavage site of Pro-protein convertase when protein was dissolved (Inagaki, 1989). Thus, it was possible that the resulted peptide after being processed from its precursor protein would be PIN (Isobe *et al.*, 1995).

1. 4. 4. Effect of PIN on EA4 biochronometry:

Xu *et al.*, (1999b) purified EA4 and PIN from silkworm diapause eggs of C108 race 2 days after oviposition. EA4 was first transferred to 5°C for a few days *in vitro*, mixed with PIN, kept at 5°C after PIN was removed with molecular sieve. EA4 activity peaked when the total period was about 14 days in 5°C, which included the period after removing PIN. If the mixture of EA4 and PIN was incubated at 5°C, the low-temperature bio-chronometry of EA4 stopped. Then the appearing time of EA4 activity peak and of egg diapause development changed identically following the change of egg-ages during purification of EA4. The mixture of EA4 and PIN was incubated at 25°C for a few days *in vitro*, kept at 5°C after PIN was removed, then the appearing time of EA4 activity peak was 14 days plus twice the mixing period. This result accorded with the phenomenon that eggs kept in 25°C (EA4 and PIN were together *in vivo*) prolonged the time of diapause development. It showed that EA4 affected the biochronometry on the period of diapause development both *in vitro* and *in vivo*. By using MALDI/MS, the complex of purified EA4 and synthesized PIN was found when they mixed at 25°C, but was not found when mixed at 5°C (Xu *et al.*, 2001). It suggested that PIN could combine with EA4 to inhibit its activity.

1. 4. 5. The relationship between acid treatment and effect of PIN on EA4 biochronometry:

Xu *et al.*, (1999e) incubated the mixture of purified EA4 and PIN for hours *in vitro* at 25°C, treated them with 2.5% hydrochloric acid for 1h at 25° C, then the appearing time of EA4 activity peak was moved up obviously. Further study showed that the time in which hydrochloric acid treatment made eggs EA4 activity peak move up could reflect the time of eggs diapause development. Purified EA4 and synthesized PIN was mixed for 1 d at 25° C, treated with 2.5% hydrochloric acid for 1hr, and determined by MALDI/MS, no complex was found (Xu *et al.*, 2001). It suggested that acid treatment made PIN drop from EA4-PIN complex directly and activated EA4 rapidly.

1. 4. 6. The effect of PIN on non-glycoside EA4 biochronometry:

PIN could inhibit ATPase of complete EA4 but could not affect the activity of non-glycoside EA4. Mixing PIN and complete EA4, the EA4-PIN complex was determined by MALDI/MS and the molecular ratio of EA4 and PIN was 1:1. Dissociation constant of the complex was 460nMol/l determined by immunodetection. It suggested there was a very strong affinity between PIN and EA4 (Kai, lecture source at Suzhou, 1999).

So it was thought that, when PIN was combined with EA4, EA4 biochronometry stopped. When PIN dropped from EA4-PIN, EA4 biochronometry started working, which was setting up zero point. Glycoside was needed in the combination of PIN and EA4. EA4 was named a time interval-measuring enzyme (TIME), a kind of diapause bioclock in silkworm eggs.

2. Study prospect of diapause bioclock of *Bombyx mori*:

2. 1. Biochronometry method of TIME-EA4:

After we knew the mutual effect between glycoside of EA4 and PIN in TIME-EA4 biochronometry system, we also need to make clear the relationship between EA4 N-terminus stereoscopic structure and biochronometry function, and the structure of glycoside and exact mode of the action. Now it was known that TIME-EA4 is setting up zero point and distinguishing mechanism on environmental messages related to the structure of EA4 and PIN and their interaction. Dissociation of the complex of PIN and EA4 related to the recognition mechanism of eggs on environmental messages too, such as low temperature and hydrochloric acid treatment. Further study of the interaction of PIN and EA4 would help to know clearly the recognition mechanism of eggs on environmental messages.

2.2. The relationship between PIN and DH:

PIN is a kind of peptide, whose molecular weight is close to that of diapause hormone (DH), which controls eggs to begin diapause. Xu *et al.*, (2000a) injected primarily purified PIN into silkworm female pupa, which came from the low temperature incubated egg, then the mother moth laid diapause eggs. It suggested that there was DH activity in primarily purified PIN. EA4 activity was inhibited when mixing synthetic DH and purified EA4, so DH had the activity of PIN. Although synthetic PIN and pure purified PIN had no DH activity and the amino acid residue sequence of pure PIN was different from DH, DH might be another kind of PIN. Now what we need to do is to identify the one in silkworm eggs.

2. 3. The relationship between TIME-EA4 and gene promotion:

We studied the interaction between EA4 protein and PIN peptide, but do not know the mechanism of time recognition of embryonic cell of silkworm. From the viewpoint of chronobiology, effect of silkworm diapause bioclock was to recognize environmental messages, promote gene and urge embryonic development. Thus, that to find out the timing mechanism of gene would essentially explain the controlling mechanism of diapause bioclock of silkworm.

REFERENCES

- BRADY J. (1969) How are insect circadian rhythms controlled? *Nature*, 223, 781-784.
- DENLINGER D L. (1985) Hormonal control of diapause. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Eds Kerkut G A & Gillbert LI) 8, 353-412, Pergamon Press, Oxford.
- HASEGAWA K. (1957) The diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Nature*, 179, 1300-1301.
- INAGAKI S. (1989) Complete amino acid sequence of *Bombyx* egg-specific protein from cDNA clone. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 10, 131-139.
- ISOBE M., SUWAN S., KAI H. (1995) Amino acid sequence of PIN peptides conducting TIME (Time Interval Measuring Esterase) activation for resumption of embryonic development in the silkworm, *Bombyx mori*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 5(23), 2851-2854.
- KAI H., HASEGAWA K. (1972a) Electrophoretic protein patterns and esterase zymograms in ovaries and mature eggs of *Bombyx mori* in relation to diapause. *J. Insect Physiol.* 18, 133-142.
- KAI H., HASEGAWA K. (1972b) Studies on the mode of action of the diapause hormone with special reference to the protein metabolism in the silkworm, *Bombyx mori* L. III. Effects of acid-treatment and detergents on "Esterase A" in diapause eggs. *J. Seric. Sci. Jan.* 41(4), 253-262.
- KAI H., NISHI K. (1976) Diapause development in *Bombyx* eggs in relation to "esterase A" activity. *J. Insect Physiol.* 22, 1315-1320.
- KAI H. (1977) The existence of diapause hormone in adult ovaries and mature eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *L. J. Seric. Sci. Jan.* 46(3), 239-245.
- KAI H., KAWAI T. (1981b) Similar action of acid-treatment to long chilling for breaking silkworm diapause in respect esterase A activities in eggs. *J. Seric. Sci. Jan.* 50(4), 373-378.
- KAI H., KAWAI T. (1981a) Diapause hormone in *Bombyx* eggs and adult ovaries. *J. Insect Physiol.* 27, 623-627.
- KAI H., KATO J., NIINO T., KAWAI T. (1981c) Three esterase A members in relation to diapause development in *Bombyx* EGGS. *J. Seric. Sci. Jan.* 50(2), 109-114.
- KAI H., KAWAI T., UMEZU H., ONOUE S. (1982) Esterase A4 activation with respect to diapause development in *Bombyx* eggs. *J. Fac. Agric. Tottori Univ.*, 17, 19-27.
- KAI H. (1983) Attempts to elucidate insect diapause development characterized by the potentiation of physiological development during exposure to low temperature. *J. Seric. Sci. Jan.* 52(4), 283-289.
- KAI H., KAWAI T., KANETO A. (1984) Esterase A4 elevation mechanism in relation to *Bombyx* (Lepidoptera: Bombycidae) egg diapause development. *Appl. Ent. Zool.* 19(1), 8-14.
- KAI H., KAWAI T., KAWAI Y. (1986) Purification of esterase A4 from *Bombyx* eggs. *J. Seric. Sci. Jan.* 55(1) 77-78.
- KAI H., KAWAI T., KAWAI Y. (1987) A time-interval activation of esterase A4 by cold; Relation to the termination of embryonic diapause in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 17, 367-372.
- KAI H., MIAO Y., XU P., KAWAI T. (1988a) A clock-run activation of esterase A4 by cold *in vitro* in cholesterol esterase activity. *J. Seric. Sci. Jan.* 57(5), 335-340.
- KAI H., NAKANO M., HIROHATA Y., KAEAI T. (1988b) The time-measuring steep elevation of esterase A4 activity is caused by a non-cascade mechanism. *J. Fac. Agric. Tottori Univ.* 24, 1-6.
- KAI H., KOTANI Y., MIAO Y., AZUMA M. (1995a) Time interval measuring enzyme for resumption of embryonic development in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 41(10), 905-910.
- KAI H., KAWASHIRI K., NAKASHIMA S., AZUMA M. (1995b) Fixed minimum duration of chilling circle to the termination of diapause and effects of longer chilling on hatching mode in *Bombyx* eggs. *J. Seric. Sci. Jan.* 64(2), 132-141.
- KAI H., KOTANI H., ODA Y. (1996) Presence of PIN factor(s) responsible for the Time-interval activation of esterase A4 in the diapause duration timer of *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jan.* 65(1), 31-38.

- LOHER W., (1974) Circadian control of spermatophore formation in the cricket *Teleogryllus commodus* Walker. *J. Insect Physiol.* 20, 1155-1172.
- SHIMADA J. (1986) Function of the allatum in the induction of diapause eggs in *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jan.* 55(1), 33-40.
- SOKOLOVE P. G., LOHER W. (1975) Role of eyes, optic lobes and pars intercerebralis in locomotory and stridulatory circadian rhythms of *Teleogryllus commodus*. *J. Insect Physiol.* 21, 785-799.
- TRUMAN J. W. (1974) Physiology of insect rhythms. IV Role of the brain in the regulation of flight rhythm of the giant silk moths. *J. Comp. Physiol.* 95, 281-296.
- XU S. Q. (1994) Changes of nucleic acid and protein metabolism in acid-treated eggs. *Acta Sericologica Sinica (China)*, 20(4), 214-219.
- XU S. Q., KAI H., XU J. L., CHEN X. L., SIMA Y. H., SHENG B. P., YU X. H. (1998a) Effect of acid-treatment *in vitro* on ATPase activity of esterase A4. *China Sericulture*, (4), 13-16.
- XU S. Q., KAI H., XU J. L., SIMA Y. H., ZHU J. L., ZE Y. Q., ZHANG Y. G. (1998b) Changes of esterase A4 activity and its relationship with diapause in acid treated eggs of silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Sericologica Sinica (China)*, 24(2), 95-99.
- XU S. Q., KAI H., XU J. L., HIGASI G., TANI N., ZHENG B. P. (1999a) Purification and molecular structure analysis of the time-interval protein esterase A4 from diapausing eggs of silkworm, *Bombyx mori*. *Chinese Biochemistry and Molecular Biology Journal*, 15(2), 241-246.
- XU S. Q., KAI H., XU J. L., ZHENG B. P., CHEN X. L., SIMA Y. H., YU X. H. (1999b) Effects of peptide inhibitory needle (PIN) on the activity of esterase A4 *in vitro*. *Acta Sericologica Sinica (China)*, 25(1), 65-71.
- XU S. Q., KAI H., XU J. L., SIMA Y. H., SHENG B. P., YU X. H. (1999c) Changes of esterase A4-activity and its relationship with acid-treatment after the enzymatic protein treated by PIN. *Acta Sericologica Sinica (China)*, 25(3), 14-153.
- XU S. Q., KAI H., XU J. L., SIMA Y. H., CHEN X. L., ZHENG B. P. (2000a) The relationship between peptide inhibitory needle and diapause hormone in silkworm eggs. *Jiangsu Sericulture (China)*, 22(1), 4-6.
- XU S. Q., KAI H., XU J. L. (1999d) Changes of esterase a4-activity and its relationship with diapause in hot water treated eggs of silkworm, *Bombyx mori*. XVIIIth Congress of ISC, Cairo (Egypt), 12-16 Oct.
- XU S. Q., KAI H., XU J. L., CHEN X. L., SIMA Y. H., ZHENG B. P., YU X. H. (2000b) Effect of acid stimulus-dose on esterase A4-activity and its relationship with activation in acid-treated eggs of silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Sericologica Sinica (China)*, 26(1), 20-26.
- XU S. Q., ZHENG B. P., SIMA Y. Y., KAI H., XU J. L. (2001) Target of hydrochloric acid in acid-treatment of diapause eggs of *Bombyx mori*. *Acta Entomologica Sinica (China)*, 44(1), 51-55.
- YOKOYAMA T., SUGAI E., OSHIKI T. (1987) Effect of acid-treatment on early development of eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jan.* 56(5), 369-373.

PROGRES DE LA RECHERCHE SUR LA PROTEINE DE L'HORLOGE BIOLOGIQUE DE LA DIAPAUSE, L'ESTERASE A4, CHEZ LE VER A SOIE, *BOMBYX MORI*

XU SHI-QING, DAI XUAN-YING, HAN YI-FEI, ZHENG BI-PING & TANG BIN

Biotechnology Lab for Silkworm and Silk, School of Life Science, Soochow University, Suzhou 215006, Chine.

*L'horloge biologique de la diapause de **Bombyx mori** dépend de l'estérase A4 (EA4) pour percevoir des messages comme une faible température, la stimulation par l'acide chlorhydrique et commencer le développement embryonnaire. EA4, qui est constituée de 155 résidus d'acides aminés de His à Tyr est combinée avec un glucoside sur le 22^{ème} site, où se trouve l'asparagine. La fonction de temporisation d'EA4 est liée à sa propre structure et contrôlée par l'aiguille d'inhibition peptidique (PIN). PIN est un type de polypeptide, qui est composé de 38 résidus d'acides aminés de Ser à Asn et dérivé de la protéine spécifique de l'œuf (ESP).*

INTRODUCTION

Le phénomène d'horloge biologique chez l'insecte est présent dans de nombreux processus, tels que la locomotion, la respiration, l'action hormonale, la période de division cellulaire, la nyctinastie aux stimulations externes comme les narcotiques et les pesticides, les variations de la composition chimique de l'hémolymphe, les variations de l'activité enzymatique dans les cellules, etc....

Chez les insectes à rythme circadien comme *Periplaneta americana* et *Teleogryllus commodus* la partie directrice sont les cellules dans la partie ventrale du bord du lobe optique. Le message lumineux est transmis au cerveau par l'œil, et la partie directrice se connecte à la partie active par les cellules neurosécrétrices du cerveau (Brady, 1969 ; Loher, 1974 ; Sokolove & Loher, 1975). Chez d'autres insectes à rythme circadien tels que *Hyalophora decrepit*, le cerveau est la partie directrice de l'horloge biologique. Le cerveau perçoit la lumière avec l'œil et détermine l'heure de déclenchement, induit les nerfs à sécréter l'hormone, qui est distribuée par le système sanguin et entraîne la réaction de toutes les terminaisons nerveuses dans l'abdomen, comme pour l'éclosion et le vol. Mais l'œil peut faire certains ajustements pour contrôler le cerveau (Truman et coll., 1974). Chez certains types d'insectes, il y a d'autres activités vitales périodiques, un autre type d'horloge biologique, qui n'est ni déclenchée par le lobe optique ni par le cerveau. L'étude la plus détaillée dans ce domaine a été faite sur l'horloge biologique de la diapause chez *Bombyx mori*.

1. Progrès sur l'horloge biologique de la diapause chez *Bombyx mori* :

1. 1. Régulation de la diapause chez *Bombyx mori* :

Bombyx mori est un insecte à diapause embryonnaire. Le stimulus environnemental (par exemple la température élevée, beaucoup de lumière) qui commence à partir du stade de l'organogenèse embryonnaire du parent, a un effet sur le ganglion suboesophagien (SG) de la nymphe parent pour sécréter l'hormone de la diapause (DH) et fait que les œufs pondus possèdent le caractère diapausant mais leur entrée en diapause ou non dépend de la température après la ponte (Hasegawa, 1957 ; Kai, 1977 ; Kai & Kawai, 1981b ; Shimada, 1986). Au début du stade de l'embryogenèse, la différenciation

des tissus embryonnaires n'a pas encore commencé et il n'y a ni tissus, ni organes, ni cellules nerveuses pour percevoir la variation de température et pour déclencher l'horloge biologique de la diapause. Ainsi, l'horloge biologique de la diapause chez les œufs de vers à soie s'explique plus probablement et directement aux niveaux génétique et moléculaire.

La diapause est une méthode positive pour le ver à soie et pour d'autres insectes pour survivre dans un environnement défavorable comme par exemple une température faible en hiver. Même si les œufs à diapause sont transférés dans un bon environnement, ils ne peuvent pas terminer leur diapause immédiatement. Pour terminer leur diapause, il faut une température faible pendant une certaine période, puis les œufs peuvent finir leur diapause et commencer leur activation (Denlinger, 1985). Des stimulations comme l'acide chlorhydrique et l'eau chaude différentes de l'action lente de refroidissement peuvent pousser les œufs à diapause à terminer leur diapause en un court laps de temps : ce sont des méthodes d'activation artificielles couramment utilisées dans la production séricicole. La faible température (Kai et coll., 1995b) ou le traitement à l'acide (Xu et coll., 2000b) nécessaires pour activer les œufs à diapause sont corrélés avec le degré de diapause des œufs, c'est à dire que la durée de développement de la diapause et le traitement à l'acide est corrélé positivement avec la période de protection à température élevée (25° C) après la ponte.

1. 2. Relation entre la variation de l'activité de l'estérase A4 et la diapause de l'œuf :

Kai et Hasegawa (1972a) ont trouvé 11 bandes à partir des protéines solubles à l'alcool acide (0,5 % TCA, 90 % d'alcool) dans les ovaires et dans les œufs en utilisant la méthode d'électrophorèse sur gel d'amidon. Parmi ces bandes, seule une bande est intense dans l'ovaire et dans les œufs matures du type non diapausant mais elle est faible chez les œufs diapausants. Cette bande est nommée bande S. Les quantités de bande S dans l'ovaire augmentent quand on retire le SG (pas de formation de DH) et baissent quand on injecte un extrait de SG. Les auteurs ont aussi trouvé que l'estérase, un type d'enzyme qui est étroitement liée à l'utilisation de l'énergie chez le ver à soie, comme pour le métabolisme du vitellus de l'œuf, est affectée par la DH. En utilisant du β -naphthyl comme substrat, on trouve que l'estérase donne 4 bandes, A, B, C et D dans l'ovaire et les œufs, la mobilité électrophorétique de l'estérase A (EA) étant la même que celle de la bande S mentionnée ci-dessus et son activité et sa quantité dans l'ovaire sont inhibées par le SG et l'extrait de SG (Kai & Hasegawa, 1972a). L'activité EA est très faible dans les œufs à diapause 20 heures après la ponte et atteint son sommet 30 minutes après le traitement à l'acide (Kai & Hasegawa, 1972b ; Kai & Kawai, 1981a) : l'activité EA atteint aussi son maximum lorsqu'on refroidit les œufs à diapause pendant une période définie à 5° C (Kai & Nishi, 1976 ; Kai, 1983).

Kai et coll., ont appliqué la focalisation isoélectrique (IEF) sur l'EA (1981c) et trouvé cinq bandes de A1 à A5 (EA1, EA2, EA3, EA4 et EA5) en utilisant la race de ver à soie C108 pour l'étude et ont montré que le pic d'activité de EA4 est très aiguë et caractéristique. L'œuf de la race de ver à soie C108 commence sa diapause 2 jours après la ponte à 25° C, son activité EA augmente soudainement puis baisse brutalement 14 jours après avoir été refroidi à 5° C, juste au moment de l'apparition des œufs activés (Kai et coll., 1984). Quand nous purifions EA4 dans des œufs 2 jours après la ponte à 25° C et que nous réfrigérons l'estérase *in vitro* à 5° C, le pic d'activité caractéristique apparaît aussi le quatorzième jour après la réfrigération. Si nous purifions EA4 à partir des œufs qui ont été conservés à 5° C 2 jours après la ponte et continuons à réfrigérer l'estérase pendant quelques jours le pic caractéristique apparaît quand la durée totale de la réfrigération à la fois *in vitro* et *in vivo* arrive à environ 14 jours (Kai et coll., 1987 ; 1988a). L'activité EA4 dans les œufs à diapause de la race C108, qui ont été réfrigérés à 5° C le 10^{ème} jour après la ponte apparaît 40-50 jours plus tard et les œufs commencent à éclore 50 jours plus tard (Kai et coll., 1982). Parmi les œufs réfrigérés (à 5° C) qui ont été protégés pendant différentes périodes à 25° C après la ponte la période du pic d'activité de EA4 *in vivo* est très proche de la période d'éclosion de ces mêmes œufs. Si l'activité EA4 apparaît mais n'atteint pas son pic, il faut mettre les œufs réfrigérés à 25° C, ainsi l'activité EA4 baisse et les œufs

continuent leur diapause. Donc l'éclosion de l'œuf apparaît toujours après l'apparition du pic d'activité caractéristique de EA4 (Kai et coll., 1984 ; 1995a).

La durée de la diapause des œufs de vers à soie est corrélée positivement avec la durée de protection à température élevée (25° C) après la ponte (Kai et coll., 1995b). En utilisant des œufs traités à l'acide chlorhydrique, Xu et coll., (1998a ; 1998b ; 2000b) ont montré que le moment d'apparition du pic d'activité d'EA4 est modifié par la durée de protection à 25° C *in vitro* ou *in vivo*. C'est à dire que ce moment est retardé par une plus longue durée de maintien de la protéine EA4 à 25° C *in vitro* et *in vivo*. D'autre part, cette durée augmente quand on a recours à une stimulation artificielle plus importante de l'éclosion *in vitro* ou *in vivo* mais est stabilisée quand la stimulation est suffisante pour faire éclore les œufs.

1. 3. Structure moléculaire de l'estérase A4 :

Kai et coll., (1986) ont conçu une méthode efficace pour séparer et purifier l'EA4. Elle inclue la préparation acétonique, le traitement thermique à 85° C, la précipitation avec 80 % de sulfate d'ammonium saturé, la filtration sur gel sur une colonne Sephadex G-25 (moyenne), l'identification par électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec du sulfate de dodécyl de sodium (SDS-PAGE). EA4 est éluée plus tard que le volume mort et plus tôt que le sulfate d'ammonium sur la colonne de Sephadex G-25 (moyenne). Les fractions EA4 sont rassemblées et concentrées avec Centricon-10. L'échantillon concentré est soumis à une chromatographie en phase inverse Sep-Pak C18, concentré et séparé, puis soumis en dernier lieu à une chromatographie à haute pression sur une colonne YMC-Protéine-RP. Xu et coll., (1999a) ont obtenu plus de 11 µg d'EA4 à partir de 10g d'œufs en utilisant cette méthode et l'ont identifié par spectrométrie de masse d'ionisation et de désorption avec laser à matrice assistée (MALDI / MS) ; cela montre que la protéine EA4 obtenue est très purifiée. EA4 est constituée de 155 résidus d'acides aminés de His à Tyr et le poids moléculaire de la partie protéique est de 16 601. Il y a un glucoside combiné avec Asn en 22^{ème} position après le N-terminal, dont le poids moléculaire est d'environ 740 et il y a un lien disulfure entre le 61^{ème} résidu d'acide aminé Cys et le 150^{ème} Cys (Xu et coll., 1999a).

1. 4. Mécanisme d'action d'horloge biologique de l'estérase A4 :

1. 4. 1. L'apparition de l'activité d'EA4 n'est pas due à la synthèse et à la modification de la protéine :

Les quantités de protéine ne changent pas de manière marquée entre les œufs diapausants et les œufs non-diapausants juste après la ponte. Les types de protéines et d'ARN synthétisés ne sont pas différents dans les œufs à éclosion artificielle et les témoins (œufs diapausants) pendant 10 heures après le traitement (Xu, 1994). La diapause du ver à soie pourrait être terminée par le traitement à l'acide chlorhydrique avant la fécondation des œufs (Yokoyama et coll., 1987). Des acides aminés radioactifs ont été injectés dans les œufs réfrigérés à différentes périodes ; il s'avère qu'il n'y a pas de grande quantité d'EA4 synthétisée quand l'activité augmente. Ainsi, le démarrage de l'activation des œufs de vers à soie pourrait ne pas dépendre de la synthèse de la protéine EA4. Quand on mélange de l'EA4 actif avec de l'EA4 inactif, il n'y a pas de phénomène montrant s'ils deviennent tous les deux actifs ou inactifs. La protéine EA4 purifiée n'a pas d'activité protéase et l'activité EA4 existe encore quand on ajoute des types d'inhibiteurs de protéases. De plus, la mobilité électrophorétique de la protéine EA4 ne change pas après que l'activité ait atteint son pic. L'apparition de l'activité EA4 ne dépendrait pas de la modification de sa structure (Kai et coll., 1987 ; 1988b).

Normalement, l'activité EA4 n'augmente qu'une fois après le refroidissement pendant une certaine période à 5° C. Une fois qu'EA4 est passé par son cycle d'activation, elle ne peut plus être activée par le refroidissement mais peut seulement être réactivée par le traitement avec de l'HCl guanidine (GuHCl). L'effet GuHCl est aussi observé pendant l'activation initiale d'EA4. Ainsi, la temporisation d'EA4 est ramenée au point zéro avec le traitement GuHCl (Kai et coll., 1995a). Le traitement à l'acide chlorhydrique couramment utilisé pour la production séricicole peut terminer la

diapause des œufs rapidement. L'activité ATPase d'EA4 dans les œufs traités à l'acide apparaît quelques heures après le traitement (Xu et coll., 1998a) ; des résultats similaires apparaissent chez les œufs traités avec de l'eau chaude (Xu et coll., 1999d). On en déduit que le message temporel est constitué par la structure stéréoscopique de la protéine EA4.

1.4. 2. Le glycoside ne participe pas directement au biochronométrage d'EA4.

On a trouvé par recherche d'homologies que chez le ver à soie, la séquence d'acides aminés de EA4 est très proche de celle de Cu et Zn-SOD (superoxyde dismutase) chez le veau, l'érythrocyte humain et le foie de cheval. Il y a les mêmes résidus d'aminés Thr, qui chez SOD sont combinés avec Cu et Zn et étroitement avec le site actif de SOD et surtout les mêmes liens disulfure entre les deux Cys du 61^{ème} et du 150^{ème} acides aminés, qui sont liés à la structure stéréoscopique de la protéine. Mais EA4 n'est pas très similaire à SOD dans la partie N-terminale, qui dans EA4 est une structure stéréoscopique dupliquée en feuillets β qui est mobile. Cela suggère que le site actif d'EA4 se situe dans la zone mentionnée ci-dessus. Parce que le glucoside d'EA4 est situé dans la partie N-terminale et de manière à étudier la fonction du glucoside, nous avons mélangé EA4 et la glucoprotéinase PNGase pendant 7 jours à 5° C, puis les avons incubés pendant 1 heure à 25° C pour couper le lien n-glycosidique et obtenir en fin de compte l'EA4 non glycosidé. Cette activité EA4 atteint son sommet au même moment que l'EA4 complet, au lieu d'être atteint par la suppression du glucoside. Donc le glucoside ne participe pas directement à l'ajustement de l'action biochronométrique de EA4 (Kai, source de lecture à Suzhou, 1999).

1.4. 3. Structure moléculaire de PIN :

On trouve une sorte de polypeptide de faible poids moléculaire pendant la purification d'EA4, qui peut inhiber efficacement l'activité d'EA4. Il s'appelle aiguille inhibitrice du peptide (PIN). Isobe et coll., (1995) et Kai et coll., (1996) ont préparé PIN comme suit. Le précipité à partir de sulfate d'ammonium saturé à 80 %, obtenu pour la purification d'EA4 est filtré et chromatographié avec une colonne Sephadex G-25 (moyenne). Le PIN est élué plus tôt que la fraction EA4 comme le confirme la SDS-PAGE. Puis la fraction PIN est filtrée par Centricon-10. Le produit retenu est dilué avec le même tampon et filtré par Centricon-10 de manière à laver le produit retenu et pour obtenir une récupération efficace du PIN. Tous les filtrats sont combinés et la solution combinée est à nouveau filtrée avec un Centricon-3. Le produit retenu est séparé avec une colonne Superdex 75HR10/30 et identifié avec une SDS-PAGE Tricine. Puis le produit retenu est à nouveau séparé avec une chromatographie en phase inversée sur une colonne Develosil ODS-5 et dans un système HPLC. De nombreux pics apparaissent en l'espace de 15 à 35 minutes, parmi eux F4 a une activité PIN d'environ 70 % et on trouve une bande nette avec une SDS-PAGE Tricine, dont le poids moléculaire est d'environ 2500. Avec une nouvelle concentration et l'analyse de la séquence en acides aminés, on trouve que F4 est un mélange de peptides qui ont plusieurs résidus d'acides aminés différents en C-terminal et en N terminal et les poids moléculaires des différents types de peptides ont été déterminés par HPLC-ESI/MS (ESI / MS). Le plus long est composé de 38 acides aminés avec un poids moléculaire de 4620, le plus long de 26 résidus d'acides aminés avec un poids moléculaire de 3420. La séquence en acides aminés du plus long est SIFMTKQHSQ DDIIHQHPLDY VEQQIHQQKQ KLOKQTLN. La séquence est la même que celle de la protéine spécifique de l'œuf (ESP) de la 19^{ème} à la 56^{ème} position dans l'ensemble dont 559 résidus sont déduits, dans lesquels les 1^{er} aux 18^{ème} résidus sont susceptibles d'être un peptide signal et les résidus 57^{ème}-58^{ème} (K-R) sont probablement des acides aminés alcalins (Lys-Arg). Ces séquences sont le site de reconnaissance spéciale et de clivage de la Pro-protéine convertase quand la protéine est dissoute (Inagaki, 1989). Ainsi, il est possible que le peptide qui en résulte à partir de la protéine précurseur soit le PIN (Isobe et coll., 1995).

1.4. 4. Effet de PIN sur la biochronométrie d'EA4 :

Xu et coll., (1999b) ont purifié EA4 et PIN dans des œufs de vers à soie à diapause de la race C108 2 jours après la ponte. EA4 est en premier transféré à 5° C pendant quelques jours *in vitro*, mélangé avec PIN, conservé à 5° C après avoir retiré le PIN avec un tamis moléculaire. L'activité EA4 atteint son sommet quand la période totale est d'environ 14 jours à 5° C en incluant la période après avoir retiré PIN. Si le mélange d'EA4 et de PIN est incubé à 5° C, la bio-chronométrie à faible température d'EA4 s'arrête. Puis le moment d'apparition du pic d'activité d'EA4 et du développement de la diapause de l'œuf change de manière identique suite au changement des âges de l'œuf pendant la purification d'EA4. Lorsque le mélange d'EA4 et de PIN est incubé à 25° C pendant quelques jours *in vitro*, conservé à 5° C après que le PIN ait été retiré, la période d'apparition du pic d'activité d'EA4 est de 14 jours plus deux fois la période de mélange. Ce résultat confirme le phénomène selon lequel la conservation des œufs à 25° C (EA4 et PIN sont ensemble *in vivo*) prolonge la durée de développement de la diapause. Cela montre qu'EA4 a un effet sur la biochronométrie de la période du développement de la diapause à la fois *in vitro* et *in vivo*. En utilisant MALDI / MS, on trouve un complexe d'EA4 purifiée et de PIN synthétisé quand ils sont mélangés à 25° C, mais on ne le trouve pas quand on les mélange à 5° C (Xu et coll., 2001). Cela suggère que PIN pourrait se combiner avec EA4 pour inhiber son activité.

1. 4. 5. Relation entre le traitement à l'acide et l'effet de PIN sur la biochronométrie d'EA4 :

Xu et coll., (1999c) ont incubé le mélange d'EA4 purifiée et de PIN pendant des heures *in vitro* à 25° C, les ont traités avec de l'acide chlorhydrique à 2,5 % pendant 1 h à 25° C, alors la période d'apparition du pic d'activité d'EA4 augmente évidemment. Les études supplémentaires montrent que le moment auquel le traitement à l'acide chlorhydrique fait augmenter le pic d'activité d'EA4 correspond au moment de développement de la diapause des œufs. Lorsque l'EA4 purifiée et le PIN synthétisé sont mélangés pendant 1 j à 25° C, traités avec de l'acide chlorhydrique pendant 1 heure et analysés par MALDI / MS, on ne trouve pas de complexe (Xu et coll., 2001). Cela suggère que le traitement à l'acide décroche le PIN du complexe EA4-PIN directement et active EA4 rapidement.

1. 4. 6. Effet de PIN sur la biochronométrie non glucoside d'EA4 :

PIN pourrait inhiber l'ATPase de l'EA4 complète mais ne peut pas avoir d'effet sur l'activité de l'EA4 non-glucoside. En mélangeant PIN et l'EA4 complet, le complexe EA4-PIN déterminé par MALDI / MS montre que le ratio moléculaire d'EA4 et de PIN est de 1 : 1. La constante de dissociation de l'ensemble déterminée par immunodétection est de 460 nMol/l. Cela suggère qu'il y a une affinité très forte entre PIN et EA4 (Kai, conférence à Suzhou, 1999).

On pense donc que quand PIN est combiné avec EA4, la biochronométrie d'EA4 s'arrête. Quand PIN est retiré de EA4-PIN, la biochronométrie d'EA4 commence, et redémarre au point zéro. Le glucoside est nécessaire dans la combinaison de PIN et d'EA4. EA4 est nommé enzyme de mesure de l'intervalle de temps (TIME), une sorte d'horloge biologique de diapause chez les œufs de vers à soie.

2. Perspectives d'études de l'horloge biologique de la diapause chez *Bombyx mori* :

2.1. Méthode de biochronométrie de TIME-EA4 :

Après avoir pris connaissance de l'effet mutuel entre le glucoside d'EA4 et de PIN dans le système de biochronométrie de TIME-EA4, nous avons aussi besoin de clarifier la relation entre la structure stéréoscopique du N-terminal d'EA4 et sa fonction de biochronométrie et la structure du glucoside et le mode d'action. Maintenant, on sait que TIME-EA4 fixe le point zéro et distingue des messages environnementaux liés à la structure d'EA4 et de PIN et leur interaction. La dissociation du complexe PIN et EA4 est aussi liée au mécanisme de reconnaissance par les œufs des messages environnementaux, comme une température basse et le traitement à l'acide chlorhydrique. Une étude

supplémentaire de l'interaction entre PIN et EA4 permettrait de connaître clairement le mécanisme de reconnaissance des messages environnementaux chez les œufs.

2. 2. Relation entre PIN et DH :

PIN est un type de peptide, dont le poids moléculaire est proche de celui de l'hormone de la diapause (DH), qui contrôle le démarrage de la diapause chez les œufs. Xu et coll., (2000a) ont injecté du PIN purifié dans la nymphe femelle du ver à soie, provenant de l'œuf incubé à faible température et le papillon mère a pondu des œufs à diapause. Cela suggère qu'il y a une activité DH dans le PIN purifié en premier. L'activité EA4 est inhibée quand on la mélange avec de la DH synthétique et de l'EA4 purifiée, ainsi DH a une activité PIN. Bien que le PIN synthétique et le PIN purifié n'aient pas d'activité DH et que la séquence d'acides aminés du PIN pur est différent de DH, DH pourrait être un autre type de PIN. Maintenant, ce dont nous avons besoin est d'identifier celui qui se trouve dans les œufs de vers à soie.

2.3. Relation entre TIME-EA4 et la promotion des gènes :

Nous avons étudié l'interaction entre la protéine EA4 et le peptide PIN mais nous ne connaissons pas le mécanisme de reconnaissance temporelle de la cellule embryonnaire du ver à soie. D'après le point de vue de la chronobiologie, l'effet de l'horloge biologique dans la diapause du ver à soie est de reconnaître des messages environnementaux, de promouvoir les gènes et d'activer le développement embryonnaire. Ainsi, si l'on trouvait le mécanisme de temporisation des gènes, cela expliquerait le mécanisme de contrôle de l'horloge biologique de la diapause chez le ver à soie.

EFFECTS OF PYRIPROXYFEN ON THE LARVAL DEVELOPMENT AND SILK PRODUCTION OF *BOMBYX MORI* L. (LEPIDOPTERA: BOMBYCIDAE)

J. E. MIRANDA*, S. A. DE BORTOLI & R. TAKAHASHI

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Rodovia de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, km 5, 14884-900, Jaboticabal, SP, Brazil. e-mail joseemiranda@aol.com

*The administration of juvenile hormone analogues (JHA) in immature insects has been promoting physiological and biological changes. The growth is favoured due to the prolongation of the feeding period. However, excessive doses take to the formation of "dauer larvae", which do not accomplish the pupal metamorphosis. Some of these products can also present deleterious effects in the fecundity. The determination of the physiologic effects of pyriproxyfen on the larval development and the cocoon and silk production of silkworm, *Bombyx mori* L., was the objective of the present study. Pyriproxyfen was topically applied at doses up to 600-pg per insect on the 2nd thoracic segment of the larvae, at 48th hour after the fourth ecdysis. The data were analyzed by GLM procedure (SAS System) using regression analyses. Application of 200-pg pyriproxyfen on silkworm resulted in the largest values of silk gland weight, cocoon weight, shell weight and pupa weight, causing a 24.1% increment in the silk production.*

Keywords: Silkworm, juvenile hormone, silk gland, topical application.

INTRODUCTION

The regulation of arthropod molting involves a complex interaction between hormone of the endocrine system. The prothoracicotropic hormone (PTTH), produced by neurosecretory cells, stimulate the prothoracic glands to secreting a primary product called ecdysone, soon after hydroxylated by several tissues to 20-hydroxyecdysone, which onsets cellular multiplication that precede the molt (King & Siddall, 1969; Chang, 1993). By its side, another endocrine glands situated close to the brain, known as *corpora allata*, secretes juvenile hormone (JH), whose presence assures that when the larva molts it will retain its larval characters and not differentiate into an adult. JH is a remarkable agent that permits growth but prevents maturation. Through regulation of the release of PTTH, molting is controlled through regulation of the release of JH, maturation is controlled (Schneiderman & Gilbert, 1964).

A number of researches have been developed in order to evaluate the influences of the applications of juvenile hormone analogue (JHA) on the physiology of insects. The results have been indicating that the JHA application on silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae), increases their feeding period (Kajiura *et al.*, 1987; Cappellozza *et al.*, 1997), RNA synthesis (Kotikal & Devaiah, 1986), silk gland weight (Kajiura & Yamashita, 1989; Chowdhary *et al.*, 1990), cocoon weight and silk ratio (Chowdhary *et al.*, 1986). However, adverse effects also happen, and excessive doses take to the formation of "dauer larvae", which don't allow the insects to accomplish the pupal

* Author for correspondence.

metamorphosis (Akai *et al.*, 1988; Subba Rao *et al.*, 1988). These studies also have been demonstrating that the current effects of the JHA applications change with the active ingredient, strain (Kobari & Akai, 1979; Gaaboub *et al.*, 1985), dose, method and moment of application (Kotikal & Devaiah, 1986).

From these results, the need for a clear detailed study concerning the most effective administration times and doses applied in the several commercial races. The present study was carried out to determine the effects of topical application of pyriproxyfen at different doses on the development, cocoon production and the fecundity of the silkworm, *B. mori*.

MATERIAL AND METHODS

Bombyx mori eggs (race C115xN108) were acquired from the Fiação de Seda Bratac S.A. (Bastos, SP, Brazil). After hatching, the silkworm larvae were reared in the laboratory of the Setor de Sericicultura of the Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, Campus of Jaboticabal, SP, Brazil, in acclimatized room with controlled conditions of 14 h photoperiod, $26 \pm 2^\circ\text{C}$ temperature and $70 \pm 10\%$ relative humidity. Larvae were fed on mulberry leaves (FM Shima Miura variety), which were supplied *ad libitum* to the insects. At the 48th hour after the first feeding of the fifth instar, the silkworm larvae were topically treated with pyriproxyfen and soon after located in its respective rearing boxes, which dimensions were 18.0x 38.0 x 7.0cm. The product was applied on the second integumental thoracic segment at doses of 0-, 10-, 50-, 100-, 200-, 400-, and 600-pg a.i. pyriproxyfen/insect dissolved in 5- μl ethanol, with the use of a microapplicator model Burkard 900-x (Burkard Manufacturing Inc. Co., England). Control larvae were treated only with ethanol.

The experimental design was the Entirely Randomized Design with 7 treatments (doses) with 50 larvae each, and 4 replicates. The data were analyzed by GLM procedure (SAS System) using regression analyses to verify the tendency of each parameter as influenced by the different doses of pyriproxyfen. When the results allowed, maximum points of the regression curves were obtained through the derivation of the 2nd degree equation.

RESULTS AND DISCUSSION

The length of the 5th instar was prolonged as the growing doses of pyriproxyfen were administered to the silkworm larvae (Table 1, Figure 1a). This physiologic effect caused by the administration of JHA was expected, as verified by several rescarches (Akai *et al.*, 1971, 1973, 1981; Akai & Kobayashi, 1971; Kurata, 1981; Gaaboub *et al.*, 1985; Kajiura *et al.*, 1987; Cappellozza *et al.*, 1997). The highest dose prolonged the 5th instar to approximately 11 days, but occurrence of dauer larvae was not observed. However, when the dose of JHA is very high, the length of the 5th larval instar is quite extended, reaching 20 days with the oral administration of fenoxycarb (Cappellozza *et al.*, 1995) and to 28 days with the topical application of methoprene (Kajiura *et al.*, 1987), losing the insect their ability in spin cocoons and become adult. This phenomenon, so-called non-spinning syndrome (Leonardi *et al.*, 1996), happens due to the persistence of high titer of JHA in the hemolymph of the larvae, inhibiting the prothoracicotrophic hormone and ecdysteroid secretion to induce the metamorphosis process (Ivanovic & Jankovic, 1991).

The weight gain also presented lineal pattern of increment (Table 1, Figure 1b), and the used doses (from 10 to 600-pg/insect) increased between 1.0 and 6.5% the weight gain of treated larvae, in comparison to the non-treated ones (Table 1). Higher doses increased the weight gain of the insects to a maximum point, after which it seems that no matter how much doses are increased, the insects will not answer anymore, on the contrary, a fall in the weight gain can happen due to disturbs on the metabolism process (Novák, 1966).

Table 1. Effects of pyriproxyfen on the silkworm, *B. mori*.Tableau 1. Effets du pyriproxifène sur le ver à soie, *B. mori*.

Dose	Length of 5 th instar (days)	Weight gain	Silk gland	Cocooning	Cocoon	Cocoon shell	Pupae weight	Silk ratio	Fibroin ratio	Adult emergence	Larvae hatching
pg/insect	<i>Durée du 5^{ème} âge (jours)</i>	<i>Gain de poids (g)</i>	<i>Glande séricigène (g)</i>	<i>Coconage (%)</i>	<i>Cocon (g)</i>	<i>Coque soyeuse (g)</i>	<i>Poids de la nymphe (g)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>	<i>Ratio de fibroïne (%)</i>	<i>Emergence adulte (%)</i>	<i>Ecllosion des larves (%)</i>
0	8.81	4.24	1.71	93.21	2.07	0.471	1.50	22.73	69.73	88.57	88.99
10	9.14	4.28	1.90	92.00	2.24	0.520	1.62	23.10	70.03	86.43	89.17
	(+3.75)	(+1.04)	(+10.92)	(-1.30)	(+8.21)	(+10.40)	(+8.10)	(+1.63)	(+0.43)	(-2.42)	(+0.20)
50	9.47	4.33	2.03	90.79	2.35	0.556	1.71	23.37	70.33	84.29	89.11
	(+7.49)	(+2.15)	(+18.53)	(-2.60)	(+13.53)	(+17.94)	(+13.77)	(+2.82)	(+0.86)	(-4.84)	(+0.13)
100	9.80	4.38	2.10	89.57	2.40	0.577	1.75	23.54	70.63	82.14	88.81
	(+11.24)	(+3.25)	(+22.62)	(-3.90)	(+15.94)	(+22.51)	(+16.90)	(+3.56)	(+1.29)	(-7.26)	(-0.20)
200	10.13	4.43	2.11	88.36	2.39	0.585	1.76	23.61	70.93	80.00	88.27
	(+14.98)	(+4.36)	(+23.20)	(-5.21)	(+15.46)	(+24.10)	(+17.50)	(+3.87)	(+1.72)	(-9.68)	(-0.81)
400	10.46	4.47	2.06	87.14	2.32	0.578	1.73	23.58	71.23	77.86	87.49
	(+18.73)	(+5.47)	(+20.28)	(-6.51)	(+12.08)	(+22.72)	(+15.57)	(+3.74)	(+2.15)	(-12.10)	(-1.69)
600	10.79	4.52	1.95	85.93	2.01	0.458	1.57	23.45	71.53	75.71	86.47
	(+22.47)	(+6.58)	(+13.85)	(-7.81)	(-2.90)	(-2.76)	(+4.67)	(+3.17)	(+2.58)	(-14.51)	(-2.83)

Values between parenthesis means increase (+) or decrease (-) in relation to the control (0-pg/insect), in percentage.

Les valeurs entre parenthèses signifient augmentation (+) ou baisse (-) par rapport au témoin (0 - pg / insecte) en pourcentage.

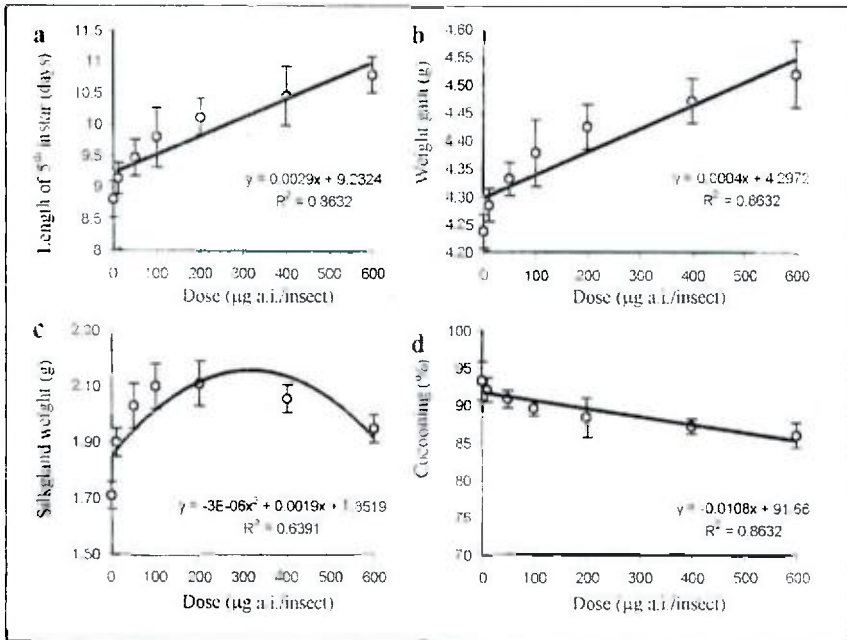


Fig.1. Effect of pyriproxyfen on pre cocoon parameters of the silkworm, *B. mori*. a) length of the 5th instar; b) weight gain; c) silk gland weight; d) cocooning.

Fig. 1. Effet du pyriproxyfène sur les paramètres larvaires du ver à soie, *B. mori* a) durée du 5^{ème} âge ; b) gain de poids ; c) poids de la glande séricigène ; d) coconage.

The regression curve observed for the silk glands showed a tendency of increase on its weight by application of increasing doses until the peak of 2.11-g, which take place with application of 200-pg pyriproxyfen (Figure 1c). The continuation of the increment on the doses promoted a fall tendency after 300-pg, probably due to the toxicant effect of the product, showing that after a dose-limit, the JHA presence becomes deleterious. These results agree with Kajiura & Yamashita (1989), who affirmed that applications of juvenile hormone analogues promote the physiologic action of induction of super growth of silk glands. According to these authors, the growth of the silk glands continues as long as the silk protein synthesis takes place in the cells. Consequently, these products seem to act to maintain synthetic activity of silk protein during the extended time in the end of the 5th larval instar. In fact, the growth of silk glands, one of the target tissue of the juvenile hormone, is inhibited soon after the application of JH, while other organ continues to grow as in the non treated insects. After a second moment, a hypertrophy on the silk glands is observed, so much in size as in the RNA content (Subba Rao *et al.*, 1988). This effect is increased with the dose until a limit, starting from which the JH titer becomes deleterious.

The cocooning rate was negatively affected by application of pyriproxyfen, and so much larger were the doses, smaller were the cocooning rates (Figure 1d). Doses among 10 and 600-pg pyriproxyfen caused reduction in the cocooning rate of the insects between 1.3 and 7.8%, comparatively to the non-treated larvae (Table I). The reduction in the cocooning was also related

with application of fenoxycarb by Cappellozza *et al.* (1997). Although the extended length of 5th instar due to the application of growing doses of pyriproxyfen promoted, even certain limits, gradual increase in the weight gain and silk glands weight, the survival rate declined due to induced metabolic disturbance. According to Novák (1966), several metabolic processes are influenced by the juvenile hormone besides the inhibition of the metamorphosis, as alterations in the histogenesis, protein synthesis, oxygen consumption, nitrogen, purine and enzyme metabolism.

Topical application of pyriproxyfen promoted increases in the silk production until certain dose, after which a fall tendency began in these parameters. The cocoon weight increased gradually with doses up to 200-pg per insect, where it was located the point of maximum inflection of the curve (Figure 2a). After 300-pg, fall in the values was observed. Several researches showed that this prolongation may influence positively the silk production (Akai *et al.*, 1981; Kurata, 1981; Subba Rao *et al.*, 1988). This effect happens because during the extended larval period, the larvae grows more and the silk glands synthesizes more silk, resulting in heavier cocoons than those produced by non treated larvae (Akai *et al.*, 1981; Gaaboub *et al.*, 1985; Sarangi, 1988; Chowdhary *et al.*, 1990). However, it was observed that the cocoon weight is proportional to JHA titer and to extension of the feeding period, fact also verified by Chowdhary *et al.* (1986).

The shell weight tended to increase as long as the doses were increased, until reaching the point of maximum inflection of the curve, corresponding to dose of 200-pg (0.585-g), after 400-pg there

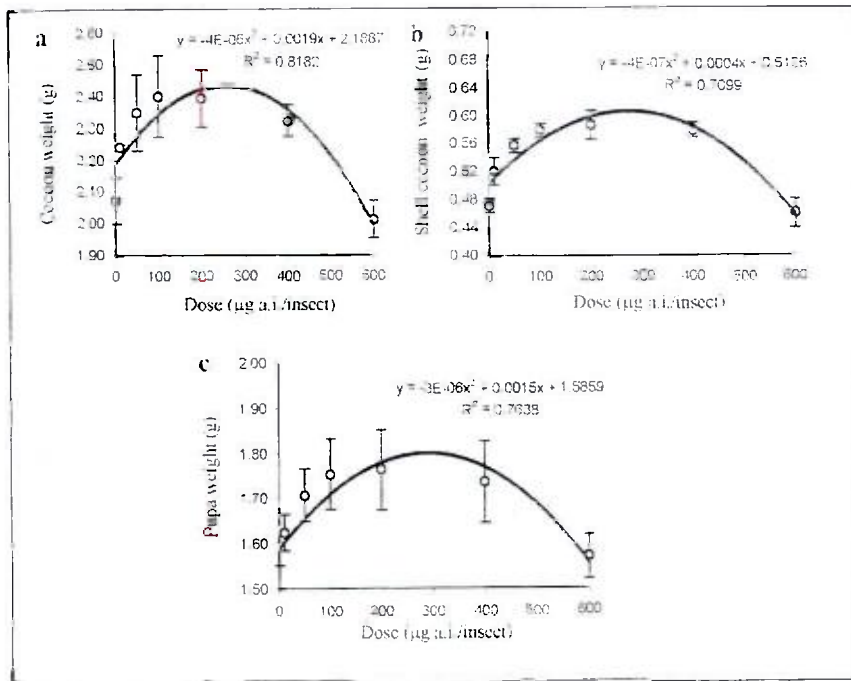


Fig. 2. Effects of pyriproxyfen on cocoon parameters of the silkworm, *B. mori*. a) cocoon weight; b) shell weight; c) pupa weight.

Fig. 2. Effets du pyriproxifène sur les paramètres du cocon de ver à soie, *B. mori*. a) poids du cocon ; b) poids de la coque ; c) poids de la nymphe.

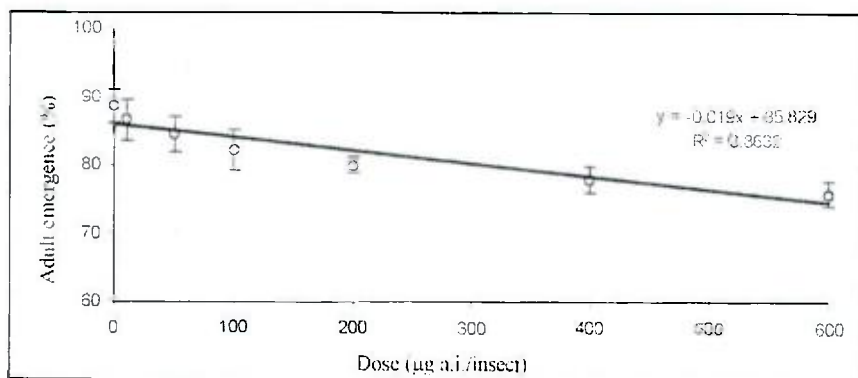


Fig. 3. Effect of pyriproxyfen on the emergence of adults of silkworms, *B. mori*.

Fig. 3. Effet du pyriproxifène sur l'émergence des adultes de vers à soie, *B. mori*.

was a tendency of decline of the values of the parameter (Figure 2b). By application of 200-pg pyriproxyfen a 24.1% increase in shell cocoon weight was obtained (Table I). Magadum & Hooli (1989) registered a 16% increase in this parameter with application of methoprene on silkworms.

The pupa weight was increased with the increment of the doses, reaching the point of maximum inflection of the curve in the dose of 200-pg, with the value of 1.76g (Figure 1c), and doses higher than 300-pg provoked the decline of the curve. The shell ratio did not differ among the treatments, and the values ranged between 22.73 and 23.61% (Table I). In the same way, the fibroin content did not vary significantly among the treatments (Table I), demonstrating that this parameter was not influenced by 0- to 600-pg pyriproxyfen per insect. The increase on the weight gain due to the enlarged period of feeding of treated larvae resulted in increase on silk glands weight, which produced more silk, but also in increase of the pupae weight. Biologically, it can be said that the extra energy accumulated in the larval period was addressed so much with certain proportionality to silk production as to the increase of the insect biomass.

The adult emergency rate in silkworms whose larval phase received pyriproxyfen applications decreased as long as the doses were increased (Figure 3), varying from 88.57 to 75.71% (Table I). The highest dose caused 14.5% reduction on adult emergency rate, comparatively to the control. Ishaaya & Horowitz (1995) affirmed that pyriproxyfen promoted an action of suppression of adult emergence in sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae), fact similar to this verified in the present study. In other species, the JHA effect on the adult emergence is more pronounced, as in the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), in which the adult emergence was completely prevented when ingested poultry food containing 0.05-ppm fenoxycarb (Edwards & Abraham, 1985).

The hatching rate was not affected significantly by the application of the product, and the verified values varied between 89.17 and 96.47%. However, the ovicidal activity of pyriproxyfen observed in *B. tabaci* and the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae) by Ishaaya & Horowitz (1995) was not verified in adult females of silkworm. Besides, application of pyriproxyfen to pupae of tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae), inhibited oviposition but not development of eggs (Hatakoshi, 1992). Hence, it is evident that the effect of pyriproxyfen on the reproductive process vary with the species. Anyway, as these

effects are dose-dependent, it is possible that higher doses should induce such biological effects in silkworms.

In a general way, until a dose-limit a relationship was verified between the topical application of pyriproxyfen on silk production, yet higher concentrations were deleterious to the silk production. Topical application of 200-pg pyriproxyfen showed to be the most interesting dose under the biological and economic point of view, once the treated larvae presented the largest values of silkgland weight, cocoon weight, shell weight and pupa weight. The increment in the silk production by the use of 200-pg pyriproxyfen was more accentuated than the corresponding negative effects in the cocooning rate (5.2%) (Table 1). Besides, 200-pg did not promote significant decline on the adult emergence (9.7% in relation to the control).

The JHA effects on the development and silk production is not identical among silkworm races. Others variations may occur with different JHA products, method and moment of application. The present investigation showed evidences that pyriproxyfen is effective in increasing the silk production, although negative effects also occurs. In addition, more detailed study concerning most effective administration times and methods are under progress in our laboratory before to recommend the use of pyriproxyfen in the sericulture.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are highly indebted to FAPESP for a post-graduate fellowship (Proc. n. 97/13659-6) and for financial support of this work.

REFERENCES

- AKAI H., KIGUCHI K. & MORI K. (1971) Increased accumulation of silk protein accompanies KJH-induced prolongation of larval life in *Bombyx mori* L. Appl. Entomol. Zool. 6:218-220.
- AKAI H., KIGUCHI K. & MORI K. (1973) The influence of juvenile hormone on the growth and metamorphosis of *Bombyx* larvae. Bull. Seric. Exp. Sta. Jpn. 25:287-305.
- AKAI H., KIGUCHI K., KOBARI Y. & SHIBUKAWA A. (1981) Practical utilization of juvenoids for increasing silk production. Scientific Papers of the Inst. Org. Phys. Chem. 22:781-792.
- AKAI H., KOBAYASHI M. (1971) Induction of prolonged larval instar by the juvenile hormone in *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). Appl. Entom. Zool. 6:138-139.
- AKAI H., TAKABAYASHI K & KIUCHI M. (1988) Induction of spinning from JH-treated larvae of *Bombyx mori* by ecdysteroid administration. J. Seric. Sci. Jpn., 57(4):341-344.
- CAPPELLOZZA L., CAPPELLOZZA S. & SBRENNNA G. (1995) Changes in the developmental programme of *Bombyx mori* caused by oral treatment with fenoxycarb during the last larval instar. Sericologia, 35(3):427-436.
- CAPPELLOZZA L., IANNE P. & CAPPELLOZZA S. (1997) Effect of body weight on effectiveness of the insect growth regulator (I. G. R.) fenoxycarb applied to the male and female silkworm (*Bombyx mori*) (Lepidoptera: Bombycidae). Sericologia, 37(3):443-452.
- CHANG, E.S. (1993) Comparative endocrinology of molting and reproduction: Insects and crustaceans. Annu. Rev. Entomol., 38:161-180.
- CHOWDHARY S., RAJU P.S. & OGRA R.K. (1990) Effect of JH analogues on silkworm, *Bombyx mori* L., growth and development of silk gland. Sericologia, 30(2):156-165.
- CHOWDHARY S., SEHNAL F., RAJ S.K., RAJU P.S. & MATHU S. (1986) Giant cocoon formation in *Bombyx mori* L. topically treated with juvenile hormone SJ-42-F. Sericologia, 26(4):455-459.
- EDWARDS J.P. & ABRAHAM L. (1985) Laboratory evaluation of two insect juvenile hormone analogues against *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). J. Stored Prod. Res., 21:189-194.
- FINNEY D. J. 1971. Probit Analysis. Cambridge University Press, Cambridge, England.

- GAABOUB I.A., EL-HELALY M.S. & MOSTAFA S.M. (1985) Food utilization, rate of larval growth, and fecundity of *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) fed mulberry leaves treated with methoprene, triprene, and diflubenzuron. *J. Econ. Entomol.*, 78:1182-1186.
- HATAKOSHI, M. (1992) An inhibitory mechanism over oviposition in the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*, by juvenile hormone analogue pyriproxyfen. *J. Insect Physiol.*, 38:793-801.
- ISHAAYA I. & HOROWITZ A.R. (1995) Pyriproxyfen, a novel insect growth regulator for controlling whiteflies: mechanisms and resistance management. *Pestic. Sci.*, 45:227-232.
- IVANOVIC, J. & JANKOVIC, H. (1991) Hormones and metabolism in insect stress. CRC Press, Boston. 178p.
- KAJIURA Z. & YAMASHITA O. (1989) Super growth of silkglands in the dauer larvae of the silkworm, *Bombyx mori*, induced by a juvenile hormone analogue. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 58(1):39-46.
- KAJIURA Z., KADONO-OKUDA K. & YAMASHITA O. (1987) Induction of dauer larvae by a juvenile hormone analogue and their response to ecdysteroids in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(5):398-406.
- KING D.S. & SIDDALL J. (1969) Conversion of α -ecdysone to β -ecdysone by crustaceans and insects. *Nature*, 221:955-956.
- KOBARI Y. & AKAI H. (1979) On quantitative increase of silk productin by the administration of juvenile hormone (Manta). *J. Seric. Sci. Jpn.*, 48(1):37-42.
- KOTIKAL Y. & DEVAIAH M.C. (1986) Juvenile hormones in sericulture. *Indian Silk*, 25(5):19-20.
- KURATA K. (1981) Effect of application of juvenile hormone analogue on the silk production of silkworm, *Bombyx mori*. *Sericologia*, 21(4), 323-332.
- LEONARDI M.G., CAPPELLOZZA S., IANNE P., CAPPELLOZZA L., PARENTI P. & GIORDANA B. (1996) Effects of the topical application of an insect growth regulator (fenoxycarb) on some physiological parameters in the fifth instar larvae of the silkworm *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 113:361-365.
- MAGADUM S.B. & HOOLI, M.A. (1989) Effect of manta on the cocoon parameters in polyvoltine silkworm, pure Mysore breed of *Bombyx mori*. *Environ. Ecol.*, 7(4):833-837.
- NOVÁK, V.J.A. (1966) *Insect hormones*. 3rd ed. Methuen, London. 478p.
- SARANGI S.K. (1988) Effect of juvenile hormone analogue on the silk gland of the silkworm, *Bombyx mori* L. *Sericologia*, 28(4):553-557.
- SCHNEIDERMAN H.A. & GILBERT L.I. (1964) Control of growth and development in insects. *Science*, 143:325-333.
- SUBBA RAO G., DAS S.K., NANDI S., ROMPOMU R. & SEN S.K. (1988) A study on the effect of a juvenile hormone analogue on the bivoltine silkworm, *B. mori* L. *Sericologia*, 28(4):543-564.

EFFETS DU PYRIPROXYFENE SUR LE DEVELOPPEMENT LARVAIRE ET LA PRODUCTION DE SOIE CHEZ *BOMBYX MORI* L. (LEPIDOPTERA : BOMBYCIDAE)

J. E. MIRANDA* S.A. DE BORTOLI & R. TAKAHASHI

Faculdade de Ciencias Agrarias e Veterinarias, UNESP, Rodovia de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, km 5, 14884-900, Jaboticabal, SP, Brésil. e-mail : josecmiranda@aol.com

*L'administration d'analogues d'hormone juvéniles (JHA) chez les insectes immatures promeut des changements physiologiques et biologiques. L'augmentation de la durée de la période de nourrissage favorise la croissance. Cependant, des doses excessives entrainent la formation de " larves permanentes " qui n'accomplissent pas leur métamorphose nymphale. Certains de ces produits peuvent aussi présenter des effets néfastes pour la fécondité. L'objectif de cette étude est de déterminer les effets physiologiques du pyriproxyfène sur le développement larvaire et la production de cocons et de soie chez le ver à soie, *Bombyx mori* L.. Le pyriproxyfène est appliqué de manière topique à des doses allant jusqu'à 600 pg par insecte sur le 2 me segment thoracique des larves, 48 heures après la quatrième mue. Les données sont analysées avec la procédure GLM (Système SAS) en utilisant les analyses de régression. L'application de 200-pg de pyriproxyfène chez le ver à soie donne les valeurs les plus élevées pour le poids de la glande séricigène, le poids du cocon, le poids de la coque et le poids de la nymphe, et entraine une augmentation de la production de soie de 24,1 %.*

INTRODUCTION

La régulation de la mue chez les arthropodes se fait par une interaction complexe entre les hormones du système endocrinien. L'hormone prothoracicotrope (PTTH), produite par les cellules neuros cr trices, stimule les glandes prothoraciques qui sécrètent un produit primaire appelé ecdysone, qui est peu après hydroxylé par plusieurs tissus et devient de la 20-hydroxyecdysone, qui déclenche la multiplication cellulaire qui précède la mue (King & Siddall, 1969 ; Chang, 1993). D'autres glandes endocrines situées près du cerveau, connues sous le nom de *corpora allata* sécrètent une hormone juvénile (JH), dont la présence assure que quand la larve mue, elle maintiendra ses caractères larvaires et ne se différenciera pas en adulte. JH est un agent remarquable qui permet la croissance mais empêche la maturation. La mue est contrôlée par la régulation de la libération de PTTH, la maturation est contrôlée par la régulation de la libération de la JH (Schneiderman & Gilbert, 1964).

Un certain nombre de recherches ont été réalisées pour évaluer les influences des applications de l'analogue d'hormone juvénile (JHA) sur la physiologie des insectes. Les résultats indiquent que l'application de JHA chez le ver à soie, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombycidae), augmente la durée de la période de nourrissage (Kajiura et coll., 1987 ; Cappellozza et coll., 1997), la synthèse ARN (Kotikal & Devaiah, 1986), le poids de la glande séricigène (Kajiura & Yamashita, 1989 ; Chowdhary et coll., 1990), le poids du cocon et la richesse soyeuse (Chowdhary et coll., 1986). Cependant, des effets nocifs se produisent aussi, et des doses excessives entrainent la formation de

* Auteur auquel la correspondance doit être adressée.

“ larves permanentes ”, ce qui ne permet pas aux insectes d’accomplir leur métamorphose nymphale (Akai et coll., 1988 ; Subba Rao et coll., 1988). Ces études ont aussi démontré que les effets réels des applications de JHA varient en fonction du produit actif, de la souche, (Kobari & Akai, 1979 ; Gaaboub et coll., 1985) de la dose, de la méthode et de la période d’application (Kotikal & Devaiah, 1986).

D’après ces résultats, il semble nécessaire d’entreprendre une étude détaillée et claire concernant les périodes et les doses les plus efficaces d’administration chez plusieurs races commerciales. L’étude actuelle a été réalisée pour déterminer les effets de l’application topique de pyriproxyfène à différentes doses sur le développement, la production de cocons et la fécondité du ver à soie, *B. mori*.

MATERIELS ET METHODES

Les oeufs *Bombyx mori* (race C115 × N108) sont obtenus auprès du Fiação de Seda Bratae S. A. (Bastos, SP, Brésil). Après l’éclosion, les larves de ver à soie sont élevées dans le laboratoire du Setor de Sericicultura de la Faculdade de Ciencias Agrarias e Veterinarias – Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, SP, Brésil dans une pièce climatisée et des conditions contrôlées de 14 h de photopériode, $26 \pm 2^\circ \text{C}$ de température et $70 \pm 10\%$ d’humidité relative. Les larves sont nourries sur des feuilles de mûrier (variété FM Shima, Miura) qui sont fournies *ad libitum* aux insectes. A la 48^{ème} heure après le premier nourrissage du cinquième âge, les larves de vers à soie sont traitées topiquement avec du pyriproxyfène et peu après placées dans leurs boîtes d’élevage respectives, dont les dimensions sont de $18 \times 38 \times 7 \text{ cm}$. Le produit est appliqué sur le tégument du deuxième segment thoracique à des doses de 0-, 10-, 50-, 100-, 200-, 400- et 600 pg de pyriproxyfène / insecte dissous dans 5- μl d’éthanol, avec l’utilisation d’un modèle microapplicateur Burkard 900-x (Burkard Manufacturing Inc. Co., Angleterre). Les larves témoins sont seulement traitées avec de l’éthanol.

La conception expérimentale est une conception aléatoire entière avec 7 traitements (doses) de 50 larves chacun et 4 répétitions. Les données sont analysées par la procédure GLM (Système SAS) en utilisant des analyses de régression pour vérifier la tendance de chaque paramètre en fonction des doses de pyriproxyfène. Quand les résultats le permettent, les points maximums des courbes de régression sont obtenus par la dérivation de l’équation du 2^{ème} degré.

RESULTATS ET DISCUSSION

La durée du 5^{ème} âge augmente quand on administre des doses croissantes de pyriproxyfène aux larves de vers à soie (Tableau I, Figure 1a). Cet effet physiologique dû à l’administration de JHA était prévu, comme l’ont montré plusieurs recherches (Akai et coll., 1971, 1973, 1981, Akai & Kobayashi, 1971 ; Kurata, 1981 ; Gaaboub et coll., 1985 ; Kajiura et coll., 1987 ; Cappelozza et coll., 1997). La dose la plus élevée prolonge le 5^{ème} âge d’environ 11 jours mais on n’observe pas de présence de larves permanentes. Cependant, quand la dose de JHA est très élevée, la durée du 5^{ème} âge larvaire augmente beaucoup, atteignant jusqu’à 20 jours avec l’administration orale de fénoxycarbe (Cappelozza et coll., 1995) et 28 jours avec l’application topique de méthoprene (Kajiura et coll., 1987), ce qui fait perdre aux insectes leur capacité à filer des cocons et à devenir adultes. Ce phénomène, que l’on appelle syndrome de non-filage (Leonardi et coll., 1996), se produit en raison de la présence d’une teneur élevée en JHA dans l’hémolymph des larves, qui inhibe l’hormone prothoracicotrope et la sécrétion d’ecdystéroïde qui induisent le processus de métamorphose (Ivanovic & Jankovic, 1991).

Le poids augmente en suivant un modèle d’augmentation linéaire (Tableau I, Figure 1b) et les doses utilisées (de 10 à 600 pg / insecte) font croître le poids des larves traitées entre 1 et 6,5 % par comparaison aux larves non traitées (Tableau I). Pour les doses plus élevées, le poids des insectes croît jusqu’à un point maximum, après quoi il semble que peu importe les quantités avec lesquelles

les doses sont augmentées, les insectes ne répondront plus, au contraire, il peut se produire une baisse de poids en raison du dérèglement du métabolisme (Novak, 1966).

L'application de doses croissantes jusqu'au pic de 2,11 g, qui a lieu avec l'application de 200 pg de pyriproxifène (Figure 1c) entraîne une tendance à l'augmentation du poids selon la courbe de régression observée pour les glandes séricigènes. La poursuite de l'augmentation des doses entraîne une tendance à la baisse après 300pg, probablement due à l'effet toxique du produit, ce qui montre qu'à partir d'une certaine dose, la présence de JHA devient nocive. Ces résultats confirment ceux de Kajiura & Yamashita (1989), qui ont observé que des applications d'analogues d'hormone juvénile entraînent sur le plan physiologique l'induction d'une croissance importante des glandes séricigènes. Selon ces auteurs, la croissance des glandes séricigènes continue tant que la synthèse des protéines de soie a lieu dans les cellules. En conséquence, ces produits semblent agir en maintenant l'activité synthétique des protéines de soie pendant l'allongement de la durée à la fin du 5^{ème} âge larvaire. En fait, la croissance des glandes séricigènes, un des tissus cible de l'hormone juvénile est inhibée peu après l'application de JH, tandis que les autres continuent à croître comme chez les insectes non traités. Dans un deuxième temps, on observe une hypertrophie des glandes séricigènes, à la fois de la taille et de la teneur en ARN (Subba Rao et coll., 1988). Cet effet augmente avec la dose jusqu'à une limite, à partir de laquelle la teneur en JH devient nocive.

L'application de pyriproxifène a un effet négatif sur le taux de cocons et plus les doses sont importantes, plus les taux de coconage sont faibles (Figure 1c). Les doses entre 10 et 600pg de pyriproxifène entraînent une baisse du taux de coconage chez les insectes entre 1,3 et 7,8 %, comparativement aux larves non traitées (Tableau I). L'application de fénoxycarbe entraîne aussi la baisse de coconage selon Cappelozza et coll., (1997). Bien que l'accroissement de la durée du 5^{ème} âge en raison de l'application de doses croissantes de pyriproxifène entraîne une augmentation progressive du poids et du poids des glandes séricigènes, le taux de survie baisse en raison du dérèglement métabolique induit. Selon Novak (1966), plusieurs processus métaboliques sont influencés par l'hormone juvénile : l'inhibition de la métamorphose, les altérations de l'histogenèse, la synthèse des protéines, la consommation d'oxygène, d'azote, de purine et le métabolisme des enzymes.

L'application topique de pyriproxifène entraîne une augmentation de la production de soie jusqu'à une certaine dose, après laquelle une tendance à la baisse de ces paramètres se produit. Le poids du cocon augmente progressivement avec des doses allant jusqu'à 200 pg par insecte où se situe le point d'inflexion maximum de la courbe (Figure 2a). Après 300 pg, on observe une baisse des valeurs. Plusieurs recherches montrent que cette prolongation peut influencer la production de soie de manière positive (Akai et coll., 1981 ; Kurata, 1981 ; Subba Rao et coll., 1998). Cet effet se produit pendant l'extension de la période larvaire, la larve croît plus et les glandes séricigènes synthétisent plus de soie, ce qui donne des cocons plus lourds que ceux produits par les larves non traitées (Akai et coll., 1981 ; Gaaboub et coll., 1985 ; Sarangi, 1988 ; Chowdhary et coll., 1990). Cependant, nous observons que le poids du cocon est proportionnel à la teneur en JHA et à l'allongement de la période de nourrissage, un fait qu'ont aussi vérifié Chowdhary et coll., (1986).

Le poids de la coque tend aussi à augmenter jusqu'à ce que la courbe atteigne un point d'inflexion maximum, qui correspond à la dose de 200 pg (0,585 g), après 400pg il y a une tendance à la baisse des valeurs du paramètre (Figure 2b). Avec l'application de 200pg de pyriproxifène, on obtient une augmentation de 24,1 %, du poids de la coque soyeuse (Tableau I). Magadam & Hooli (1989) ont enregistré une augmentation de 16 % de ce paramètre avec l'application de méthoprene chez les vers à soie.

Le poids de la nymphe augmente avec les doses, atteignant le point d'inflexion maximum de la courbe avec la dose de 200 pg, soit une valeur de 1,76g (Figure 1c) et les doses supérieures à 300 pg entraînent le déclin. La richesse soyeuse ne diffère pas parmi les traitements et les valeurs sont comprises entre 22,73 et 23,61 % (Tableau I). De la même manière, le taux de fibroïne ne varie pas de manière significative entre les traitements (Tableau I), ce qui prouve que ce paramètre n'est pas

influencé par une dose de 0 à 600 pg de pyriproxyfène par insecte. L'augmentation du poids due à l'accroissement de la période de nourrissage chez les larves traitées entraîne l'augmentation du poids des glandes séricigènes, qui produisent plus de soie mais aussi une augmentation du poids des nymphes. De manière biologique, on peut dire que l'énergie en plus accumulée pendant la période larvaire est utilisée avec une certaine proportionalité tant à la production de soie qu'à l'augmentation de la biomasse de l'insecte.

Le taux d'émergence adulte chez les vers à soie recevant des applications de pyriproxyfène pendant la phase larvaire baisse quand les doses augmentent (Figure 3), variant de 88,57 à 75,71 % (Tableau I). La dose la plus élevée entraîne une baisse de 14,5 % du taux d'émergence adulte, par comparaison au témoin. Ishaaya & Horowitz (1995) ont affirmé que le pyriproxyfène supprime l'émergence adulte chez la mouche blanche de la patate douce, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera : Aleyrodidae), un fait similaire à celui qui est vérifié dans l'étude présente. Chez d'autres espèces, l'effet JHA sur l'émergence adulte est plus prononcé comme chez le ver de la farine, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera : Tenebrionidae), dont l'émergence adulte est complètement empêchée quand ils ingèrent de la nourriture pour volaille contenant 0,05 ppm de fénoxycarbe (Edwards & Abraham, 1985).

Le taux d'éclosion n'est pas touché de manière significative par l'application du produit et les valeurs obtenues varient entre 89,17 et 96,47 %. Cependant, l'activité ovicide du pyriproxyfène observée chez *B. tabaci* et la mouche blanche de la serre, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera : Aleyrodidae) par Ishaaya & Horowitz (1995) n'est pas observée chez les femelles adultes du ver à soie. L'application de pyriproxyfène chez les nymphes du ver du tabac, *Spodoptera litura* (F.) (Lepidoptera : Noctuidae), inhibe la ponte mais n'inhibe pas le développement des œufs (Hatakoshi, 1992). Ainsi, il est évident que l'effet du pyriproxyfène sur le processus reproductif varie selon l'espèce. De toute façon, comme ces effets dépendent des doses, il est possible que des doses plus élevées induisent de tels effets biologiques chez les vers à soie.

D'une manière générale, on vérifie une relation entre l'application topique de pyriproxyfène et la production de soie jusqu'à une dose limite, par contre les concentrations plus élevées sont néfastes pour la production de soie. L'application topique de 200-pg de pyriproxyfène s'avère être la dose la plus intéressante du point de vue biologique et économique, puisque les larves traitées présentent des valeurs plus grandes pour le poids de la glande séricigène, le poids du cocon, le poids de la coque et le poids de la nymphe. L'augmentation de la production de soie avec l'utilisation de 200 pg de pyriproxyfène est plus intéressante que les effets négatifs correspondants du taux de coconage (5,2 %) (Tableau I). De plus, une dose de 200 pg n'entraîne pas un déclin significatif de l'émergence adulte (9,7 % par rapport au témoin).

Les effets de la JHA sur le développement et la production de soie ne sont pas identiques chez les races de vers à soie. D'autres variations, peuvent avoir lieu avec différents produits JHA et une méthode et une période d'application différentes. Cette étude prouve que le pyriproxyfène est efficace pour augmenter la production de soie, bien que des effets négatifs aient aussi lieu. Nous sommes en train de réaliser une étude plus détaillée sur les périodes et les méthodes d'administration plus efficaces dans notre laboratoire avant que nous puissions recommander l'utilisation du pyriproxyfène en sériciculture.

INTERACTION BETWEEN SOME BIOCONTROL AGENTS AND MULBERRY ROOT ROT PATHOGEN *FUSARIUM* *SOLANI* AND *F. OXYSPORUM*

TOMY PHILIP*, D. D. SHARMA & GOVINDAIAH

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

The interaction of thirteen biocontrol agents, including nine *Trichoderma* isolates at physical and secondary metabolite level against mulberry root rot pathogens, *Fusarium solani* and *F. oxysporum* was investigated. Except *T. viride* (TV-1) all other biocontrol agents inhibited the radial growth of either or both of the pathogens significantly. The biocontrol agents were more effective against *F. oxysporum* than *F. solani*. The highest inhibition at physical level was observed with *Laetisaria arvalis*, *T. harzianum* (TH-1) and *Aspergillus niger*. However, when secondary metabolite (culture filtrate) was used, only *T. harzianum* (TH-1) and *A. niger* have shown the same level of inhibition as at physical interaction level. These two were almost equally effective to suppress the radial growth of both the pathogens.

Keywords: Biocontrol agents, mulberry root rot, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*.

INTRODUCTION

Root rot disease of mulberry has been a major problem for mulberry cultivation in all sericultural countries like Japan, China, Russia and Thailand (Aoki and Matsuo, 1959; Kakuliya and Gogeliya, 1970; Aoki, 1971). In India, the damage caused by the disease has been of less significance. However, a survey revealed its existence in all southern states of India. The incidence varied from place to place with an overall average incidence of 14 per cent. Large scale mortality of plants was observed in Kerala state, Anantapur, Chamarajanagar, Salem and Nagercoil regions. *Fusarium solani* and *F. oxysporum* were identified as the causal organisms of root rot in India (Philip *et al.*, 1995). Preliminary studies have found that root-dipping of saplings in 0.1% Bavistin (Carbendazim 50% WP) solution for half an hour and planting in pits dusted with 5-10 g of Indofil M-45 (Mancozeb 75% WP) was very effective to control the disease. However, as the treatment involves the use of two fungicides, the cost works out to be high, besides having all the disadvantages of continuous use of them. Therefore, there is a need to find an effective alternative to fungicides. During the last two decades, development of biocontrol agents, and their integration in disease management programme gained much importance (Papavizas, 1985; Lifshitz *et al.*, 1986; Chet, 1987; Sen *et al.*, 1993). Hence, trials have been conducted to screen some antagonistic soil microbes to identify potential ones, which can be used as a bioformulation, and an alternative to chemical control of mulberry root rot disease caused by *F. solani* and *F. oxysporum*.

* Present address: CSRTI, REC, Angamali, (Kerala), India.

MATERIALS AND METHODS

Isolation, identification and pathogenicity of causal agents:

The mulberry root rot pathogens, *F. solani* and *F. oxysporum* were isolated from the infected plants of Kanva-2 variety collected from Anantapur (Andhra Pradesh) – India and Shertalai, Alleppey district (Kerala) – India, respectively. The infected tissues were cut into small fragments, surface sterilized in 0.1% mercuric chloride solution for thirty seconds, washed in sterile distilled water and plated on Potato Dextrose Agar (PDA) and Czapek's Dox Agar (CDA) medium separately. The plates were incubated at $28 \pm 2^\circ \text{C}$. Fungi growing around the bits were aseptically transferred to CDA slants. This isolate was further purified by monohyphal tip method (Rangaswami and Mahadevan, 1999). The pure cultures were suitably maintained on CDA slants with periodic sub-culturing. They were mass multiplied on sand-maize media and inoculated to four months old K-2 saplings at the rate of 50 g / pot to test their pathogenicity.

Isolation of biocontrol agents from soil:

Isolates of *T. harzianum* (TH-1 & TH-2), *T. viride* (TV-3) and *Aspergillus niger* were isolated from soils of mulberry fields at Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India. Soil samples were collected from the rhizosphere of both top and sub soil separately, mixed thoroughly to form a single composite sample and then taken for isolation of *Trichoderma* and *Aspergillus* on PDA medium following the soil dilution plate technique (Waksman, 1927). Rest of the isolates were collected from Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, Tamil Nadu and Indian Agricultural Research Institute, New Delhi (Table I) – India. Pure cultures of all the biocontrol agents were maintained on PDA medium.

Vegetative interaction between biocontrol agents and pathogens:

The antagonistic potentiality of various species and isolates of biocontrol agents was tested against *F. solani* and *F. oxysporum* on CDA medium by the agar plug method (Takahashi *et al.*, 1979). Media seeded with the pathogens were taken in 100 mm diameter Petri plates. A 4 mm diameter disc of each biocontrol agent earlier grown on PDA was cut with the help of a sterilized cork borer and placed at the center of the plates and was incubated at $28 \pm 2^\circ \text{C}$. Each treatment was replicated thrice. The inhibition zones produced by various biocontrol agents were measured on 7th day. Data were subjected to Duncan's Multiple Range Test (DMRT) and Analysis of Variance (ANOVA).

Effect of metabolites (culture filtrates) of biocontrol agents on test pathogens:

The biocontrol agents were grown on PDA medium for 5 days, after which two plugs of 4 mm diameter were taken from the periphery of each isolate and transferred into 100 ml sterilized lukewarm PDB (pH 4.5) in 250 ml Erlenmeyer flask. The broth inoculated with biocontrol agents and the control (plain broth solution) was incubated for 15 days at room temperature. On the 15th day, metabolites were harvested by filtering through sterilized Whatman filter paper No. 1 and by centrifuging at 3000 rpm for 30 minutes. The supernatant was collected separately in sterilized bottles and sealed. Broth colours (pigmentation), pH and the biomass (mycelial dry weight) of all the biocontrol agents were determined at harvest (Table III). The supernatant were mixed separately with CDA medium to obtain 10 and 20 per cent concentrations. The media thus amended with the metabolites were taken in 100 mm diameter Petri plates. Media without metabolites were used as control. At the center of the plates a 4 mm diameter plug of the pathogens was kept. Each treatment was replicated thrice. The plates were incubated at $28 \pm 2^\circ \text{C}$. On 7th day, the radial growth of the mycelium of the test pathogens as influenced by the metabolites was measured and compared with the growth of the pathogens in control. The percentage inhibition of pathogen growth by the biocontrol agents was calculated by the formula of Vincent (1947).

RESULTS

Identification and pathogenicity of pathogens:

Based on morphological and cultural characters, the pathogens were identified as *Fusarium solani* and *F. oxysporum* as confirmed by Dr P. Vidhyasekharan, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, India and by IMI, London (IMI Nos. 358650, 51 and 52). On potted saplings both *F. solani* and *F. oxysporum* produced symptoms of root rot within three months. Most of the primary and secondary roots were rotted by that time and the same fungi were reisolated from the rotted roots, thus fulfilling the Koch's postulates.

Vegetative interaction of biocontrol agents and pathogens:

Thirteen biocontrol agents of different genera and isolates as evidenced by the formation of inhibition zone against test fungi *F. solani* and *F. oxysporum* differed in their antagonistic action, not only between the species but also between the isolates of the same species (Table I). Among all the isolates tested, *L. arvalis*, *T. harzianum* (TH-1) and *A. niger* were the most effective against both the pathogens. *L. arvalis* produced very sharp and clear inhibition zone of 35.6 and 36.8 mm against *F. solani* and *F. oxysporum*, respectively. *T. harzianum* (TH-1) produced inhibition zones of 31.6 and 28.2 mm, respectively against *F. solani* and *F. oxysporum* while *A. niger* inhibited the growth of the pathogens by showing very clear and sharp inhibition zone measuring 23.6 and 38 mm diameter, respectively. The difference in the inhibition between *F. solani* and *F. oxysporum* by the above three antagonists was statistically significant. *T. viride* (TV-3), *T. hamatum*, *T. pseudokoningii*, *T. longibrachiatum* and *G. virens* (GV-2) were completely ineffective against *F. solani* and *G. virens* (GV-1) against *F. oxysporum* while *T. viride* (TV-1) was completely ineffective against both the pathogens.

Effect of metabolites (culture filtrates) of biocontrol agents on test pathogens:

The inhibition of pathogens by metabolites of various biocontrol agents varied from isolate to isolate (Table II). In the experiment where non autoclaved culture filtrates of the biocontrol agents were used, the maximum inhibition in the mycelial growth of both the pathogens were recorded in media amended with 20 per cent metabolites as compared to 10 per cent. Among all the biocontrol agents, medium amended with 20 per cent metabolites of *A. niger* gave highest inhibition against *F. solani* and *F. oxysporum* by 76.00 and 87.42 per cent, respectively followed by 66.31 and 44.37 per cent in case of *T. harzianum* (TH-1) and *T. hamatum*, respectively against *F. solani* while in case of *F. oxysporum*, the inhibition was 68.02 and 63.17 per cent, respectively. The rest of the biocontrol agents showed moderate to poor inhibition against both the pathogens. Most of the *Trichoderma* species and isolates were found more effective against *F. oxysporum* than *F. solani*. In general, the most biologically active agents were *T. harzianum* (TH-1) and *A. niger*. Most of the biocontrol agents produced pigments in the broth and also increased the pH of broth (Table III).

DISCUSSION

All the biocontrol agents except *T. viride* (TV-1) showed varying degrees of antagonisms against the test pathogens. The antagonistic effect varies from isolate to isolate even within a species. This type of variability in effect of antagonism among the isolates having very similar cultural morphological characters has been reported by various workers (Kamayshko, 1961; Dennis and Webster, 1971; Chet, 1987; OnSando and Waudu, 1994). This variation could be attributed to the taxonomy of *Trichoderma* which is exclusively based on its morphology (Rifai, 1969). This indicates that for an effective disease management, it is necessary to screen different isolates of the same species of antagonists to suit various ecological conditions.

Table I. Vegetative interaction between biocontrol agents and root rot pathogens.

Tableau I. Interaction végétative entre les agents de lutte biologique et les pathogènes du pourrissement de la racine.

Biocontrol agent	Source	Inhibition zone in mm (diameter)*	
		<i>F. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>
Agent de lutte biologique		Zone d'inhibition en mm (diamètre)*	
		<i>F. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>
<i>Trichoderma harzianum</i> (TH-1)	CSRTI, Mysore	31.6	28.2 ^{abc}
<i>T. harzianum</i> (TH-2)	CSRTI, Mysore	14.1 ^a	31.2 ^{abc}
<i>T. viride</i> (TV-1)	TNAU, Coimbatore	00.0 ^b	00.0 ^f
<i>T. viride</i> (TV-2)	IARI, New Delhi	13.0 ^a	14.5 ^{dc}
<i>T. viride</i> (TV-3)	CSRTI, Mysore	00.0 ^b	35.3 ^{ab}
<i>T. hamatum</i>	TNAU, Coimbatore	00.0 ^b	11.6 ^e
<i>T. koningii</i>	TNAU, Coimbatore	19.1	24.2 ^{bcd}
<i>T. pseudokoningii</i>	CSRTI, Mysore	00.0 ^b	12.6 ^{cde}
<i>T. longibrachiatum</i>	TNAU, Coimbatore	00.0 ^b	20.2 ^{cde}
<i>Gliocladium virens</i> (GV-1)	TNAU, Coimbatore	7.6	00.0 ^f
<i>G. virens</i> (GV-2)	IARI, New Delhi	00.0 ^b	10.9 ^{ef}
<i>Laetisaria arvalis</i>	TNAU, Coimbatore	35.6	36.8 ^a
<i>Aspergillus niger</i>	CSRTI, Mysore	23.6	38.0 ^a
CD at 5%		2.973	10.618

Within columns values followed by the same letter are not significantly different from each other ($P = 0.05$) according to Duncan's multiple range test. Biocontrol agent which does not follow any letters differs significantly from each other. / Dans les colonnes, les valeurs suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes l'une de l'autre ($P = 0.05$) selon le test de Duncan. L'agent de lutte biologique non suivi par des lettres diffère de manière très significative de chacun des autres.

* Average of 3 replications / Moyenne de 3 répétitions.

Table II. Effect of metabolites of biocontrol agents on root rot pathogens.

Tableau II. Effet des métabolites des agents de lutte biologique sur les pathogènes du pourrissement de la racine.

Biocontrol agent	<i>F. solani</i>				<i>F. oxysporum</i>			
	10% concentration		20% concentration		10% concentration		20% concentration	
	Radial growth (mm)	Reduction (%)	Radial growth (mm)	Reduction (%)	Radial growth (mm)	Reduction (%)	Radial growth (mm)	Reduction (%)
Agent de lutte biologique	<i>F. solani</i>				<i>F. oxysporum</i>			
	Concentration à 10 %		Concentration à 20 %		Concentration à 10 %		Concentration à 20 %	
	Croissance radiaire (mm)	Réduction (%)	Croissance radiaire (mm)	Réduction (%)	Croissance radiaire (mm)	Réduction (%)	Croissance radiaire (mm)	Réduction (%)
<i>Trichoderma harzianum</i> (TH-1)	37.00	53.15	26.60	66.31	28.80	60.65	24.30	68.02
<i>T. harzianum</i> (TH-2)	67.88	14.07	59.32	24.91	69.55	8.48	45.55	40.06
<i>T. viride</i> (TV-1)	65.55	17.02	58.00	26.53	59.10	22.23	42.22	44.44
<i>T. viride</i> (TV-2)	69.44	12.10	62.77	20.54	66.66	12.23	53.99	28.95
<i>T. viride</i> (TV-3)	69.80	11.64	64.50	18.35	60.00	21.05	55.50	26.97
<i>T. hamatum</i>	47.93	39.32	43.90	44.37	35.76	52.94	27.99	63.17
<i>T. koningii</i>	73.00	7.59	62.17	21.30	73.73	2.98	54.75	27.96
<i>T. pseudokoningii</i>	66.66	15.62	49.55	37.27	62.22	18.13	43.32	43.00
<i>T. longibrachiatum</i>	53.11	30.24	49.33	37.55	58.32	23.25	51.10	32.76
<i>Gliocladium virens</i> (GV-1)	60.33	23.63	57.66	27.01	47.76	37.15	60.06	20.97
<i>G. virens</i> (GV-2)	70.61	10.62	63.43	19.08	48.53	36.14	36.53	51.93
<i>Laetisaria arvalis</i>	62.00	21.51	58.00	26.58	63.00	17.10	60.00	21.05
<i>Aspergillus niger</i>	25.15	68.16	18.78	76.22	14.20	81.31	9.56	87.42
Control / Témoin	79.00	-	79.00	-	76.00	-	76.00	-
CD at 5 %	11.90	-	9.25	-	14.85	-	14.80	-

Table III. Parameters taken at harvest of biocontrol agent.

Tableau III. Paramètres mesurés à la récolte de l'agent de lutte biologique.

Biocontrol agent	Broth pH	Biomass (dry weight) (g)	Pigmentation
<i>Agent de lutte biologique</i>	<i>pH du bouillon</i>	<i>Biomasse (poids sec) (g)</i>	
<i>Trichoderma harzianum</i> (TH-1)	4.9	0.111	Light brownish yellow / Marron jaune clair
<i>T. harzianum</i> (TH-2)	7.3	0.063	Light brown / Marron clair
<i>T. viride</i> (TV-1)	4.6	0.141	Greenish yellow / Jaune vert
<i>T. viride</i> (TV-2)	6.7	0.249	Golden yellow / Jaune doré
<i>T. viride</i> (TV-3)	4.9	0.108	Yellowish brown / Marron jaune
<i>T. hamatum</i>	4.7	0.075	Nil / Nul
<i>T. koningii</i>	5.5	0.094	Golden yellow / Jaune doré
<i>T. pseudokoningii</i>	5.2	0.111	Nil / Nul
<i>T. longibrachiatum</i>	4.6	0.104	Nil / Nul
<i>Glocladium virens</i> (GV-1)	5.2	0.106	Nil / Nul
<i>G. virens</i> (GV-2)	5.5	0.055	Brownish yellow / Jaune marron
<i>Laetisaria arvalis</i>	5.5	0.240	Brownish yellow / Jaune marron
<i>Aspergillus niger</i>	4.8	0.204	Golden yellow / Jaune doré

L. arvalis, *T. harzianum* (TH-1 & TH-2), *T. koningii* and *A. niger* have shown good antagonisms against both the test pathogens by suppressing their radial mycelial growth. However, the metabolites of only *T. harzianum* (TH-1) and *A. niger* are equally effective, though many other antagonists have also shown moderate antagonism as both physical and metabolite interaction levels. This indicates that the inhibition of radial mycelial growth by these two antagonists at vegetative interaction level was not merely a physical phenomenon. On the other hand, *T. hamatum* inhibits the growth of the test pathogens through metabolic interaction only. It seems that *T. hamatum* does not possess hyperparasitisms against root rot pathogens.

It has been reported that *Trichoderma* produces toxic metabolites such as lytic enzymes, chitinase, glucanase, harziadinole, sequiterpene etc. which kill many pathogenic soil fungi (Lifshitz *et al.*, 1986; Sivan and Chet, 1989). The toxic metabolites may act as a predisposing factor(s) on the host fungus, with simultaneous disorganisation by lytic enzymes (Papavizas, 1985). It is known that *A.*

niger produce mycotoxins such as aflatoxins (Kulik and Holadays, 1967) which have inhibitory effect on many pathogens (Sen *et al.*, 1993).

Thus, the present study indicates that *L. arvalis*, *T. harzianum* (TH-1), *T. koningii* and *A. niger* can be used as potential biocontrol agents against *F. solani* and *F. oxysporum*. Further, *T. harzianum* (TH-1) and *A. niger* which have exhibited good antagonism against both pathogens at vegetative interaction level as well as at metabolite level appear to be the most promising biocontrol agents for mulberry root rot disease. Hence, efforts to enhance the growth of these biocontrol agents, especially *Trichoderma* species in the mulberry rhizosphere could be the first step towards biological control of the disease. The formulation of these biocontrol agents in the form of a bioformulation will be ecologically safe and can reduce the cost involved in chemical control of root rot disease of mulberry.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr R. K. Datta, Director, Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore for providing facilities, Prof. V. Vidhyasekharan, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore for identification of pathogens and supply of some of the biocontrol agents and Dr Brayford, International Mycological Institute, London for confirmation of identification of the pathogens. Thanks are also due to Ms M. Rekha, Senior Research Officer, CSRTI, Mysore for statistical analysis.

REFERENCES

- AOKI K. (1971) On the root rot of mulberry in Thailand. Bull. Thai Seri. Cent., 1: 13-17.
- AOKI T., MATSU O. (1959) Studies on root rot of the mulberry trees caused by *Helicobasidium mompa* and *Rosellinia necatrix*. J. Seric. Sci. Japan, 28: 120-129.
- CHET I. (19887) *Trichoderma* – application, mode of action and potential as a biocontrol agent of soil borne plant pathogenic fungi. In: Innovative Approaches to Plant Disease Control (Ed., Chet, I). Wiley-Interscience, New York, pp. 137-160.
- DENNIS C., WEBSTER J. (1971) Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* – III. Hyphal interaction. Trans. Brit. Mycol. Soc., 57: 363-369.
- KAKULIYA M. A., GOGELIYA I. F. (1970) A study of the resistance to root rot of ungrafted material from different mulberry varieties. Trudy Gruzinskogo Sel'sko Khozyaistvennogo instituta, 76-77: 271-282.
- KAMAYSHKO O. P. (1961) Interspecific variation of the genus *Trichoderma lignorum* (Tode) Harz. Botanichnyi Zhurnal, 46: 646-650.
- KULIK M. M., HOLADAY C. E. (1967) Aflatoxin: A metabolic product of fungi. Mycopathologia et Mycologia Applicata, 30: 137-140.
- LIFSHITZ R., WINDHAM M. T., BAKERR R. (1986) Mechanism of biological control of pre-emergence damping off a pea by seed treatment with *Trichoderma* spp. Phytopathology, 76: 720-725.
- ONSANDO J. M., WAUDO S. W. (1994) Interaction between *Trichoderma* species and *Armillaria* root rot fungus of tea in Kenya. Int. J. Pest Management, 40: 69-74.
- PAPAVIZAS G. C. (1985) *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. Ann. Rev. Phytopathology, 23, 23-54.
- PHILIP T., LATHA J., GOVINDAIAH, MALLIKARJUNA B., MONDAL K. C., BAJPAI A. K. (1995) Some observations on the incidence, associated microflora and control of root rot disease of mulberry in South India. Indian J. Seric., 34: 137-139.
- RANGASWAMI G., MAHADEVAN A. (1999) Diseases of crop plants in India. Prentice Hall of India, Private Limited, New Delhi. pp. 64-65.
- RIFAI M. A. (1969) A revision of the genus *Trichoderma*. Mycological papers, 116: 1-56.
- SEN B., SHARMA J., ASLMOL M. N., CHATTOPADHYAY C., PATIBANDA A. K., (1993) *Aspergillus niger* – A potential biocontrol agent for soil-borne plant pathogens. Indian Phytopathol., 46:275.

- SIVAN A., CHET I. (1989) The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. *Phytopathology*, 79, 198-200.
- TAKAHASHI S., YUAKOYOSHID A., SHOICHIAMAN O., MICHIC. K. SHIGEHARU I., TARO N. (1979) Studies on actinomycetales producing antibiotics only on agar culture (1). Screening, taxonomy and morphology productivity relationship of *Streptomyces halstedii*. *J. Antibiotics*, 32: 427-436.
- VINCENT J. M. (1947) Distortion of fungal hyphae in presence of certain inhibitors. *Nature*, 96: 596.
- WAKSMAN S. (1927) Principles of soil microbiology. Baltimore Williams and Wilkins, USA, p. 34.

INTERACTION ENTRE DES AGENTS DE LUTTE BIOLOGIQUE ET LES PATHOGENES DU POURRISSEMENT DE LA RACINE DE MURIER *FUSARIUM SOLANI* ET *F. OXYSPORUM*

TOMY PHILIP*, D. D. SHARMA & GOVINDAIAH

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

Nous avons étudié l'interaction de treize agents de lutte biologique, y compris neuf isolats de *Trichoderma* au niveau physique et métabolite secondaires contre les pathogènes du pourrissement de la racine, *Fusarium solani* et *F. oxysporum*. A l'exception de *T. viride* (TV-1) tous les agents de lutte biologique inhibent la croissance radiaire de l'un ou des deux pathogènes de manière significative. Les agents de lutte biologique sont plus efficaces contre *F. oxysporum* que contre *F. solani*. L'inhibition la plus élevée au niveau physique est observée avec *Laetisaria arvalis*, *T. harzianum* (TH-1) et *Aspergillus niger*. Cependant, quand le métabolite secondaire (filtrat de culture) est utilisé, seuls *T. harzianum* (TH-1) et *A. niger* présentent le même niveau d'inhibition qu'au niveau d'interaction physique. Ils sont tous les deux presque aussi efficaces pour supprimer la croissance radiaire des deux pathogènes.

INTRODUCTION

La maladie du pourrissement de la racine de mûrier est un problème majeur pour la culture du mûrier dans tous les pays séricicoles comme le Japon, la Chine, la Russie et la Thaïlande (Aoki et Matsu, 1959 ; Kakuliya et Gogeliya, 1970 ; Aoki, 1971). En Inde, les dégâts provoqués par la maladie sont moins importants. Cependant, une étude révèle son existence dans tous les états du sud de l'Inde. L'incidence varie d'un endroit à l'autre avec une incidence moyenne générale de 14 pour cent. On a observé une mortalité à grande échelle sur des plants dans l'Etat du Kérala, dans les régions d'Anantapur, de Chamarajanagar, de Salem et de Nagercoil. *Fusarium solani* et *F. oxysporum* ont été identifiés comme les organismes responsables du pourrissement de la racine en Inde (Philip et coll., 1995). Des études précédentes ont montré qu'on peut lutter de manière très efficace contre la maladie en plongeant les racines de jeunes plants dans une solution de Bavistin à 0.1 % (Carbendazim 50 % WP) pendant une demi-heure et en les plantant dans des trous saupoudrés avec 5 à 10 g d'Indofil M-45 (Mancozeb 75 % WP). Cependant, comme le traitement implique l'utilisation de deux fongicides, le coût s'avère élevé et de plus il a l'inconvénient d'avoir à être utilisé continuellement. Il faut donc trouver une alternative efficace aux fongicides. Au cours des deux dernières décennies, la mise au point d'agents de lutte biologique et leur intégration dans des programmes de lutte contre la maladie a pris beaucoup d'importance (Papavizas, 1985 ; Lifshitz et coll., 1986 ; Chet, 1987 ; Sen et coll., 1993). Ainsi, nous avons réalisé des essais pour isoler des microbes du sol antagonistes et pour identifier ceux qui peuvent potentiellement être utilisés en tant que bioformulation et comme alternative à la lutte chimique contre la maladie du pourrissement de la racine du mûrier provoquée par *F. solani* et *F. oxysporum*.

* Adresse actuelle : CSRTI, REC, Angamali, (Kerala), Inde.

MATERIELS ET METHODES

Isolement, identification et pathogénicité des agents responsables :

Les pathogènes du pourrissement de la racine de mûrier, *F. solani* et *F. oxysporum* sont isolés à partir de plants infestés de la variété Kanya-2, recueillis respectivement à Anantapur (Andhra Pradesh) en Inde et à Shertalai, dans la région d'Alleppey (Kerala) – en Inde. Les tissus infestés sont coupés en petits morceaux, leur surface est stérilisée dans une solution de chlorure de mercure à 0,1 % pendant trente secondes, puis ils sont lavés dans de l'eau distillée stérile et étalés séparément sur de l'Agar de Dextrose de Pomme de terre (PDA) et du milieu Agar de Dox de Czapek (CDA). Les plaques sont incubées à $28 \pm 2^\circ \text{C}$. Les champignons poussant autour des morceaux sont transférés de manière antiseptique sur des plaques CDA. L'isolat est à nouveau purifié par la méthode de l'extrémité monohyphale (Rangaswami et Mahadevan, 1999). Les cultures pures sont maintenues de manière adaptée sur des plaques CDA avec une sous-culture périodique. Elles sont multipliées en masse sur un milieu sable-maïs et inoculées chez de jeunes plants de K2 âgés de quatre mois au taux de 50 g/pot pour tester leur pathogénicité.

Isolement des agents de lutte biologique du sol :

Les isolats de *T. harzianum* (TH-1 & TH-2), *T. viride* (TV-3) et *Aspergillus niger* sont obtenus des sols de mûraies au Central Sericultural Research & Training Institute de Mysore en Inde. Les échantillons du sol sont recueillis de la rhizosphère à la fois dans la partie supérieure et inférieure du sol, mélangés avec soin pour former un échantillon composite unique et pris pour isoler *Trichoderma* et *Aspergillus* sur un milieu PDA selon la technique de dilution du sol sur plaque (Waksman, 1927). Le reste des isolats est recueilli à la Tamil Nadu Agricultural University à Coimbatore, Tamil Nadu et à l'Indian Agricultural Research Institute, New Delhi (Tableau I) - en Inde. Les cultures pures de tous les agents de lutte biologique sont maintenues sur du milieu PDA.

Interaction végétative entre les agents de lutte biologique et les pathogènes :

La potentialité antagoniste de diverses espèces et isolats des agents de lutte biologique est testée contre *F. solani* et *F. oxysporum* sur un milieu CDA avec la méthode du tampon agar (Takahashi et coll., 1979). Les milieux où les pathogènes sont implantés sont disposés sur des boîtes de Petri de 100 mm de diamètre. Un disque de 4 mm de diamètre de chaque agent de lutte biologique ayant poussé auparavant sur du PDA est découpé à l'aide d'un emporte-pièce stérilisé et placé au centre des boîtes qui sont incubées à $28 \pm 2^\circ \text{C}$. Chaque traitement est répété trois fois. Les zones d'inhibition produites par divers agents de lutte biologique sont mesurées le 7^{ème} jour. Les données sont soumises au Test Multiple de Duncan (DMRT) et à l'analyse de variance (ANOVA).

Effet des métabolites (filtrats de culture) des agents de lutte biologique sur les pathogènes tests :

Les agents de lutte biologique sont cultivés sur du milieu PDA pendant 5 jours après quoi deux tampons de 4 mm de diamètre sont pris dans la périphérie de chaque isolat et transférés dans 100 ml d'eau tiède stérilisée PDB (pH 4,5) dans une flasque Erlenmeyer de 250 ml. Le bouillon inoculé avec les agents de lutte biologique et le témoin (solution de bouillon neutre) sont incubés pendant 15 jours à température ambiante. Le 15^{ème} jour, les métabolites sont recueillis en les filtrant sur du papier filtre Whatman stérilisé no. 1 et en centrifugeant à 3000 rpm pendant 30 minutes. Le surnageant est recueilli séparément dans des bouteilles stérilisées et scellé. Les couleurs (pigmentation), le pH du bouillon et la biomasse (poids sec mycélien) de tous les agents de lutte biologique sont déterminés à la récolte (Tableau III). Les surnageants sont mélangés séparément avec du milieu CDA pour obtenir des concentrations de 10 et 20 pourcent. Les milieux ainsi amendés avec les métabolites sont disposés sur des boîtes de Petri de 100 mm de diamètre. Les milieux sans métabolites sont utilisés comme témoins. Au centre des plaques, on conserve un tampon des pathogènes de 4 mm de diamètre. Chaque

traitement est répété trois fois. Les plaques sont incubées à $28 \pm 2^\circ \text{C}$. Le 7^{ème} jour, la croissance radiaire du mycélium des pathogènes testé sous l'influence des métabolites est mesurée et comparée avec la croissance des pathogènes chez le témoin. Le pourcentage d'inhibition de la croissance du pathogène avec les agents de lutte biologique est calculé selon la formule de Vincent (1947).

RESULTATS

Identification et pathogénicité des pathogènes :

D'après les caractères morphologiques et culturaux, les pathogènes identifiés sont *Fusarium solani* et *F. oxysporum* comme le confirment le Dr P. Vidhyasekharan, de la Tamil Nadu Agricultural University, à Coimbatore, en Inde et l'IMI, à Londres (Nos. IMI 358650, 51 et 52). Dans les jeunes plants en pot, *F. solani* et *F. oxysporum* produisent tous les deux des symptômes de pourrissement de la racine en l'espace de trois mois. La plupart des racines primaires et secondaires pourrissent au bout de ce laps de temps et les mêmes champignons sont réisolés sur les racines pourries, ce qui obéit aux postulats de Koch.

Interaction végétative des agents de lutte biologique et des pathogènes :

L'action antagoniste de treize agents de lutte biologique aux genres et isolats différents diffère, non seulement entre les espèces mais aussi entre les isolats de la même espèce (Tableau I) comme le montre la formation de la zone d'inhibition contre les champignons testés *F. solani* et *F. oxysporum*. Parmi tous les isolats testés, *L. arvalis*, *T. harzianum* (TH-1) et *A. niger* sont les plus efficaces contre les deux pathogènes.

L. arvalis produit une zone d'inhibition très distincte et claire de 35,6 et 36,8 mm contre respectivement *F. solani* et *F. oxysporum*. *T. harzianum* (TH-1) produit des zones d'inhibition de 31,6 et 28,2 mm contre *F. solani* et *F. oxysporum* tandis que *A. niger* inhibe la croissance des pathogènes en présentant une zone d'inhibition très claire et nette mesurant respectivement 23,6 et 38 mm de diamètre. Les trois antagonistes ci-dessus ont une action d'inhibition différente sur *F. solani* et *F. oxysporum*, qui est significative sur le plan statistique. *T. viride* (TV-3), *T. hamatum*, *T. pseudokoningii*, *T. longibrachiatum* et *G. virens* (GV-2) sont complètement inefficaces contre *F. solani* et *G. virens* (GV-1) contre *F. oxysporum* tandis que *T. viride* (TV-1) est complètement inefficace contre les deux pathogènes.

Effet des métabolites (filtrats de culture) des agents de lutte biologique sur les pathogènes testés :

L'inhibition des pathogènes par les métabolites des divers agents de lutte biologique varie d'un isolat à l'autre (Tableau II). Dans l'expérience où des filtrats de culture non autoclavés des agents de lutte biologiques sont utilisés, l'inhibition maximum de la croissance mycéliale des deux pathogènes est enregistrée dans les milieux amendés avec 20 pour cent de métabolites. Parmi tous les agents de lutte biologique, les milieux amendés avec 20 pour cent de métabolites de *A. niger* donnent l'inhibition la plus élevée contre *F. solani* et *F. oxysporum* de respectivement 76 et 87,42 pourcent, suivis par respectivement 66,31 et 44,37 pourcent avec *T. harzianum* (TH-1) et *T. hamatum* contre *F. solani* tandis qu'avec *F. oxysporum*, l'inhibition est respectivement de 68,02 et 63,17 pourcent. Le reste des agents de lutte biologique présente une inhibition modérée à faible contre les deux pathogènes. La plupart des espèces et des isolats de *Trichoderma* s'avèrent plus efficaces contre *F. oxysporum* que *F. solani*. En général, les agents les plus actifs biologiquement sont *T. harzianum* (TH-1) et *A. niger*. La plupart des agents de lutte biologique produisent des pigments dans le bouillon et augmentent aussi le pH du bouillon (Tableau III).

DISCUSSION

Tous les agents de lutte biologique sauf *T. viride* (TV-1) présentent des degrés variés d'antagonisme contre les pathogènes testés. L'effet antagoniste varie d'un isolat à un autre même à l'intérieur d'une espèce. Ce type de variabilité de l'antagonisme parmi des isolats ayant des caractères morphologiques cultureux très similaires a été signalé par divers chercheurs (Kamayshko, 1961 ; Dennis et Webster, 1971 ; Chet, 1987 ; OnSando et Waudo, 1994). Cette variation pourrait être attribuée à la taxonomie de *Trichoderma* qui est exclusivement basée sur sa morphologie (Rifai, 1969). Cela indique que pour une gestion efficace des maladies, il est nécessaire de tester différents isolats de la même espèce d'antagonistes pour faire face à des conditions écologiques variées.

L. arvalis, *T. harzianum* (TH-1 & TH-2), *T. koningii* et *A. niger* présentent de bons antagonismes contre les deux pathogènes testés en supprimant leur croissance radiaire mycéliale. Cependant, seuls les métabolites de *T. harzianum* (TH-1) et *A. niger* sont aussi efficaces, bien que de nombreux autres antagonistes aient aussi montré un antagonisme modéré à la fois à des niveaux d'interaction physique et métabolique. Cela indique que l'inhibition de la croissance mycéliale radiaire par ces deux antagonistes au niveau de l'interaction végétative n'est pas simplement un phénomène physique. D'autre part, *T. hamatum* inhibe la croissance des pathogènes testés seulement par interaction métabolique. Il semble que *T. hamatum* ne montre pas d'hyperparasitisme contre les pathogènes du pourrissement de la racine.

On a signalé que *Trichoderma* produit des métabolites toxiques comme les enzymes lytiques, la chitinase, la glucanase, l'harziadinole, le sequiterpene etc... qui tuent de nombreux champignons pathogènes du sol (Lifshitz et coll., 1986 ; Sivan et Chet, 1989). Les métabolites toxiques pourraient agir comme un facteur de prédisposition sur le champignon hôte, avec une désorganisation simultanée par les enzymes lytiques (Papavizas, 1985). On sait que *A. niger* produit des mycotoxines telles que les aflatoxines (Kulik et Holadays, 1967) qui ont un effet inhibiteur sur de nombreux pathogènes (Sen et coll., 1993).

Ainsi, notre étude indique que *L. arvalis*, *T. harzianum* (TH-1), *T. koningii* et *A. niger* peuvent être utilisés comme agents de lutte biologique potentiels contre *F. solani* et *F. oxysporum*. De plus, *T. harzianum* (TH-1) et *A. niger* qui ont présenté un bon antagonisme contre les deux pathogènes au niveau de l'interaction végétative tout comme au niveau métabolite semblent être les agents de lutte biologique les plus prometteurs contre la maladie du pourrissement de la racine. Ainsi, les efforts pour améliorer la croissance de ces agents de lutte biologique, surtout les espèces *Trichoderma*, dans la rhizosphère du mûrier pourraient être le premier pas vers la lutte biologique contre la maladie. La formulation de ces agents de lutte biologique sous la forme d'une bioformulation sera sans risque sur le plan écologique et peut réduire le coût lié à la lutte chimique contre la maladie du pourrissement de la racine de mûrier.

BREEDING COMMERCIAL BIVOLTINE SILKWORM HYBRID RESISTANT TO ZHENJIANG (CHINA) STRAIN OF DENSONUCLEOSIS VIRUS (DNV-Z)

LI MUWANG¹, HOU CHENGXIANG¹, YAO QIN^{1,2} & CHEN KEPING^{1,2}

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

2. Academy of Life Sciences, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212013, China.

*With an objective of evolving bivoltine breeds/hybrids of silkworm (*Bombyx mori* L.) nonsusceptible to Zhenjiang (China) strain of denisonucleosis virus (DNV-Z), a breeding program was undertaken with the use of two Chinese bivoltine breeds 8213, 831 and two Japanese bivoltine races 798, 8214. They were all preserved in the Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences. Some of the individuals were nonsusceptible to DNV-Z. These individuals resistant to DNV-Z were used as breeding materials. Shenlong spinning white oval cocoons was isolated from 8213 × 831 through repeated inbreeding coupled with selection, while Tengfei spinning white dumbbell cocoons was evolved from 798 × 8214. After fixation, the hybrid Shenlong × Tengfei was identified in laboratory and in rural area and was proved to be similar to the commercial races for autumn rearing and nonsusceptible to DNV-Z.*

Keywords: Silkworm (*Bombyx mori*), breeding, nonsusceptible to DNV-Z, commercial race.

INTRODUCTION

Bombyx mori denisonucleosis viruses (BmDNVs) belong to the genus *Iteravirus* of the family Parvoviridae (Lu *et al.*, 1998). BmDNVs, which cause serious economic damage to sericulture, have been isolated from various parts of Japan and China (Qian *et al.*, 1986; Kavase, 1989) and are classified into three groups as BmDNV type-1 (DNV-1), type-2 (DNV-2) and Zhenjiang (China) strain (DNV-Z) (Qian *et al.*, 1985; Watanabe *et al.*, 1986).

BmDNVs multiply only in the nuclei of the columnar cells of the larval midgut epithelium (Seki and Iwashita, 1983; Guo *et al.*, 1985). Certain silkworm strains are highly susceptible, while other strains are nonsusceptible (completely resistant) to DNV-1, DNV-2 or DNV-Z even though they are fed a high concentration of virus inocula (ABE *et al.*, 1987; Eguchi *et al.*, 1986; Hu *et al.*, 1984). The nonsusceptibility to DNV-2 is controlled by *nsd-2* (nonsusceptibility to DNV-2). In DNV-1, two genes are involved; one is *nsd-1* (nonsusceptibility to DNV-1) which is located at 8.3cM on chromosome 21, and the other is *Nid-1* (Non-infection to DNV-1) which has been shown not to be located on chromosome Z, 2, 12 or 17 (Eguchi *et al.*, 1986). *nsd-Z*, which is located on chromosome 15, controls the nonsusceptibility to DNV-Z (Qin *et al.*, 1996). Rearing of silkworm strains that are homozygous for the *nsd-1*, *nsd-2* and *nsd-Z* alleles is one of the best ways to avoid economic damage by DNVs. We have been engaged in the breeding of silkworm races that are nonsusceptible to DNV-Z for several years. First, we chose silkworm races with good economic characters and determined whether or not they carried nonsusceptibility to DNV-Z. Then, *nsd-Z* gene was transferred into several commercial races, and several new germplasm nonsusceptible to DNV-Z were bred (Chen *et al.*,

2001). At the same time, Shenlong and Tengfei had been bred through hybridization and repeated inbreeding coupled with selection using the nonsusceptible to DNV-Z materials as parents.

MATERIALS AND METHODS

Breeding materials:

Forty-two preserved silkworm races, including 21 Chinese and 21 Japanese bivoltine races, were fed with DNV-Z. Among them, a few individuals of six races were resistant to DNV-Z. Therefore, six basic lines resistant to DNV-Z, including two Chinese strains and four Japanese strains, were obtained. Among them, the two Chinese bivoltine strains were 831 and 8213; the Japanese bivoltine strains were 798, 8214, E115 and Dongfei. 831 has a sex-limited marking (Female: W^{+P}/Z , p/p; male: Z/Z , p/p). The cocoon characters of 831 and 8214 are good, but their larva-pupa survival rate is low (831, 70% in autumn 1996; 8214, 72% in autumn 1996). On the contrary, although the cocoon characters of 8213 and 798 are not as good as those of 831 and 8214, their vitality is higher than that of 831 and 8214 (larva-pupa survival rate of 8213 was 98.66, while 798 was 99.25 in autumn 1996). The resistant lines of 831, 8213, 798 and 8214 were used as breeding materials to breed bivoltine silkworm hybrid resistant to DNV-Z.

Virus inoculum and serological diagnosis:

Dried silkworm midgut containing DNV-Z was ground with distilled water until it turned into a dense solution. The solution was filtered with gauze and then centrifuged at 3500 rpm for 20 minutes. After adding an equal volume of 7% acetic acid to the supernatant, the solution was incubated at 25° C for 40 minutes, followed by an adjustment to pH 7.0 and progressive dilution to 0.1% solution of tissue. Bioassays were conducted at 25° C. Newly hatched larvae were fed for 24 hours with mulberry leaves which had been smeared with a DNV-Z suspension, followed by rearing on uncontaminated fresh mulberry leaves. Normally, the silkworms that were susceptible to DNV-Z developed very slowly and could not survive through the third instar. The unhealthy silkworms were checked for denonucleovirus by immunoperoxidase-staining method (Qian *et al.*, 1989).

Selection and breeding methods:

Shenlong: The Shenlong lines were evolved from the hybrid of 831 × 8213. The larvae of this hybrid had sex-limited marking (Female: W^{+P}/Z , p/p; male: Z/Z , p/p). From F₄ onwards, cellular rearing was resorted to. The batches showing best performances were selected and the individuals which were above the batch mean were selected for continuation of further generation. During the course of breeding, emphasis was laid on high viability, nonsusceptibility to DNV-Z and high cocoon characters.

Tengfei: The Tengfei lines were evolved from the hybrid of 798 × 8214. The larvae of these lines had normal marking ($+P/+P$). From F₄ onwards, cellular rearing was resorted to. The batches showing best performances were selected and the individuals which were above the batch mean were selected for continuation of further generation. During the course of breeding, emphasis was laid on high viability, nonsusceptibility to DNV-Z and high cocoon characters.

RESULTS

Characteristics of Shenlong:

The eggs colour is celadon. The larvae are plain and bluish white in colour and had sex-limited marking (Female: W^{+P}/Z , p/p; male: Z/Z , p/p). Cocoons are white and oval with medium grains. Larval duration is around 22 days. The cocoon shell ratio, raw silk percentage, filament length and neatness are good. The breeding process and economic characters of Shenlong were given in Table I.

Table 1. The breeding process and economic characters of Shenlong.

Tableau 1. Processus de lignage et caractères économiques de Shenlong.

Generation	Year	Season	Duration of 5th larvae (D: H)	Duration of feeding period (D: H)	Cocoon weight (g)	Cocoon shell weight (g)	Ratio of cocoon shell (%)	Ratio of cocoon mortality (%)	Larva-pupa survival rate (%)
	<i>Année</i>	<i>Saison</i>	<i>Durée du 5ème âge (J: H)</i>	<i>Durée de la période de nourrissage (J: H)</i>	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Poids de la coque (g)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>	<i>Ratio de mortalité de cocons (%)</i>	<i>Taux de survie larve - nymphe (%)</i>
831 × 8213		Spring <i>Printemps</i>	7: 6	23: 12	1.872	0.453	24.20	0.52	97.63
F2	1997	Summer <i>Été</i>	6: 6	21: 10	1.598	0.371	23.22	3.68	92.20
F3		Autumn <i>Automne</i>	6: 6	22: 11	1.620	0.378	23.33	2.12	94.36
F4		Late autumn <i>Fin de l'automne</i>	6: 22	22: 19	1.747	0.402	23.01	1.79	94.91
F5		Spring <i>Printemps</i>	7: 8	23: 11	1.881	0.437	23.23	1.07	96.26
F6		Summer <i>Été</i>	6: 9	21: 11	1.605	0.357	22.24	3.95	91.82
F7	1998	Autumn <i>Automne</i>	6: 15	22: 9	1.634	0.379	23.19	3.40	94.68
F8		Late autumn <i>Fin de l'automne</i>	6: 20	22: 17	1.703	0.392	23.02	2.49	95.93
F9	1999	Spring <i>Printemps</i>	7: 8	23: 8	1.889	0.450	23.82	0.80	97.20
F10		Autumn <i>Automne</i>	6: 9	21: 11	1.640	0.376	23.93	1.94	95.73
F11	2000	Spring <i>Printemps</i>	7: 9	23: 11	1.899	0.445	23.41	0.99	96.92

Table II. The breeding process and economic characters of Tengfei.

Tableau II. Processus de lignage et caractères économiques de Tengfei.

Generation	Year	Season	Duration of 5 th larvae (D : H)	Duration of feeding period (D : H)	Cocoon weight (g)	Cocoon shell weight (g)	Ratio of cocoon shell (%)	Ratio of cocoon mortality (%)	Larva-pupa survival rate (%)
	<i>Année</i>	<i>Saison</i>	<i>Durée du 5^{ème} âge (J / H)</i>	<i>Durée de la période de nourrissage (J / H)</i>	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Poids de la coque (g)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>	<i>Taux de mortalité du cocon (%)</i>	<i>Taux de survie larve - nymphe (%)</i>
798 × 8214		Spring <i>Printemps</i>	7: 12	23: 18	1.728	0.402	23.26	1.16	96.88
F2	1997	Summer <i>Été</i>	6: 9	22: 00	1.509	0.342	22.66	3.72	91.02
F3		Autumn <i>Automne</i>	6: 12	22: 11	1.608	0.356	22.14	2.33	93.64
F4		Late autumn <i>Fin de l'automne</i>	6: 23	22: 18	1.711	0.388	22.68	2.63	94.27
F5		Spring <i>Printemps</i>	7: 10	23: 11	1.809	0.425	23.49	1.25	95.85
F6	1998	Summer <i>Été</i>	6: 8	21: 11	1.590	0.351	22.08	4.39	89.95
F7		Autumn <i>Automne</i>	6: 9	22: 12	1.617	0.371	22.94	3.37	95.29
F8		Late autumn <i>Fin de l'automne</i>	6: 18	22: 19	1.698	0.389	22.91	2.38	96.41
F9	1999	Spring <i>Printemps</i>	7: 4	23: 7	1.804	0.428	23.73	1.06	96.89
F10		Autumn <i>Automne</i>	6: 10	21: 14	1.643	0.376	22.88	2.39	94.71
F11	2000	Spring <i>Printemps</i>	7: 5	23: 9	1.817	0.433	23.83	1.28	96.12

Characteristics of Tengfei:

The eggs color is gray purple. The larvae are plain and bluish white in color with normal marking (+^P/+^P). Cocoons are white and dumbbell with medium grains. Larval duration is around 23 days. The cocoon shell ratio, raw silk percentage, filament length and neatness are good. The breeding process of Tengfei is shown in Table II.

Table III. Average performance of Shenlong × Tengfei in four centers located at different regions.**Tableau III. Performance moyenne de Shenlong × Tengfei dans quatre centres situés dans différentes régions.**

Character / Caractère	Shenlong × Tengfei	Jingsong × Haoyue*	Shenlong × Tengfei	Liangguangerhao*
Duration of 5 th larvae (D: H) <i>Durée du 5^{ème} âge (J : H)</i>	7: 00	8: 18	6: 14	6: 11
Duration of feeding period (D: H) <i>Durée de la période de nourissage (J : H)</i>	23: 15	27: 14	21: 11	21: 22
Larva-pupa survival rate (%) <i>Taux de survie larve – nymphe (%)</i>	96.88	95.30	95.91	93.00
Cocoon weight (g) / <i>Poids du cocon (g)</i>	1.905	1.861	1.755	1.591
Cocoon shell weight (g) <i>Poids de la coque soyeuse (g)</i>	0.441	0.457	0.404	0.353
Shell ratio (%) / <i>Richesse soyeuse (%)</i>	23.12	24.56	23.00	22.18
Cocoon yield per 10 ⁴ larvae (kg) <i>Rendement en cocons pour 10⁴ larves (kg)</i>	18.455	16.782	16.832	14.794
Index / <i>Indice</i>	110	100	114	100
Good cocoon (%) / <i>Bons cocons (%)</i>	96.12	97.66	92.26	92.94
Raw silk percentage of fresh cocoon (%) <i>Pourcentage de soie grège des cocons frais (%)</i>	18.60	18.53	17.670	17.482
Index / <i>Indice</i>	100.4	100	101	100
Filament length (m) / <i>Longueur du filament (m)</i>	1233	1216	1163	997.5
Reelability (%) / <i>Dévidabilité (%)</i>	88.78	86.62	75.00	77.92
Length of non-broken cocoon filament (m) <i>Longueur du filament de cocon sans casse (m)</i>	1039	1053	873.3	771
Index / <i>Indice</i>	98.7	100	113.3	100
Filament size (d) / <i>Titre du filament (d)</i>	2.35	2.66	2.49	2.64
Neatness (p) / <i>Netteté (p)</i>	96.5	97.7	93.7	92.5
Season / <i>Saison</i>	2000 Spring / <i>Printemps 2000</i>		2000 autumn / <i>Automne 2000</i>	

* Control races / *Races témoins.*

Table IV. Performance of Shenlong × Tengfei in rural area.

Tableau IV. Performance de Shenlong × Tengfei dans la zone rurale.

Breed	Survival	Duration of feeding period	Cocoon yield for 25000 larvae (kg)	Output value per 25 000 larvae (Yuan RMB)	Amount of leaves for one kg of cocoons (kg)	Cocoon yield per 50 kg mulberry leaves (kg)	Output value per 50 kg mulberry leaves (Yuan RMB)	Cocoon weight (g)	Cocoon shell (g)	Shell ratio (%)
<i>Lignée</i>	<i>Survie</i>	<i>Durée de la période de nourrissage</i>	<i>Rendement en cocons pour 25000 larves</i>	<i>Valeur de la production de 25000 larves</i>	<i>Qté de feuilles pour un kg de cocons</i>	<i>Rendement en cocons pour 50 kg de feuilles de mûrier</i>	<i>Valeur de la production pour 50 kg de feuilles de mûrier</i>	<i>Poids du cocon</i>	<i>Poids de la coque</i>	<i>Richesse soyeuse</i>
	(%)	(D : H)	(kg)	(Yuan RMB)	(kg)	(kg)	(Yuan RMB)	(g)	(g)	(%)
* Shenlong × Tengfei	94.11	22: 13	41	703.50	16.36	3.06	52.51	1.745	0.396	22.69
* Jingsong × Haoyue	90.43	24: 06	38.5	696.00	16.29	3.07	55.51	1.703	0.416	24.43

*: 1. The average performance of reciprocal hybrids / *Performance moyenne des hybrides réciproques.*

2. Reared in 2000 autumn / *Élevé en automne 2000.*

Characteristics of Shenlong × Tengfei:

The larvae are bluish white and plain in color with normal marking (Female: $+^p/p$, W^{+p}/p , Z/Z). Cocoons are white and intermediate shape between oval and dumbbell. Larval duration is around 22 days (in autumn). The most prominent characters of this hybrid are nonsusceptibility to DNV-Z, high survival, high cocoon shell ratio, longer filament length and high quality raw silk. The hybrids are robust. This makes them easy to rear at farmer's level in autumn, especially in the area where DNV-Z disease happens frequently.

In autumn 1999 and spring 2000, the hybrids of Shenlong × Tengfei were tested in four centers located at different regions. The results showed that its economic characters were above the control hybrid combination – Lianguangerhao (shown in Table III). In autumn 2000, the hybrids of this combination were reared in rural areas to test their adaptability at farmer level. Shenlong × Tengfei was proved to be a good combination for autumn rearing (shown in table IV).

Resistant ability to DNV-Z

The hybrids of Shenlong × Tengfei and Jingsong × Haoyue were fed with DNV-Z at the same time. Hybrids of Shenlong × Tengfei were nonsusceptible, but hybrids of Jingsong × Haoyue were susceptible.

DISCUSSION

In sericultural area, disinfection is adopted to eliminate the pathogen and lots of chemical agents are used. These chemical agents are harmful to human and environment. But the pathogen cannot be eliminated downright out of the rearing houses and silkworm diseases happen frequently, especially in rural area. The best method for controlling silkworm diseases is breeding silkworm varieties resistant to pathogen. Densonucleosis is of common occurrence in rural area especially in autumn, and *nsd-Z* allele controls the nonsusceptibility to DNV-Z. With the objective of preventing the harm of DNV-Z, Shenlong × Tengfei were bred. The hybridized combination of Shenlong × Tengfei can resist DNV-Z completely, and its economic characters were higher than the control hybridized combination of Lianguangerhao.

REFERENCES

- ABE H., WATANABE H. & EGUCHI R. (1987) Genetical relationship between nonsusceptibilities of the silkworm, *Bombyx mori*, to two densonucleosis viruses. J. Seric. Sci. Jpn 56(3) 443-444.
- CHEN KEPING, LI MUWANG, YAO QING, HOU CHENGXIANG (2001) Breeding of new germplasms of silkworm (*Bombyx mori*) resistant to Zhenjiang (China) strain of densonucleosis virus (DNV-Z). Sericologia, 41(1).
- EGUCHI R., FURUTA Y. & NINAKI O. (1986) Dominant nonsusceptibility to densonucleosis virus in the silkworm, *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn 55(2): 177-178.
- GUO X. J., QIAN Y. J., HU X. F. *et al.*, (1985) Studies on the infection site by the densonucleosis virus in the diseased silkworm (*Bombyx mori*) in China. Acta Sericologica Sinica, 11(2):93-98.
- HU X. F., QIAN Y. J. & WANG H. L. (1984) Studies on infectivity of silkworm densonucleosis virus to some silkworm races. Acta Sericologica Sinica, 10(2): 87-90.
- KAVASE S. (1989) Densonucleosis viruses of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn. 58(4): 295-301.
- LU HONGSHENG (1998) Molecular biology of insect viruses, pp 5-8. China Agricultural Sciencetech Press. Beijing.
- QIAN Y. J., GUO X. J., HU X. F., WATANABE H. (1985) The serological relationship of *Bombyx mori* densonucleosis virus from China and Japan. Acta Sericologica Sinica, 11(4): 241-242.
- QIAN Y. J., HU X. F., SUN Y. K. *et al.* (1986) Studies on the densonucleosis viruses of the silkworm. Acta Sericologica Sinica, 12(2): 89-94.

- QIAN Y. J., HU X. F., WANG Y. X. *et al.*, (1989) Serological diagnoses of the densovirus disease of *Bombyx mori*. *Acta Sericologica Sinica*, 15(4): 217-222.
- QIN J., YI W. Z. (1996) Genetic linkage analysis of *nsd-Z*, the nonsusceptibility gene of *Bombyx mori* to the Zhenjiang (China) strain densovirus. *Sericologia*, 36(2): 241-248.
- SEKI H. & IWASHITA Y. (1983) Histopathological features and pathogenicity of a densovirus of the silkworm, *Bombyx mori*, isolated from sericultural farms in Yamanashi prefecture. *J. Seric. Sci. Jpn.* 52(3), 400-405.
- WATANABE H., KAWASE S., SHIMIZU T. & SEKI H. (1986) Difference in serological characteristics of densovirus in the silkworm *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn* 55(1): 75-76.

OBTENTION D'UN HYBRIDE DE VER A SOIE BIVOLTIN COMMERCIAL RESISTANT A LA SOUCHE ZHENJIANG (CHINE) DU VIRUS DE LA DENSONUCLEOSE (DNV-Z)

LI MUWANG¹, HOU CHENGXIANG¹, YAO QIN^{1,2} & CHEN KEPING^{1,2}

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

2. Academy of Life Sciences, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212013, Chine.

*Nous avons entrepris un programme de lignage dans le but de mettre au point des hybrides / lignées bivoltins du ver à soie (**Bombyx mori** L.) non sensibles à la souche Zhénjiang (Chine) du virus de la densonucléose (DNV- Z) en utilisant deux lignées chinoises bivoltines 8213, 831 et deux races bivoltines japonaises 798, 8214. Elles sont toutes conservées au Sericulture Research Institute, de la Chinese Academy of Agricultural Sciences. Certains individus ne sont pas sensibles au DNV-Z. Ces individus résistant au DNV-Z sont utilisés comme matériels de lignage. Shenlong qui file des cocons ovales blancs est isolé à partir de 8213 × 831 par consanguinité répétée associée à une sélection tandis que Tengfei qui file des cocons centrés blancs a été mis au point à partir de 798 × 8214. Après fixation, l'hybride Shenlong × Tengfei a été évalué en laboratoire et dans une zone rurale et s'avère être équivalent aux races commerciales pour l'élevage d'automne et non sensible à DNV-Z.*

INTRODUCTION

Les virus de la densonucléose de *Bombyx mori* (BmDNVs) appartiennent au genre Iteavirus de la famille des Parvoviridae (Lu et coll., 1998). Les BmDNV qui entraînent des dégâts économiques sérieux pour la sériculture ont été isolés dans divers endroits du Japon et de la Chine (Qian et coll., 1986 ; Kavase, 1989) et sont classifiés en trois groupes : les BmDNV de type 1 (DNV-1), de type 2 (DNV-2) et de souche Zhenjiang (Chine) (DNV-Z) (Qian et coll., 1985 ; Watanabe et coll., 1986).

Les BmDNV ne se multiplient que dans les noyaux des cellules colonnaires de l'épithélium de l'intestin moyen larvaire (Seki et Iwashita, 1983 ; Guo et coll., 1985). Certaines souches de vers à soie sont très sensibles tandis que d'autres souches ne sont pas sensibles (complètement résistantes) à DNV-1, DNV-2 ou DNV-Z même lorsqu'on leur donne une concentration élevée d'inoculum de virus (ABE et coll., 1987 ; Eguchi et coll., 1986 ; Hu et coll., 1984). La non-sensibilité à DNV-2 est contrôlée par le gène *nsd-2* (non-sensibilité à DNV-2). Chez DNV-1, deux gènes sont impliqués : l'un est *nsd-1* (non sensibilité à DNV-1) qui est situé à 8.3cM sur le chromosome 21 et l'autre est *Nid-1* (non-infestation par DNV-1) qui s'avère ne pas être situé sur le chromosome Z, 2, 12 ou 17 (Eguchi et coll., 1986). L'élevage de souches de vers à soie homozygotes pour les allèles *nsd-1*, *nsd-2* et *nsd-Z* est l'un des meilleurs moyens d'éviter les dégâts économiques par les DNV. Nous nous sommes engagés dans le lignage de races de vers à soie qui ne sont pas sensibles à DNV-Z pendant plusieurs années. En premier lieu, nous avons choisi des races de vers à soie avec de bons caractères économiques et déterminé si elles possédaient ou ne possédaient pas la non-sensibilité à DNV-Z. Puis, le gène *nsd-Z* a été transféré dans plusieurs races commerciales et plusieurs nouveaux germoplasmes non sensibles à DNV-Z ont été lignés (Chen et coll., 2001). Au même moment, Shenlong et Tengfei

ont été isolés par hybridation et consanguinité répétées, associées à une sélection utilisant les individus non sensibles à DNV-Z comme parents.

MATERIELS ET METHODES

Matériels de lignage :

Quarante deux races de vers à soie conservées, comprenant 21 races bivoltines chinoises et 21 races bivoltines japonaises sont nourries avec du DNV-Z. Parmi elles, quelques individus de six races sont résistants à DNV-Z. On a donc obtenu six lignées de base résistantes à DNV-Z, comprenant deux souches chinoises et quatre souches japonaises. Les deux souches bivoltines chinoises sont 831 et 8213 ; les souches bivoltines japonaises sont 798, 8214, E115 et Dongfei. 831 a un marquage limité au sexe (Femelle : $W^{+p}/Z, p/p$; mâle : $Z/Z, p/p$). Les caractères du cocon de 831 et 8214 sont bons mais le taux de survie larve-nymphé est bas (831, 70 % en automne 1996 ; 8214, 72 % en automne 1996). Au contraire, bien que les caractères du cocon de 8213 et 798 ne soient pas aussi bons que ceux de 831 et 8214, leur vitalité est plus élevée que celles de 831 et 8214 (le taux de survie larve – nymphé de 8213 est de 98,66 tandis que pour 798 il est de 99,25 en automne 1996). Les lignées résistantes 831, 8213, 798 et 8214 sont utilisées comme matériels de lignage pour produire un hybride de ver à soie bivoltin résistant à DNV-Z.

Inoculum du virus et diagnostique sérologique :

De l'intestin séché de ver à soie contenant du DNV-Z est broyé avec de l'eau distillée jusqu'à ce qu'il devienne une solution dense. La solution est filtrée avec une gaze puis centrifugée à 3500 rpm pendant 20 minutes. Après avoir ajouté un volume égal d'acide acétique à 7 % au surnageant, la solution est incubée à 25° C pendant 40 minutes, puis ajustée à un pH de 7 et diluée progressivement jusqu'à 0,1 % de tissu. Des évaluations biologiques sont réalisés à 25° C. Des larves nouvellement écloses sont nourries pendant 24 heures avec des feuilles de mûrier enduites avec une suspension de DNV-Z, puis élevées sur des feuilles de mûrier fraîches non contaminées. Normalement, les vers à soie qui sont sensibles à DNV-Z se développent très lentement et ne peuvent pas survivre au-delà du troisième âge. On identifie les vers à soie malsains par rapport au densonucléovirus par la méthode de coloration immunopéroxydase (Qian et coll., 1989).

Méthodes de sélection et de lignage :

Shenlong : Les lignées Shenlong ont été mises au point à partir de l'hybride de 831 × 8213. Les larves de cet hybride ont un marquage limité au sexe (Femelle : $W^{+p}/Z, p/p$; mâle : $Z/Z, p/p$). A partir de la F4, on a recours à l'élevage cellulaire. Les lots présentant les meilleures performances sont sélectionnés et les individus qui sont au-dessus de la moyenne du lot sont sélectionnés pour les générations futures. Au cours du lignage, on met l'accent sur une viabilité élevée et une non-sensibilité à DNV-Z et de bons caractères du cocon.

Tengfei : Les lignées Tengfei sont mises au point à partir de l'hybride 798 × 8214. Les larves de ces lignées ont un marquage normal ($^{+p}/^{+p}$). A partir de F4, on a recours à l'élevage cellulaire. Les lots présentant les meilleures performances sont sélectionnés et les individus qui sont au-dessus de la moyenne du lot sont sélectionnés pour les futures générations. Au cours du lignage, on met l'accent sur une viabilité élevée, une non-sensibilité à DNV-Z et de bons caractères du cocon.

RESULTATS

Caractéristiques de Shenlong :

La couleur de l'œuf est vert pâle. Les larves sont unies et de couleur blanc bleu et ont un marquage limité au sexe (Femelle : $W^{+p}/Z, p/p$; mâle : $Z/Z, p/p$). Les cocons sont blancs et ovales avec des

grains moyens. La durée larvaire est d'environ 22 jours. La richesse soyeuse, le pourcentage de soie grège, la longueur du filament et la netteté sont bons. Le processus de lignage et les caractères économiques de Shenlong sont présentés dans le Tableau I.

Caractéristiques de Tengfei :

La couleur des œufs est violet gris. Les larves sont unies et de couleur blanc bleu avec un marquage normal (+p/+p). Les cocons sont blancs et cintrés avec des grains moyens. La durée larvaire est d'environ 23 jours. La richesse soyeuse, le pourcentage de soie grège, la longueur du filament et la netteté sont bons. Le processus de lignage de Tengfei est présenté dans le Tableau II.

Caractéristiques de Shenlong × Tengfei :

Les larves sont blanc bleu et de couleur unie avec un marquage normal ($^{+p}/p$, W^{+p} ; Z: mâle : $^{+p}/p$, Z:Z). Les cocons sont blancs et de forme intermédiaire entre ovale et cintrée. La durée larvaire est d'environ 22 jours (en automne). Les caractères les plus proéminents de cet hybride sont la non-sensibilité à DNV-Z, un taux de survie élevé, une richesse soyeuse élevée, un filament plus long et une qualité de soie grège élevée. Les hybrides sont robustes. Cela les rend plus facile à élever par le fermier en automne, surtout dans la zone où la maladie due au DNV-Z est fréquente.

En automne 1999 et au printemps 2000, les hybrides de Shenlong × Tengfei ont été testés dans quatre centres situés dans différentes régions. Les résultats montrent que leurs caractères économiques sont au-dessus de la combinaison hybride témoin – Lianguangerhao (présenté dans le Tableau III). En automne 2000, les hybrides de cette combinaison ont été élevés dans des zones rurales pour tester leur adaptabilité pour le fermier. Shenlong × Tengfei s'avère être une bonne combinaison pour l'élevage d'automne (présenté dans le tableau IV).

Capacité de résistance à DNV- Z :

Les hybrides de Shenlong × Tengfei et Jingsong × Haoyue ont été nourris avec du DNV-Z au même moment. Les hybrides Shenlong × Tengfei ne sont pas sensibles mais les hybrides Jingsong × Haoyue sont sensibles.

DISCUSSION

Dans la zone sérieicole, on désinfecte et on a recours à de nombreux agents chimiques pour éliminer le pathogène. Ces agents chimiques sont nuisibles pour l'homme et l'environnement. De plus, le pathogène ne peut pas être éliminé complètement des magnaneries et les maladies de vers à soie sont fréquentes, surtout dans la zone rurale. La meilleure méthode pour contrôler les maladies du ver à soie est le lignage de variétés de vers à soie résistant au pathogène. La densonucléose est courante dans les zones rurales surtout en automne et l'allèle nsd-Z contrôle la non-sensibilité à DNV-Z. Shenlong × Tengfei a été conçu dans le but d'éviter les dégâts provoqués par DNV-Z. La combinaison hybride Shenlong × Tengfei peut complètement résister à DNV-Z et ses caractères économiques sont supérieurs à la combinaison hybride témoin Lianguangerhao.

DIRECT SOMATIC EMBRYOGENESIS IN *MORUS INDICA* L. CV. S₁₃ : IMPROVED EMBRYOID INDUCTION AND FURTHER EVIDENCE

U. PAVAN, K. SRINIVASA REDDY, M. RAMESH, A.V. RAO & A. SADANANDAM*

Plant Biotechnology Research Unit, Department of Botany, Kakatiya University,
Warangal - 506 009, India.

*Four different types of morphogenesis were observed in leaf cultures of **Morus indica** L. cv. S₁₃ grown on Murashige and Skoog (MS) medium containing benzyladenine (BA) (4.4 - 22.0 μ M), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (1.8 - 4.5 μ M) and 2,4-D (1.8 μ M) + BA (4.4 - 22.0 μ M) : nodule formation, callus induction and rhizogenesis/somatic embryogenesis. Induction and expression of somatic embryogenesis was achieved on media supplemented with 2,4-D (1.8 μ M) + BA (13.2 & 17.6 μ M), directly without intervening callus. Globular somatic embryos attained maturation (torpedo-stage) by transferring the embryogenic tissue on to developmental medium without auxin and cytokinin but supplemented with abscisic acid (ABA). Histological analysis of these somatic embryos showed active meristematic cells with dense cytoplasm and large nuclei.*

Keywords : *Morus indica* L cv. S₁₃, somatic embryogenesis, torpedo stage.

INTRODUCTION

A number of investigations have provided new insights into tissue culture studies in mulberry (*Morus* spp.), during last few years. Mulberry plants have been regenerated via organogenesis (Jain and Datta, 1992; Machii, 1992; Hossain *et al.*, 1992; Hayashi and Oka, 1995), however, somatic embryogenesis still suffers from many of the drawbacks. Only two reports described somatic embryogenesis (Wakhlu and Singh Bhau, 2000). Beginning with the first report of embryogenesis on the embryo explants of mulberry by Thinh and Katagiri (1995), there has been only one account of providing somatic embryogenesis from suspension cultures of hypocotyl calli (Shajahan *et al.*, 1995). However, in these instances only formation of globular / heart shaped embryo like structures were reported and, no further developmental events were clearly shown. Since only a limited number of studies have examined the possibility of somatic embryogenesis in mulberry, its potential for widespread use in the tissue culture is unexplored.

The purpose of this study was first to characterize every developmental stage in embryogenesis of mulberry, and second, to improve the development and quality of somatic embryos by manipulating growth regulators. Although the study could identify and histologically examine every developmental stage in embryogenesis (globular, heart and torpedo), all the embryos were noticed to be blocked at torpedo stage. Despite the high intensity of embryo formation, no plant regeneration was observed.

* Correspondent author.

MATERIALS AND METHODS

Fully expanded leaves from *in vitro* grown plants were excised from all the parts of the shoots approximately 10-15 days from the beginning of the subculture. Leaf tips and basal portions including the petiole were discarded and the entire leaf was cut into pieces approximately 1 x 1 cm in length. The explants were cultured with their adaxial surface in contact with the MS (Murashige and Skoog, 1962) medium containing BA (4.4 - 22.0 μ M), 2,4-D (1.8 - 4.5 μ M) and 2,4-D (1.8 μ M) + BA (4.4 - 22.0 μ M). Phytohormones were added to the medium before autoclaving (120°C for 15 min). After 3 weeks in culture, maintained at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ under cool white fluorescent light ($50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) with 16h photoperiod, four types of morphogenesis were distinguished from the cut ends of the explants: nodule formation in BA, friable callus or compact nodular callus in 2,4-D and rhizogenesis/tissue with globular masses of embryos referred to in this study as embryogenic tissue in 2,4-D + BA (Fig. 1).

Four weeks after the initiation of the embryogenic cultures, in order to improve somatic embryo development, the embryogenic tissue was transferred onto developmental media. These media consisted of the basal MS medium supplemented with two concentrations of ABA: 1.8 & 3.7 μ M. ABA was added to the medium before autoclaving and cultures were maintained at same temperature and photoperiod, as mentioned earlier. For each treatment, the embryogenic tissue was cultured for two weeks. There were 2 blocks with 30 cultures per treatment and each experiment was repeated once. Total embryo number and the percent of heart and torpedo shaped embryos were scored. Results were analysed statistically by using Students 't' test.

Histological Study:

To ascertain the embryogenic nature of differentiating structures, somatic embryos were fixed overnight in a solution of acetic acid : alcohol (1 : 3). Tissues were dehydrated in a graded ethanol-xylol series, and embedded in paraffin wax. Sections (10 μ) were double-stained in haematoxylin and basic Fuchsin (Johansen, 1940), and observed by conventional light microscope.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Effect of BA:

After one week on the medium with BA (4.4 - 22.0 μ M), leaf expansion was the preliminary response noticed in all the cultures, at all the concentrations. After 3 weeks in culture, small nodular proliferations were observed from the cut ends of the explants. Considering the results of all experiments, the percentage of nodule-forming explants was 100% at 17.6 and 22.0 μ M BA. These nodular structures showed no further development leading to either organogenesis or embryogenesis, despite several passages on the above media.

Effect of 2,4-D:

It was observed that cultures on 2,4-D (1.8 - 4.5 μ M) induced significant changes in callus morphology; that is, from friable callus to compact nodular callus (Fig. 1). Strong stimulation of callus proliferation was observed on 1.8 μ M 2,4-D medium. Formation of callus in the 1.8 μ M 2,4-D medium was accompanied by friability. However, the other concentrations of 2,4-D tested (2.7 - 4.5 μ M), added negative effect on the friable nature of the callus but maintained its high growth rate. As a result, the cultures grown on these media were characterised by an intensive proliferation of compact nodular callus. It was observed that friable callus formed on media with 1.8 μ M 2,4-D maintained active proliferation after subculture on the same medium and hence this concentration was retained for all further experiments. Whereas, compact nodular callus formed on the media with 2.7, 3.6 and 4.5 μ M 2,4-D, proliferated poorly in the next passages on the same medium.

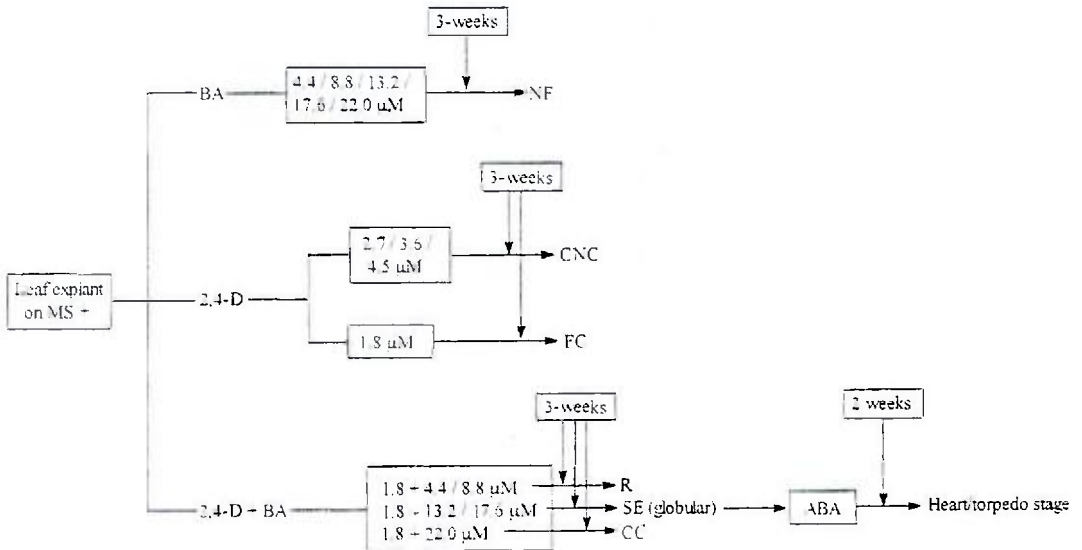


Figure 1. Flow sheet of culture steps showing influence of BA, 2,4-D and 2,4-D + BA on the morphotypes of leaf cultures in mulberry cv. S13.

NE: Nodule formation CNC: Compact nodular callus; FC: Friable callus; R, Rhizogenesis; SE, Somatic embryogenesis. CC: Compact callus.

Figure 1. Diagramme des étapes de culture montrant l'influence de BA, 2,4-D et 2,4-D + BA sur les morphotypes des cultures foliaires chez le cv. de mûrier S13.

NF: Formation de nodules; CNC: Cal nodulaire compact; FC: Cal friable; R: Rhizogénèse; SE: Embryogénèse somatique; CC: Cal compact.

Effect of 2,4-D + BA:

Our results showed that meristematic formations possessing embryogenic potentials, and non-regenerable rhizogenic tissue, was determined by the combined levels of 2,4-D and BA. The results of experiments showed that a concentration of 2,4-D and its ratio with BA were the main factors governing morphotype of leaf cultures in mulberry. Under the relatively low concentrations of BA (4.4 and 8.8 μM), rhizogenesis occurred directly from the explants, at a low level of 2,4-D (1.8 μM). At the higher levels of BA (13.2 and 17.6 μM) and the same relatively low 2,4-D (1.8 μM), embryogenic tissue was formed. Active embryogenic tissue from the leaf segments on medium described above, suggest that induction of embryogenesis requires high levels of BA. The development of globular stage embryos on these cultures was a result of this high BA levels. It was observed that 13.2 μM BA in comparison with 17.6 μM BA, was characterised by a much lower frequency of globular stage embryo formation. Further increase in concentration of BA (22.0 μM) combined with 2,4-D (1.8 μM) induced compact callus formation in primary cultures. At the same time rhizogenesis from leaf cultures started at low BA levels and well developed roots could be easily obtained in their primary cultures. For obtaining further developmental stages, this embryogenic tissue was subcultured onto a medium with ABA.

Table 1. Influence of 2,4-D + BA combinations in the induction of globular embryos and subsequent effect of ABA on globular to heart / torpedo transition.*Tableau 1. Influence des combinaisons 2,4-D + BA sur l'induction d'embryons globulaires et effet consécutif de l'ABA sur la transition du stade globulaire au stade coeur / torpille.*

Hormonal conc. (μ M)	% of responding cultures	Mean no. of globular embryos/ explant $\pm$ S. E.	ABA conc. (μ M)	Mean no. of embryos / explant $\pm$ S.E.	
2,4-D + BA				Heart	Torpedo
Conc. hormonale (μ M)	% de cultures répondant	Nbre moyen d'embryons globulaires/ explant $\pm$ S. E.	Conc. ABA (μ M)	Nbre moyen d'embryons / explant $\pm$ S. E.	
2,4-D + BA				Coeur	Torpille
1.8 + 13.2	60	28.4 $\pm$ 0.5	1.8	10.5 $\pm$ 0.9	6.2 $\pm$ 0.2
			3.7	5.4 $\pm$ 0.5	1.5 $\pm$ 0.4
1.8 + 17.6	85	42.8 $\pm$ 0.2	1.8	21.0 $\pm$ 0.1	12.6 $\pm$ 0.1*
			3.7	8.5 $\pm$ 0.09	5.1 $\pm$ 0.5

The data given are an average of two experiments (n=120) / Les données sont la moyenne de deux expériences (n = 120).

* significant $p < 0.05$ / * significatif $p < 0.05$.

Effect of ABA on embryo development:

ABA has often been noticed as an important factor of *in vivo* and *in vitro* embryo maturation (Reidiboyim-Talleux *et al.*, 1999). Many biochemical and physiological studies have shown that ABA promotes normal development of somatic embryos *in vitro* by stimulating reserve substances accumulation and inhibiting precocious germination (Karkonen, 2000). In order to study the influence of the ABA on the regeneration ability of embryogenic cultures, the pieces of embryogenic tissue formed on 2,4-D (1.8 μ M) + BA (13.2 and 17.6 μ M) media were transferred to embryo development medium (MS basal + ABA). It was revealed that ABA (1.8 μ M) significantly increased developmental ability of globular structures, that was manifested in cultures with developing heart and torpedo shaped embryos. At concentration 1.8 μ M, ABA improved maturation, while higher dose (3.7 μ M) negatively effected the somatic embryo maturation.

The fewest good quality mature somatic embryos (heart and torpedo shaped) were obtained when globular somatic embryos that developed in 2,4-D (1.8 μ M) + BA (13.2 μ M) medium were used as the inoculum on ABA. The largest number of good quality mature somatic embryos were obtained from 2,4-D (1.8 μ M) + BA (17.6 μ M) medium (Tab.1). However, torpedo stage embryos could not be completely regenerated under the influence of ABA, but the embryo conversion potential i.e., from

globular to torpedo stage was greatly enhanced (Fig. 2). Torpedo shaped embryos of *M. indica*, showed lack of shoot development. This might be attributed to the low conversion rates due to irregularities in shoot meristem development (Goebel-Tourand *et al.*, 1993; Karkonen, 2000) in which ABA plays role (Nickle and Yeung, 1993, 1994; Karkonen, 2000) or can be related to poor quality of these embryos, and lack of maturation and desiccation tolerance (Fujii *et al.*, 1990; Etienne *et al.*, 1993; Attree and Fowke, 1993; Reidiboym-Talleux *et al.*, 1999).

It is possible to infer from the present observations that the embryoids may have originated superficially from parenchymatous cells on the surface and were never embedded (Chang and Hsing,

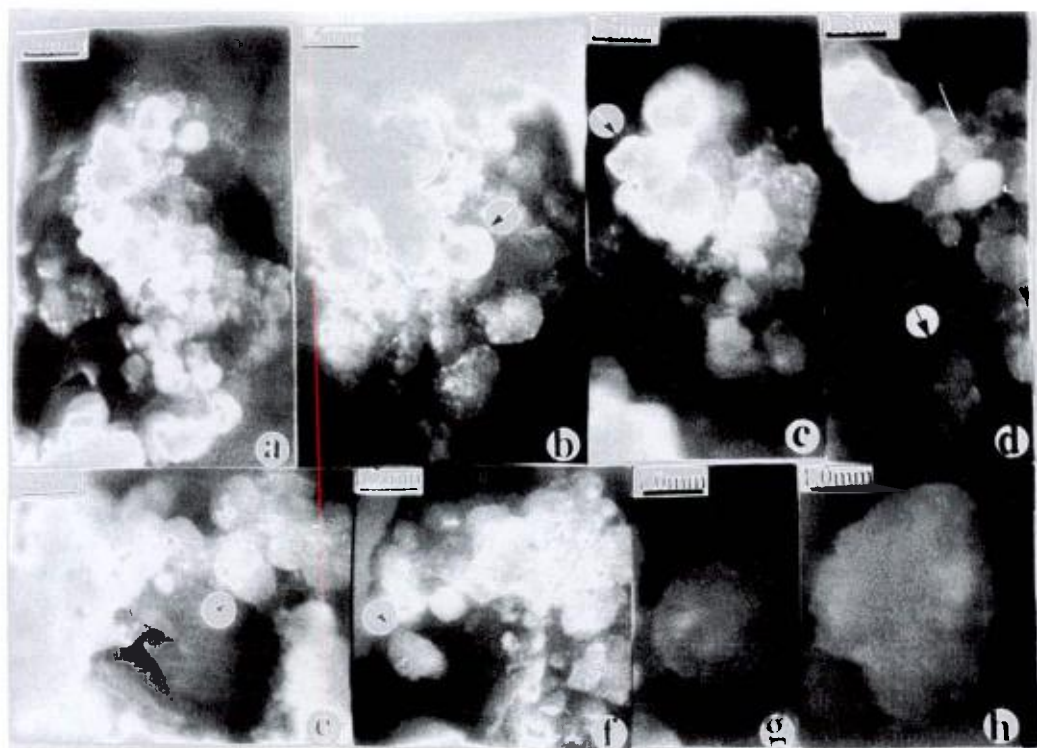


Figure 2. Different developmental stages of somatic embryos from leaf explants.

- a) Embryogenic tissue with cluster of globular embryos.
- b) Globular embryo (arrow).
- c) Heart shaped (arrow).
- d, e & f) Torpedo shaped with suspensor. (arrows).
- g) Enlarged view of globular embryo.
- h) Enlarged view of torpedo embryo.

Figure 2. Différents stades de développement des embryons somatiques d'explants de feuilles.

- a) Tissu embryogénique avec un amas d'embryons globulaires.
- b) Embryon globulaire (flèche).
- c) En forme de cœur (flèche).
- d, e & f) En forme de torpille avec un suspenseur (flèches).
- g) Agrandissement d'un embryon globulaire.
- h) Agrandissement d'un embryon en forme de torpille

1980; Ignacimuthu *et al.*, 1999; Jaya Sree *et al.*, 2001). Analysis of embryogenic culture sections revealed that some epidermal cells of explant embryos were densely cytoplasmic with large nuclei, a characteristic feature of embryogenic cells (Karkonen, 2000). Globular stage somatic embryos showed compact globular embryonal mass consisting of a visually homogenous, very small, dense cells stained heavily with haematoxylin. Heart stage somatic embryos showed a conical apex with prominent notch at one end and suspensor located at other end. The torpedo stage structures were mainly composed of long tubular cells which had smooth surface subtended by an elongating zone.

Embryo development was relatively synchronous only during the initial culture on 2,4-D (1.8 μ M) + BA (13.2 and 17.6 μ M), embryoids may be continually produced through the first several weeks of culture on ABA. As such it was possible to find embryoids at various stages of development in culture i.e., the production of somatic embryos was non-synchronous.

In conclusion it can be said that, embryogenesis in mulberry appears to be a constitutive process which can change its own state or remain in a pre-developmental stage. This mainly implies that a number of new gene products are necessary for the developmental transition to occur (Zimmerman, 1993). Moreover, medium composition is one of the key factors affecting morphogenesis in cells grown *in vitro*. Manipulation of the hormonal concentrations and combinations of the medium allows effective control of morphogenesis in tissue culture to obtain either organogenesis or embryogenesis. Although we have not been able to demonstrate the ability of torpedo embryo to regenerate, the studies described above do show that the regeneration of mulberry via embryogenesis is possible. We have established a culture system from which we can induce embryogenic tissue, in a relatively high frequency. These facts indicate that we have overcome some important obstacles in induction and further development of somatic embryos from leaf cultures of mulberry.

REFERENCES

- ATTREE S.M., FOWKE L.C. (1993) Embryogeny of gymnosperms : advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant cell Tiss. Org. Cult.*, 35, 1-35.
- CHANG W.C., HSING Y. (1980) Plant regeneration through somatic embryogenesis in root derived callus of ginseng (*Panax ginseng* CA Meyer). *Theor. Appl. Genet.*, 57, 133-135.
- ETIENNE H., MONTORO P., MICHAUX FERRIERE N., CARRON M.P. (1993) Effects of desiccation, medium osmolarity and abscisic acid on the maturation of *Hevea brasiliensis* somatic embryos. *J. Exp. Bot.*, 44, 1613-1619.
- FUJII J.A., SLADE D., OLSEN R., RUZIN S.E., REDENBAUGH K. (1990) Alfalfa somatic embryo maturation and conversion to plants. *Plant Sci.*, 72, 93-100.
- GOEBEL-TOURAND I., MAURO M.C., SOSSOUNTZOV L., MIGINIAC E., DELOIRE A. (1993) Arrest of somatic embryo development in grapevine : histological characterization and the effect of ABA, BAP and zeatin in stimulating plantlet development. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 33, 91-103.
- HAYASHI K., OKA S. (1995) Formation of multiple bud bodies and plant regeneration in the mulberry, *Morus alba*. *J. Seri. Sci. Jpn.*, 64, 117-123.
- HOSSAIN M., RAHMAN S.M., ZAMAN A., JOARDER O.I., ISLAM R. (1992). Micropropagation of *Morus laevigata* wall. from mature trees. *Plant Cell Rep.*, 11, 522-524.
- IGNACIMUTHU S., AROCKIASAMY S., ANATOMYSAMY M., RAVICHANDRAN P. (1999) Plant regeneration through somatic embryogenesis from mature leaf explants of *Eryngium foetidum*, a condiment. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 56, 131-137.
- JAIN A.K., DATTA R.K. (1992) Shoot organogenesis and plant regeneration in mulberry (*Morus bombycis* Koidz) : Factors influencing morphogenetic potential in callus cultures. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 29, 43-50.
- JAYA SREE T., PAVAN U., RAMESH M., RAO A.V., REDDY J.M., SADANANDAM A. (2001) Somatic embryogenesis from leaf cultures of potato. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 64, 13-17.

- JOHANSEN D.A. (1940) Plant Microtechnique. Mc Graw Hill, New York.
- KARKONEN A. (2000) Anatomical study of zygotic and somatic embryos of *Tilia cordata*. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 61, 205-214.
- MACHII H. (1992) Organogenesis from immature leaf cultures in mulberry, *Morus alba* L. J. Seric. Sci. Jpn., 61, 512-519.
- MURASHIGE T., SKOOG F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, 15, 473-497.
- NICKLE T.C., YEUNG E.C. (1993) Failure to establish a functional shoot meristem may be a cause of conversion failure in somatic embryos of *Daucus carota* (Apiaceae). Am. J. Bot., 80, 1284-1291.
- NICKLE T.C., YEUNG E.C. (1994) Further evidence of a role for abscisic acid in conversion of somatic embryos of *Daucus carota*. In vitro Cell. Dev. Biol. 30P, 96-103.
- REIDBOYM-TALLEUX L., DIEMER F., SOURDIOUX M., CHAPELAIN K., GRENIER-DE MARCH G. (1999) Improvement of somatic embryogenesis in wild cherry (*Prunus avium*). Effect of maltose and ABA supplements. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 55, 199-209.
- SHAJAHAN A., KATHIRAVAN K., GANAPATHI A. (1995) Induction of embryo-like structure by liquid culture in mulberry (*Morus alba* L.) Breed Sci., 45, 413-417.
- THINH N.T., KATAGIRI K. (1995) Induction of direct somatic embryogenesis in mulberry embryos cultured in vitro. J. Seric. Sci. Jpn., 64, 72-74.
- WAKHLU A.K., SINGH BHAI B. (2000) A review of tissue culture studies in mulberry (*Morus*). Sericologia, 40, 1-20.
- ZIMMERMAN L.J. (1993) Somatic embryogenesis : A model for early development in higher plants. Plant Cell, 5, 1411-1423.

EMBRYOGENESE SOMATIQUE DIRECTE CHEZ LE CV S13 DE *MORUS INDICA* L. : AMELIORATION DE L'INDUCTION D'EMBRYONS

U. PAVAN, K. SRINIVASA REDDY, M. RAMESH, A. V. RAO & A. SADANANDAM*

Plant Biotechnology Research Unit, Department of Botany, Kakatiya University,
Warangal – 506 009, Inde.

*Nous avons observé quatre types différents de morphogenèse dans les cultures foliaires du cv. S13 de **Morus indica** L. réalisées sur du milieu de Murashige et Skoog (MS) contenant de la benzyladénine (BA) (de 4,4 à 22 μ M), de l'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique (2,4D) (de 1,8 à 4,5 μ M) et du 2,4-D (1,8 μ M) + BA (de 4,4 à 22 μ M) : formation de nodule, induction de cal et embryogenèse / rhizogénèse somatique. Nous avons réussi l'induction et l'expression de l'embryogenèse somatique sur un milieu additionné avec du 2,4-D (1,8 μ M) + de la BA (13,2 et 17,6 μ M), directement sans cal intermédiaire. Les embryons somatiques globulaires atteignent la maturité (stade de torpille) lorsqu'on transfère les tissus embryogéniques sur un milieu de développement sans auxine et cytokinine mais complété avec de l'acide abscissique (ABA). L'analyse histologique de ces embryons somatiques montre des cellules méristématiques actives avec un cytoplasme dense et de grands noyaux.*

INTRODUCTION

Au cours de ces dernières années, un certain nombre d'études ont apporté des éclairages nouveaux sur les cultures de tissus chez le mûrier (*Morus* spp.). Des plants de mûrier ont été régénérés par organogenèse (Jain et Datta, 1992 ; Machii, 1992 ; Hossain et coll., 1992 ; Hayashi et Oka, 1995), cependant l'embryogenèse somatique présente encore de nombreux inconvénients. Seuls deux rapports décrivent l'embryogenèse somatique (Wakhlou et Singh Bhau, 2000). Le premier rapport sur l'embryogenèse avec des explants d'embryon de mûrier a été écrit par Thinh et Katagiri (1995), et il n'existe qu'un seul autre rapport sur l'obtention d'une embryogenèse somatique à partir de cultures en suspension de cals de l'hypocotyle (Shajahan et coll., 1995). Cependant, dans ces cas, il se produit seulement la formation de structures similaires à un embryon de forme globulaire ou en cœur mais il n'y a aucune autre étape de développement. Puisqu'un nombre limité d'études examine la possibilité de l'embryogenèse somatique chez le mûrier, son potentiel d'exploitation plus étendue pour la culture de tissus demeure inexploré.

Le but de cette étude est en premier lieu de décrire chaque étape de développement pendant l'embryogenèse du mûrier et en deuxième lieu d'améliorer le développement et la qualité des embryons somatiques en manipulant des régulateurs de croissance. Bien que l'étude ait pu identifier et examiner de manière histologique chaque étape de développement pendant l'embryogenèse (stades globulaire, en cœur et en torpille), on remarque que tous les embryons se bloquent au stade de torpille. Malgré l'intensité élevée de formation d'embryons, on n'observe pas de régénération de plant.

* Auteur auquel la correspondance doit être adressée.

MATERIELS ET METHODES

On prélève des feuilles complètement formées sur des plants cultivés *in vitro* à tous les endroits sur les pousses approximativement 10 à 15 jours après le début de la sous-culture. On élimine les bouts des feuilles et les parties basales comprenant le pétiole et la feuille entière est coupée en morceaux d'environ 1×1 cm. Les explants sont cultivés avec leur surface adaxiale en contact avec le milieu MS (Murashige et Skoog, 192) contenant du BA (4,4 à 22 μM), du 2,4-D (1,8 à 4,5 μM) et du 2,4-D (1,8 μM) + BA (4,4 – 22 μM). On ajoute des phytohormones au milieu avant l'autoclavage (120° C pendant 15 minutes). Après 3 semaines de culture sous une lumière blanche fluorescente froide ($50 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ avec 16 h de photopériode, on distingue quatre types de morphogénèse à partir des extrémités coupées des explants : une formation de nodules dans du BA, un cal friable ou un cal nodulaire compact dans du 2,4-D et une rhizogénèse / tissu avec des masses globulaires d'embryon auquel on se réfère dans cette étude comme du tissu embryogène dans du 2,4-D + BA (Fig. 1).

Quatre semaines après le début des cultures embryogéniques, on transfère le tissu embryogénique dans un milieu de développement de manière à améliorer le développement embryonnaire somatique. Ce milieu est constitué du milieu MS de base complété avec deux concentrations d'ABA : 1,8 et 3,7 μM . On ajoute de l'ABA au milieu avant l'autoclavage et les cultures sont maintenues à la même température et photopériode que celles mentionnées plus haut. Pour chaque traitement, le tissu embryogénique est cultivé pendant deux semaines. Il y a deux blocs avec 30 cultures par traitement et chaque expérience est répétée une fois. On compte le nombre total d'embryons et le pourcentage d'embryons en forme de cœur et de torpille. Les résultats sont analysés de manière statistique en utilisant le test "t" de Student.

Etude histologique :

Pour s'assurer de la nature embryogénique des structures différenciées, on fixe les embryons somatiques pendant la nuit dans une solution d'acide acétique : alcool (1: 3). Les tissus sont déshydratés dans une série gradée éthanol xylol et inclus dans de la paraffine. Des coupes (10 μm) sont colorées dans de l'hématoxyline et de la Fuschine basique (Johansen, 1940) et on les observe sous une lumière conventionnelle au microscope.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Effet du BA :

Après une semaine sur le milieu avec du BA (4,4 à 22,0 μM), la réponse préliminaire dans toutes les cultures à toutes les concentrations est l'expansion de la feuille. Après 3 semaines de culture, on observe des petites proliférations nodulaires à partir des extrémités coupées des explants. En prenant en compte les résultats de toutes les expériences, le pourcentage d'explants formant des nodules est de 100 % avec 17,6 et 22 μM de BA. Ces structures nodulaires ne présentent pas de développement supplémentaire entraînant soit une organogénèse ou une embryogénèse, malgré plusieurs passages sur le milieu ci-dessus.

Effet du 2,4-D :

On a observé que les cultures sur du 2,4-D (1,8 à 4,5 μM) induisent des changements significatifs de la morphologie du cal, passant du cal friable au cal nodulaire compact (Fig. 1). On observe une forte stimulation de la prolifération de cals sur un milieu avec 1,8 μM de 2,4-D. La formation de cals dans le milieu avec 1,8 μM de 2,4-D est accompagnée par une friabilité. Cependant, les autres concentrations de 2,4-D testées (2,7 à 4,5 μM), entraînent un effet négatif sur la nature friable du cal mais maintiennent un taux de croissance élevé. Par conséquent, les cultures faites sur ces milieux se caractérisent par une prolifération intense de cals nodulaires compacts. On observe que le cal friable

qui se forme sur le milieu avec $1,8 \mu\text{M}$ de 2,4-D conserve une prolifération active après la sous-culture sur le même milieu et on a ainsi retenu cette concentration pour les expériences suivantes. Tandis que le cal nodulaire compact formé sur le milieu avec 2,7, 3,6 et $4,5 \mu\text{M}$ de 2,4-D prolifère peu pendant les passages suivants sur le même milieu.

Effet du 2,4-D + BA :

Nos résultats montrent que les formations méri-stématiques possédant des potentiels embryogéniques et le tissu rhizogénique non régénérable sont déterminés par les niveaux combinés de 2,4-E et de BA. Les résultats des expériences montrent que la concentration de 2,4-D et son ratio avec BA sont les principaux facteurs gouvernant le morphotype des cultures foliaires chez le mûrier. Avec des concentrations relativement faibles en BA ($4,4$ et $8,8 \mu\text{M}$), avec un faible niveau en 2,4-D ($1,8 \mu\text{M}$) la rhizogénèse a lieu directement à partir des explants. Avec des niveaux plus élevés en BA ($13,2$ et $17,6 \mu\text{M}$) et à une même concentration relativement faible en 2,4-D ($1,8 \mu\text{M}$), un tissu embryogène se forme. Avec ce milieu, on obtient un tissu embryogénique actif à partir des segments foliaires, ce qui laisse supposer que l'induction de l'embryogenèse nécessite des niveaux élevés de BA. Le développement d'embryons au stade globulaire sur ces cultures est le résultat de ces niveaux élevés en BA. Avec $13,2 \mu\text{M}$ de BA par comparaison à $17,6 \mu\text{M}$ de BA, on observe une fréquence beaucoup plus faible de formation d'embryons au stade globulaire. Une augmentation supplémentaire de la concentration en BA ($22,0 \mu\text{M}$) combinée avec du 2,4-D ($1,8 \mu\text{M}$) induit une formation de cal compact dans les cultures primaires. Au même moment, la rhizogénèse des cultures foliaires commence à de faibles niveaux en BA et on peut facilement obtenir des racines bien développées dans les cultures primaires. Pour obtenir les stades de développement supplémentaires, ce tissu embryogénique est mis en sous-culture sur un milieu avec de l'ABA.

Effet de l'ABA sur le développement de l'embryon :

On a souvent remarqué que l'ABA est un facteur important de maturation de l'embryon *in vivo* et *in vitro* (Reidiboym-Talleux et coll., 1999). De nombreuses études biochimiques et physiologiques ont montré que l'ABA promeut le développement normal des embryons somatiques *in vitro* en stimulant l'accumulation des substances en réserve et en inhibant la germination précoce (Karkonen, 2000). Pour étudier l'influence de l'ABA sur la capacité de régénération des cultures embryogéniques, les morceaux de tissu embryogénique formé sur du milieu 2,4-D ($1,8 \mu\text{M}$) + BA ($13,2$ et $17,6 \mu\text{M}$) sont transférés sur un milieu de développement de l'embryon (MS de base + ABA). On a montré que l'ABA ($1,8 \mu\text{M}$) augmente de manière significative la capacité de développement des structures globulaires, qui se manifeste dans les cultures avec le développement d'embryons en forme de cœur et de torpille. Avec une concentration de $1,8 \mu\text{M}$, l'ABA améliore la maturation, tandis qu'une dose plus élevée ($3,7 \mu\text{M}$) a un effet négatif sur la maturation de l'embryon somatique.

On obtient moins d'embryons somatiques matures de bonne qualité (en forme de cœur et de torpille) quand les embryons somatiques globulaires qui se sont développés avec du milieu 2,4-D ($1,8 \mu\text{M}$) + BA ($13,2 \mu\text{M}$) sont utilisés comme inoculum sur de l'ABA. Le plus grand nombre d'embryons somatiques matures de bonne qualité est obtenu avec du milieu 2,4-D ($1,8 \mu\text{M}$) + BA ($17,6 \mu\text{M}$) (Tab. I). Cependant, les embryons au stade de torpille ne peuvent pas être complètement régénérés sous l'influence d'ABA, mais le potentiel de conversion de l'embryon c'est à dire du stade globulaire au stade de torpille est grandement amélioré (Fig. 2). Les embryons en forme de torpille de *M. indica* présentent un manque de développement des pousses. Cela pourrait être attribué aux faibles taux de conversion dus aux irrégularités de développement du méristème de la pousse (Goebel – Tourand et coll., 1993 ; Karkonen, 2000) pour lesquels l'ABA joue un rôle (Nickle et Yeung, 1993, 1994 ; Karkonen, 2000) ou peut être lié à la mauvaise qualité de ces embryons et au manque de maturation et de tolérance à la dessiccation (Fujii et coll., 1990 ; Etienne et coll., 1993 ; Attree et Fowke, 1993 ; Reidiboym-Talleux et coll., 1999).

Il est possible de déduire de ces observations que les embryoides pourraient provenir superficiellement des cellules parenchymateuses sur la surface et ne sont jamais imprégnés (Chang et Hsing, 1980 ; Ignacimuthu et coll., 1999 ; Jaya Sree et coll., 2001). L'analyse des coupes de culture embryogéniques révèle que certaines cellules épidermiques des embryons des explants ont des cytoplasmes denses et de grands noyaux, un trait caractéristique des cellules embryogéniques (Karkonen, 2000). Les embryons somatiques au stade globulaire présentent une masse embryonnaire globulaire compacte constituée de cellules denses, très petites visuellement homogènes fortement colorées par de l'hématoxyline. Les embryons somatiques au stade de cœur présentent un sommet conique avec une entaille proéminente à une extrémité et du suspenseur à l'autre extrémité. Les structures au stade de torpille sont principalement composées de longues cellules tubulaires qui ont une surface lisse sous-tendue par une zone d'allongement.

Le développement de l'embryon n'est relativement synchronisé que pendant la culture initiale sur du 2,4-D (1.8 μ M) + BA (13,2 et 17,6 μ M) ; il se pourrait que les embryoides se forment continuellement au cours des premières semaines de culture sur de l'ABA. De cette manière, il est possible de trouver des embryoides à différents stades de développement dans la culture, c'est à dire que la production d'embryons somatiques n'est pas synchronisée.

En conclusion, on peut dire que l'embryogenèse chez le mûrier semble être un procédé constitutif qui peut changer d'état ou demeurer à un stade de pré-développement. Cela veut principalement dire qu'un certain nombre de produits de nouveaux gènes sont nécessaires pour que la transition de développement ait lieu (Zimmerman, 1993). De plus, la composition du milieu est l'un des facteurs clé qui a un effet sur la morphogenèse des cellules cultivées *in vitro*. La manipulation de concentrations et de combinaisons hormonales dans le milieu permet un contrôle efficace de la morphogenèse dans la culture des tissus pour obtenir soit l'organogenèse soit l'embryogenèse. Bien que nous n'ayons pas pu démontrer la capacité de l'embryon en forme de torpille à se régénérer, les études décrites plus haut montrent que la régénération du mûrier par l'embryogenèse est possible. Nous avons établi un système de culture à partir duquel nous pouvons induire des tissus embryogéniques, avec une fréquence relativement élevée. Ces faits indiquent que nous avons surmonté des obstacles importants pour l'induction et le développement ultérieur d'embryons somatiques à partir de cultures foliaires du mûrier.

SEASONAL INCIDENCE OF MULBERRY LEAF ROLLER, *DIAPHANIA PULVERULENTALIS* (HAMPSON) (LEPIDOPTERA : PYRALIDAE) IN KARNATAKA (INDIA)

R. SRINIVASA GOWDA, T. K. NARAYANASWAMY &
V. T. SANNAVEERAPPANAVAR *

Department of Sericulture, UAS, GKVK, Bangalore 65, India.

The seasonal incidence of the mulberry leaf roller, *Diaphania pulverulentalis* was studied in Bangalore Rural district of Karnataka, India during 1999-2000. The pest appeared on the mulberry crop during July, 1999 and remained active until February, 2000. The peak incidence of the pest was observed during January, 2000 with 91.25 per cent infestation. The pest was not observed on the mulberry crop during summer months i.e., from March to June. The incidence of the leaf roller was positively correlated with the relative humidity ($r = 0.429$) and negatively correlated with the maximum and minimum temperature ($r = -0.54, -0.70$) respectively and sun shine hours ($r = -0.46$). The total rainfall and wind velocity did not have any significant effect on the incidence of the pest.

Keywords : Leaf roller, *Diaphania pulverulentalis*, mulberry, seasonal incidence.

INTRODUCTION

The mulberry leaf is the only source of food for rearing of silkworm *Bombyx mori* L. Hence, leaf production using recommended mulberry package of practices coupled with integrated nutrient and pest management systems is very essential. Due to its perennial nature and luxuriant foliage throughout the year, the mulberry plant offers food and shelter for a variety of insect and non-insect pests. So far, over 300 insect and non-insect species are reported infesting one or the other part of the mulberry plant (Kotikal, 1982; Reddy and Kotikal, 1988). The incidence of different pest species varies with the seasons. Recently the lepidopteran leaf roller *Diaphania pulverulentalis* (Hampson) has attained a serious pest status in the South of India during rainy and winter months with high percentage of infestation (Sengupta *et al.*, 1990; Siddegowda *et al.*, 1995; Anonymous, 1996; 1997; Geethabai *et al.*, 1997; Anonymous, 1998; Rajadurai *et al.*, 1999). Hence, the study was undertaken to investigate the seasonal incidence of the mulberry leaf roller in the Bangalore Rural district of Karnataka state, where it was reported for the first time.

MATERIAL AND METHODS

A detailed survey on the occurrence of the pest on the mulberry was conducted in four villages of Kanakapura taluk, Bangalore Rural district. The observations were recorded on the number of larvae per shoot and per plant and the extent of the shoot damage. A detailed proforma was prepared and employed for gathering the necessary information in four villages i. e., Marasandra, Hoskote, Ramakrishnapuranadoddi and Kulumbhimasandra where the sericulture is practiced by most of the

* Department of Entomology, UAS, GKVK, Bangalore—65, India.

farmers. Four mulberry gardens cultivated with the variety Kanva-2 with 3 × 3 feet spacing, one garden in each village were selected to study the incidence of the leaf roller from the month of April 1999 to March 2000. During sampling 100 plants in each garden (20 each at four corners and 20 plants from the middle of the plot) were selected. The percent infestation was worked out by counting the number of plants infested (one shoot / plant) from the total selected plants.

$$\text{Per cent infestation} = \frac{\text{Number of plants infested}}{\text{Total number of plants selected}} \times 100$$

Separate observations were recorded for all the four plots and the average infestation was calculated. The leaf roller infestation was correlated with the abiotic factors like total rainfall, maximum and minimum temperature, relative humidity, sunshine hours and wind velocity which were collected from the meteorological unit of Karnataka State Sericulture Research and Development Institute (KSSR&DI) Thalagattapura, Bangalore.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the field survey on the seasonal incidence of *D. pulverulentalis* showed that the infestation started from July and remained until the month of February. The peak incidence was noticed in January (91.15%) followed by December (90.25%), November (86.75%) and October (81.65%). The pest infestation was not recorded during March, April, May and June which are summer

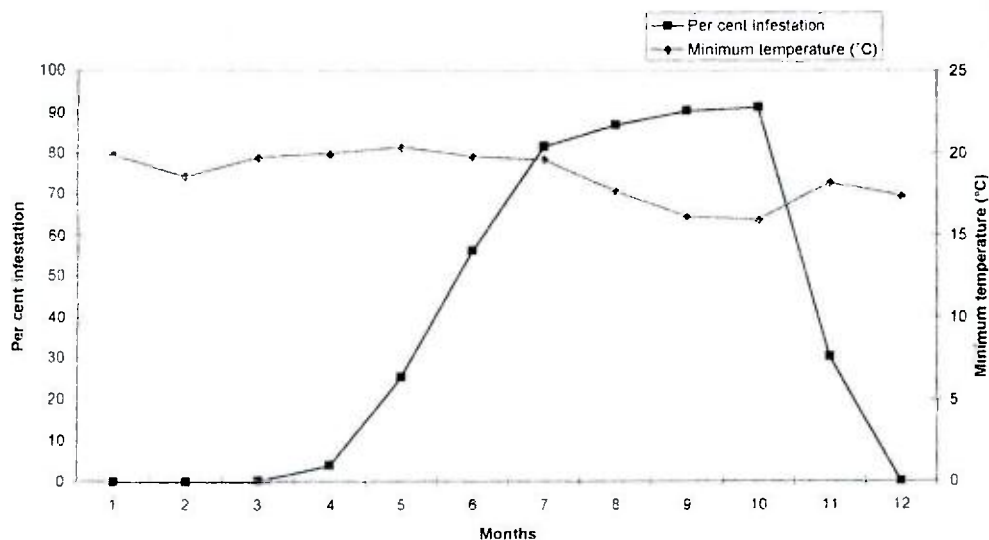


Fig. 1. Graphical representation of per cent infestation with minimum temperature (°C).

Fig. 1. Représentation graphique du pourcentage d'infestation avec la température minimum (°C).

1 = April 1999 / Avril 1999; 2 = May / mai; 3 = June / juin; 4 = July / juillet; 5 = August / août; 6 = September / septembre; 7 = October / octobre; 8 = November / novembre; 9 = December / décembre; 10 = January 2000 / janvier 2000; 11 = February / février; 12 = March / mars.

months (Table I). These observations are in conformity with the findings of Siddegowda *et al.*, (1995) who observed the incidence of *Diaphania* sp. on mulberry from October to February with infestation levels upto 100 per cent and 0 to 30 per cent during summer months (March to June). Similarly, Geethabai *et al.*, (1997) recorded the incidence of this pest on mulberry from June to February with high population levels from October onwards.

Table I. Seasonal incidence of the leaf roller, *D. pulverulentalis* on mulberry.

Tableau I. Incidence saisonnière de l'enrouleur de la feuille, *D. pulverulentalis* sur le mûrier.

Month	Per cent infestation*
Mois	Pourcentage d'infestation*
April 1999 / avril 1999	0.00
May / mai	0.00
June / juin	0.00
July / juillet	3.75
August / août	25.15
September / septembre	56.00
October / octobre	81.65
November / novembre	86.75
December / décembre	90.25
January 2000 / janvier 2000	91.15
February / février	30.25
March / mars	0.00

* Mean of two observations at fortnightly interval / Moyenne de deux observations avec un intervalle de 15 jours.

N = 400 plants

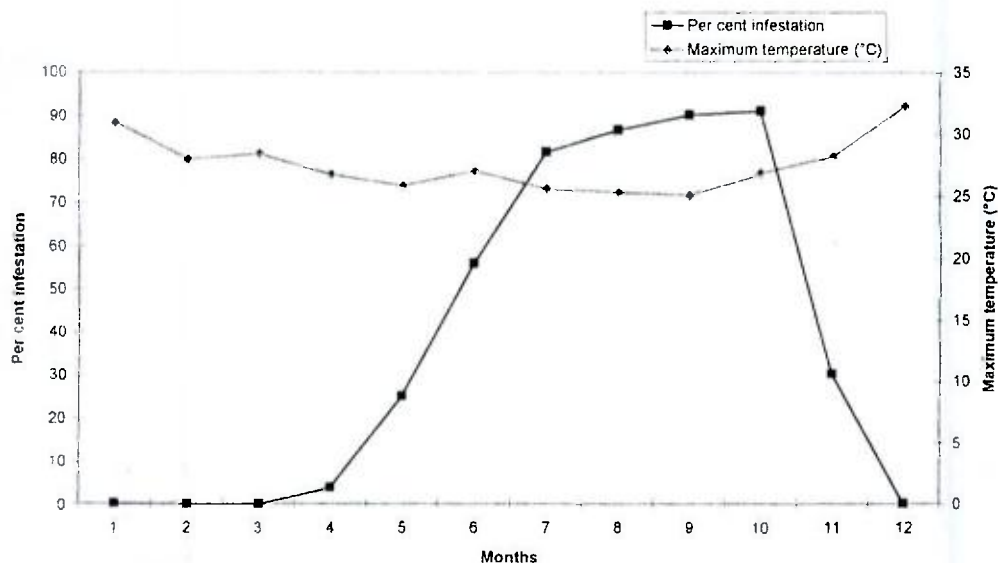


Fig. 2. Graphical representation of per cent infestation with maximum temperature (°C).

Fig. 2. Représentation graphique du pourcentage d'infestation avec la température maximum (°C).

1 = April 1999 / Avril 1999; 2 = May / mai; 3 = June / juin; 4 = July / juillet; 5 = August / août; 6 = September / septembre; 7 = October / octobre; 8 = November / novembre; 9 = December / décembre; 10 = January 2000 / janvier 2000; 11 = February / février; 12 = March / mars.

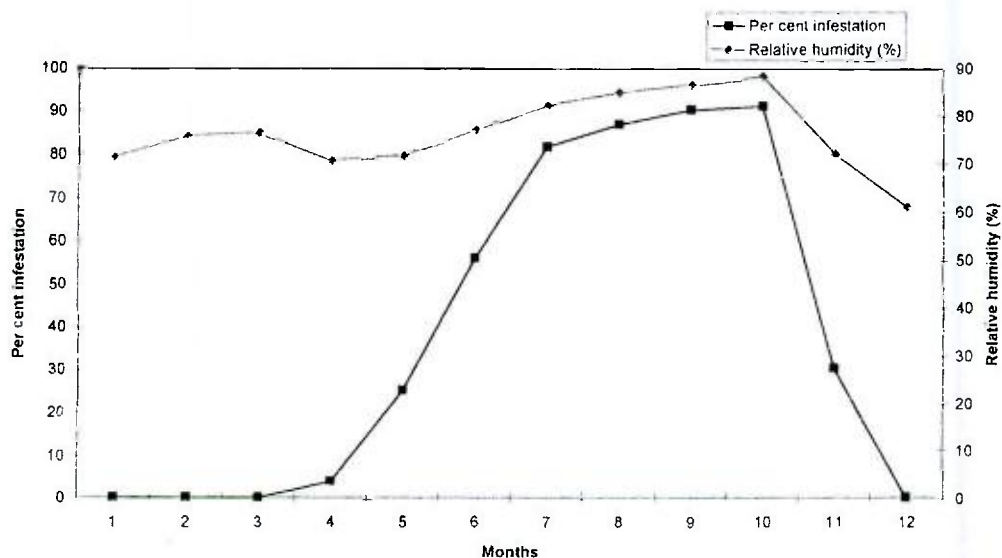


Fig 3. Graphical representation of per cent infestation with relative humidity (%).

Fig 3. Représentation graphique du pourcentage d'infestation avec l'humidité relative (%).

1 = April 1999 / Avril 1999; 2 = May / mai; 3 = June / juin; 4 = July / juillet; 5 = August / août; 6 = September / septembre; 7 = October / octobre; 8 = November / novembre; 9 = December / décembre; 10 = January 2000 / janvier 2000; 11 = February / février; 12 = March / mars.

Table II. Simple and partial regression co-efficient of certain abiotic factors influencing the percent infestation of the leaf roller, *D. pulverulentalis* on mulberry.

Tableau II. Coefficients de régression simple et partielle de certains facteurs abiotiques influençant le pourcentage d'infestation de l'enrouleur de la feuille, *D. pulverulentalis* sur le mûrier.

n = 24

Variable	Correlation coefficient	Partial regression co-efficient	Standard error	't' value	R ²
	Coefficient de corrélation	Coefficient de régression partielle	Ecart type	Valeur 't'	R ²
Maximum temperature (° C) <i>Température maximum (° C)</i>	-0.540**	-13.858	6.852	-2.022	
Minimum temperature (° C) <i>Température minimum (° C)</i>	-0.700**	-12.552	4.044	-3.103	
Relative humidity (%) <i>Humidité relative (%)</i>	0.429*	2.211	1.469	1.504	0.490*
Total rainfall (mm) <i>Précipitations totales (mm)</i>	-0.127 ^{NS}	-0.067	0.166	-0.407	
Sunshine hours(hr / day) <i>Heures de soleil (hr / jour)</i>	-0.460*	-12.311	7.502	-1.641	
Wind velocity (Km / h) <i>Vélocité du vent (Km / h)</i>	0.064 ^{NS}	1.339	6.602	0.202	

** Significant at 1% level (0.513) / *Significatif au seuil de 1 % (0,513).*

* Significant at 5% level (0.396) / *Significatif au seuil de 5 % (0,396).*

NS – Non significant / *Non significatif.*

The simple correlation analysis showed that there was a significant positive relationship between pest population and the relative humidity ($r = 0.429$), a negative correlation with sunshine hours per day ($r = -0.46$), maximum temperature ($r = -0.540$) and minimum temperature ($r = -0.70$). The wind velocity did not have any significant effect on the pest population. The partial regression coefficient showed positive association (2.211) with relative humidity. Regression equation ($R^2 = 0.490$) suggested that 49 per cent of variation in larval population was due to certain abiotic factors (Table II).

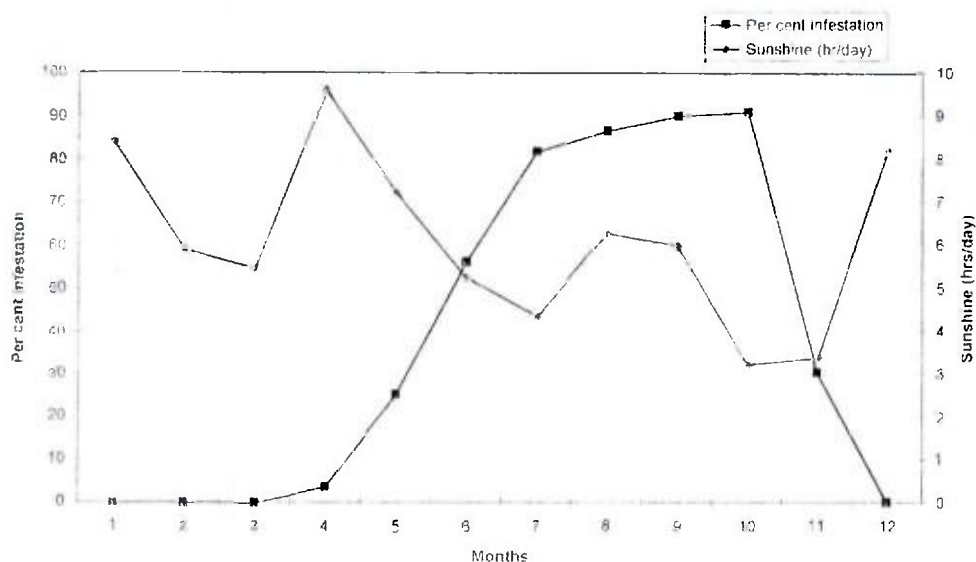


Fig. 4. Graphical representation of per cent infestation with sunshine (hrs / day).

Fig. 4. Représentation graphique du pourcentage d'infestation avec la durée d'ensoleillement. (Heures / jour).

1 = April 1999 / avril 1999; 2 = May / mai; 3 = June / juin; 4 = July / juillet; 5 = August / août; 6 = September / septembre; 7 = October / octobre; 8 = November / novembre; 9 = December / décembre; 10 = January 2000 / janvier 2000; 11 = February / février; 12 = March / mars.

The results clearly indicated that relative humidity and temperature have a significant effect on the incidence of the leaf roller (Fig. 1 to 4). This was further confirmed by the field observation that the highest infestation level was recorded during cooler months with high relative humidity.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1996) The leaf roller pest, *Diaphania (Margaronia) pulverulentalis* (Hampson) (Lepidoptera: Pyralidae). Ann. Report, KSSR & DI: 57-60.
- ANONYMOUS (1997) Bionomics and integrated control of *Spilosoma obliqua* and other important lepidopteran mulberry pests. Ann. Report, KSSR & DI: 106-107.
- ANONYMOUS (1998) Bionomics and integrated control of *Spilosoma obliqua* and other Lepidopteran mulberry pests (Seasonal occurrence of the leaf roller pest and its parasitoids) Ann. Report, KSSR&DI: 107-111.
- GEETHA BAI, M. MARIMADAI AH, B., NARAYANASWAMY K. C., RAJGOPAL D. (1997) An outbreak of leaf roller pest, *Diaphania* (= *Margaronia*), *pulverulentalis* (Hampson) on mulberry in Karnataka. Geobios News Reports, 16(2): 73-79.
- KOTIKAL Y. K. (1982) Studies on the pests of mulberry, *Morus alba* L. with special reference to Bihar hairy caterpillar, *Spilosoma obliqua* Walker (Lepidoptera: Arctiidae). M. Sc. (Agri.) Thesis, UAS, Bangalore – 65.

- RAJADURAI S., MANJUNATH D., KATYAR R. L., PRASAD K. S., SEN A. K., SHEKHAR, M. A., AHSAN M. M., DATTA R. K. (1999), Leaf roller – a serious pest of mulberry. *Indian Silk*, 37(12): 9-11.
- REDDY D.N. R., KOTIYAL Y. K. (1988) Pests of mulberry and their management. *Indian Silk*, 26: 9-15.
- SENGUPTA K., KUMAR P., BAIG M., GOVINDAIAH H. (1990), Hand book of pests and disease control of mulberry and silkworm, ESCAP, Thailand, p. 88.
- SIDDEGOWDA D. K., VINODKUMAR GUPTA, SEN A. K., BENCHAMIN K. V., MANJUNATH D., SATYAPRASAD K., MAGDUM S. B., DATTA R. K. 1995, *Diaphania* sp. infests mulberry in South India, *Indian Silk*, 34(8): 6-8.

INCIDENCE SAISONNIERE DE L'ENROULEUR DE LA FEUILLE DE MURIER, *DIAPHANIA PULVERULENTALIS* (HAMPSON) (LEPIDOPTERA : PYRALIDAE) DANS LE KARNATAKA (INDE)

R. SRINIVASA GOWDA, T. K. NARAYANASWAMY &
V. T. SANNAVEERAPPANAVAR*

Department of Sericulture, UAS, GKVK, Bangalore 65, Inde.

L'incidence saisonnière de l'enrouleur de la feuille de mûrier, *Diaphania pulverulentalis* a été étudiée dans la région rurale de Bangalore dans le Karnataka en Inde en 1999-2000. Le parasite apparut sur le mûrier en juillet 1999 et demeura actif jusqu'à février 2000. Le pic de la présence du parasite est observé en janvier 2000 avec 91,25 % d'infestation. On n'observe pas de parasite sur le mûrier pendant les mois d'été c'est à dire de mars à juin. L'incidence de l'enrouleur de la feuille est positivement corrélée avec l'humidité relative ($r = 0,429$) et négativement corrélée avec la température maximum et minimum respectivement ($r = -0,54, -0,70$) et la durée d'ensoleillement ($r = -0,46$). Les précipitations totales et la vitesse du vent n'ont pas un effet significatif sur l'incidence du parasite.

INTRODUCTION

La feuille de mûrier est la seule source de nourriture pour l'élevage du ver à soie *Bombyx mori* L. Ainsi, la production de feuilles en utilisant l'ensemble des pratiques recommandées pour le mûrier associé à un système de nutriments et de lutte contre les parasites intégrés est essentielle. En raison de sa nature vivace et de son feuillage luxuriant pendant toute l'année, le mûrier offre de la nourriture et un abri pour une variété de parasites insectes et non insectes. Jusqu'à présent on a répertorié plus de 300 espèces d'insectes et de non-insectes qui infestent une partie ou une autre du plant de mûrier (Kotikal, 1982 ; Reddy et Kotikal, 1988). L'incidence de différentes espèces d'insectes varie avec les saisons. Récemment, le lépidoptère de l'enrouleur de la feuille de mûrier *Diaphania pulverulentalis* (Hampson) a atteint un certain statut de parasite dans le sud de l'Inde pendant la saison des pluies et en hiver avec un pourcentage élevé d'infestation (Sengupta et coll., 1990 ; Siddegowda et coll., 1995 ; Anonyme, 1996 ; 1997 ; Geethabai et coll., 1997 ; Anonyme, 1998 ; Rajadura et coll., 1999). Ainsi, nous avons entrepris une étude pour étudier l'incidence saisonnière de l'enrouleur de la feuille de mûrier dans la région rurale de Bangalore dans l'état du Karnataka, où il a été signalé pour la première fois.

MATERIEL ET METHODES

Une étude détaillée sur l'occurrence du parasite sur le mûrier a été réalisée dans quatre villages de Kanakapur taluk dans la région rurale de Bangalore. Les observations sont enregistrées sur le nombre de larves par pousse et par plant et le niveau des dégâts sur la pousse. On rassemble les

* Department of Entomology, UAS, GKVI, Bangalore – 65, Inde.

informations nécessaires selon les règles dans quatre villages, c'est à dire à Marasandra, Hoskote, Ramakrishnapuranadoddi et Kulumbhimasandra où la sériciculture est pratiquée par la plupart des fermiers.

Quatre mûraies cultivées avec la variété Kanva-2 avec 90cm × 90cm d'espacement, soit une mûraie dans chaque village sont sélectionnées pour étudier l'incidence de l'enrouleur de la feuille du mois d'avril 1999 à mars 2000. Pendant l'échantillonnage 100 plants sont sélectionnés dans chaque mûraie (20 dans les quatre coins et 20 plants au milieu de la parcelle). Le pourcentage d'infestation est calculé en comptant le nombre de plants infestés (une pousse / plant) sur la totalité des plants sélectionnés.

$$\text{Pourcentage d'infestation} = \frac{\text{Nombre de plants infestés}}{\text{Nombre total de plants sélectionnés}} \times 100$$

On enregistre des observations séparées pour les quatre parcelles et l'infestation moyenne est calculée. L'infestation par l'enrouleur de la feuille est corrélée avec les facteurs abiotiques comme les précipitations totales, les températures maximum et minimum, l'humidité relative, la durée d'ensoleillement et la vitesse du vent qui sont recueillis à la station météorologique du Karnataka State Sericulture Research & Development Institute (KSSR&DI) de Thalagattapura, à Bangalore.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de l'étude sur le terrain de l'incidence saisonnière de *D. pulverulentalis* montrent que l'infestation commence en juillet et persiste jusqu'en février. On observe le pic de l'incidence en janvier (91,15 %) suivi par décembre (90,25 %), novembre (86,75 %) et octobre (81,65 %). On n'enregistre pas d'infestation par le parasite en mars, avril, mai et juin qui sont des mois d'été (Tableau I). Ces observations sont en conformité avec celles de Siddegowda et coll., (1995) qui ont remarqué l'incidence de *Diaphana* sp. sur le mûrier d'octobre à février avec des niveaux d'infestation allant jusqu'à 100 pour cent et de 0 à 30 pour-cent pendant les mois d'été (mars à juin). De même, Geethabai et coll., (1997) ont enregistré l'incidence de ce parasite sur le mûrier de juin à février avec des niveaux élevés de population à partir d'octobre.

L'analyse de corrélation simple montre qu'il y a une relation positive significative entre la population parasite et l'humidité relative ($r = 0,429$), une corrélation négative avec les durées d'ensoleillement par jour ($r = -0,46$), la température maximum ($r = -0,540$) et la température minimum ($r = -0,70$). La vitesse du vent n'a pas d'effet significatif sur la population du parasite. Le coefficient de régression partielle montre une association positive (2,211) avec l'humidité relative. L'équation de régression ($R^2 = 0,490$) suggère que 49 pour-cent de la variation dans la population larvaire est due à certains facteurs abiotiques (Tableau II).

Les résultats indiquent clairement que l'humidité relative et la température ont un effet significatif sur l'incidence de l'enrouleur de la feuille (Fig. 1 à 4). Cela a été de plus confirmé par l'observation sur le terrain comme quoi le plus haut niveau d'infestation est enregistré pendant les mois les plus froids et avec une humidité relative élevée.

NATURAL ENEMIES OF *DIAPHANIA PULVERULENTALIS* (HAMPSON) (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) INFESTING MULBERRY

R. SRINIVASA GOWDA, T. K. NARAYANASWAMY &
V. T. SANNAVEERAPPANAVAR *

Department of Sericulture, UAS, GKVK, Bangalore – 65, India.

*The incidence of natural enemies on the leaf roller **Diaphania pulverulentalis** (Hampson) infesting mulberry crop was studied in Kanakapura taluk, Bangalore Rural district during April, 1999-March, 2000. The activity of leaf roller was observed from July to February. Two braconid parasitoids i. e., **Apanteles** sp. and **Chelonus** sp. were found to be active during September to January and October to January, respectively. The larval predator **Calosoma** sp. (Carabidae: Coleoptera) was active during August to November. The two fungal pathogens i. e., **Aspergillus tamarii** (Kita) and **Beauveria bassiana** were observed to infect the pest during September to January and September to December, respectively.*

Keywords: *Diaphania pulverulentalis*, natural enemies, mulberry.

INTRODUCTION

Mulberry (*Morus* sp) the only food plant of silkworm *Bombyx mori* L. also provides food and shelter to a variety of insect and non-insect pests. So far over 300 pest species have been recorded on mulberry in different parts of the world (Reddy and Kotikal, 1988). Among the insect pests the lepidopterans often cause severe damage to the mulberry crop. In recent years, the leaf roller *Diaphania pulverulentalis* has become serious pest on mulberry in the South of India during post rainy months (Siddegowda *et al.*, 1995). A number of parasitoids and predators have been recorded on this pest, two braconid larval parasitoids i. e., *Apanteles bisulcatus* and *A. agilis* were reported to parasitize the pest (11.1 and 10.5% respectively) during December to January months (Geetha Bai *et al.*, 1997; Anon., 1998a). Further investigations at the Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, revealed the occurrence of the larval parasitoids, *Goniozus indicus* (Bethyilidae: Hymenoptera), *Eriborus argenteopilus* and the larval predator, *Calosoma* sp. (Carabidae: coleoptera). *Rihirbus trochantrichus*, *Ecanthecona furcellatus* (Reduviidae: Hemiptera) and *Menochiles sexmaculatus* (Coccinellidae: coleoptera) on the eggs of the leaf roller. In this study observations were made on the occurrence of natural enemies of the mulberry leaf roller in Kanakapura taluk, Bangalore rural district, Karnataka.

MATERIALS AND METHODS

The observations on the seasonal occurrence of natural enemies of the leaf roller were made at fortnightly intervals in four villages of Kanakapura taluk. To study the activity of parasitoids, 20

* Department of Agril., Entomology, UAS, GKVK, Bangalore – 65, India.

larvae of leaf roller (irrespective of age) were collected from each plot during every survey and maintained individually in the laboratory for parasitoid emergence. The cocoons of the different braconid parasitoids were collected separately and the extent of parasitization by each species was expressed in percentages.

The activity of the insect predators on the leaf roller was expressed as the total number of grubs of each species observed on the total number of infested plants inspected. During the survey it was found that the grubs of *Calosoma* sp. were present only on the plants which are infested by *D. pulverulentalis*. The occurrence of pathogens on the leaf roller larvae was expressed in percentages. Based on the symptoms of dead larvae, the pathogens were isolated on separate media i. e., nutrient agar medium for bacteria and mycological agar medium for entomopathogenic fungi. The fungal pathogens were identified based on the morphology of the colonies (Govindan *et al.*, 1998). Microscopic examination was also done for the virus.

RESULTS AND DISCUSSION

During the study, two hymenopteran parasitoids, *Apanteles* sp. and *Chelonus* sp. belonging to the family Braconidae were found to parasitize the larvae of the leaf roller. The *Apanteles* sp. was active on early larval instars during September to January months with a peak during October (16.25%) while *Chelonus* sp. was active on late larval instars during October to January months with a peak of 15.00% during December (Table I and Fig. 1).

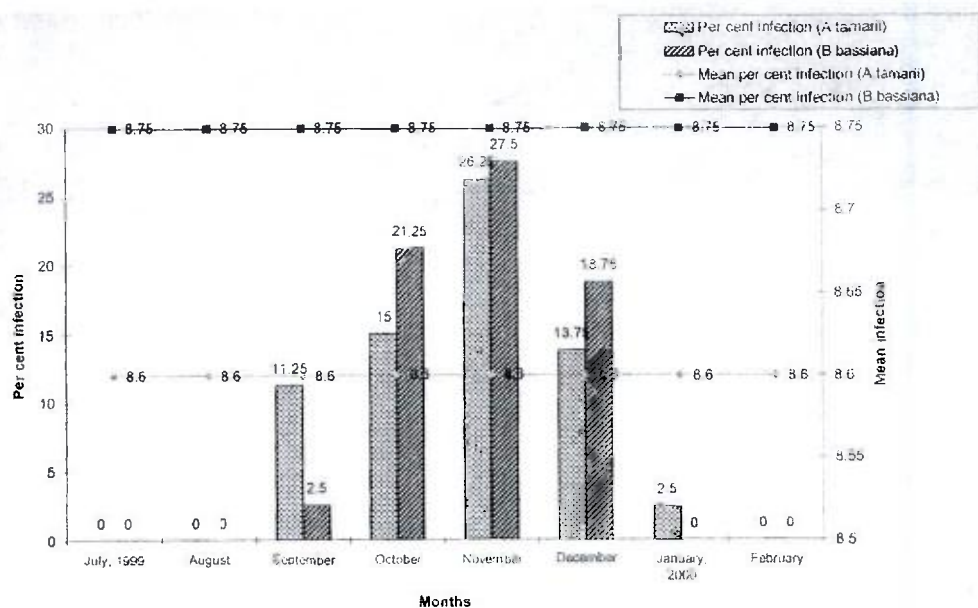


Fig. 1. Graphical representation on per cent infection of different entomopathogenic fungi on *Diaphania pulverulentalis* larvae.

Fig. 1. Représentation graphique du pourcentage d'infestation de différents champignons entomopathogènes sur les larves de *Diaphania pulverulentalis*.

Table I. Natural enemies of leaf roller, *D. pulverulentalis* on mulberry.Tableau I. Ennemis naturels de l'enrouleur de la feuille *D. pulverulentalis*.

Name	Family	Order	Stage attacked	Per cent larvae parasitised	Period of activity
<i>Nom</i>	<i>Famille</i>	<i>Ordre</i>	<i>Période d'attaque</i>	<i>Pourcentage de larves parasitées</i>	<i>Période d'activité</i>
Parasitoids / Parasitoïdes					
<i>Apanteles</i> sp.	Braconidae	Hymenoptera	Early larval instars <i>Premiers âges larvaires</i>	5.93	Sept-Jan
<i>Chelonus</i> sp.	Braconidae	Hymenoptera	Late larval instars <i>Derniers âges larvaires</i>	4.69	Oct – Jan
Predators / Prédateurs					
<i>Calasoma</i> sp.	Carabidae	Colcoptera	Larval instars <i>Âges larvaires</i>	-	Aug-Nov <i>Août - Nov.</i>
Pathogens / Pathogènes					
<i>Aspergillus tamaritii</i> (Kita)	Moniliaceae	Moniliales	Early larval instars <i>Premiers âges larvaires</i>	8.60	Sept – Jan
<i>Beauveria bassiana</i>	Moniliaceae	Moniliales	All larval instars <i>Tous les stades larvaires</i>	8.75	Sept – Dec

Similarly, Geetha Bai *et al.*, (1997) also observed *Apanteles bisulcatus* and *A. agilis* as predominant parasitoids on the leaf roller pest.

The other hymenopteran parasitoids, *Goniozus indicus* and *Eriborus argenteopilous* earlier recorded on this pest (Anon., 1998b) were not observed during this study.

The larval predator *Calosoma* sp. was found preying upon the leaf roller larvae during August to November months with a peak during September (Table I & II). Similar type of observations were also made (Anon., 1998b). The two species of fungi *Aspergillus tamaritii* (Kita) and *Beauveria bassiana* belonging to the family Moniliaceae, were found infecting the leaf roller larvae. The former was found infecting the early larval instars during September to January months, with a peak of 26.25% during November and the other on all the larval instars during September to December months with a peak of 27.50% infection during November. This might be due to the higher humidity of these months when the fungal activity is higher (Table I & Fig. 2).

Table II. Occurrence of grubs of the predator *Calasoma* sp. on *D. pulverulentalis* during different months.

Tableau II. Présence de larves du prédateur *Calasoma* sp. sur *D. pulverulentalis* pendant différents mois.

Month	No. of plants observed*	No. of grubs of <i>Calasoma</i> sp.
Mois	Nbre de plants observés*	Nombre de larves de <i>Calasoma</i> sp.
July 1999 / juillet 1999	400	0
August / août	400	3
September / septembre	400	17
October / octobre	400	10
November / novembre	400	4
December / décembre	400	0
January 2000 / janvier 2000	400	0
February / février	400	0
Mean $\pm$ SD / moyenne $\pm$ écart type	4.25 $\pm$ 5.80	

* Mean of two observations at fortnightly interval. / Moyenne de deux observations à un intervalle de quinze jours.

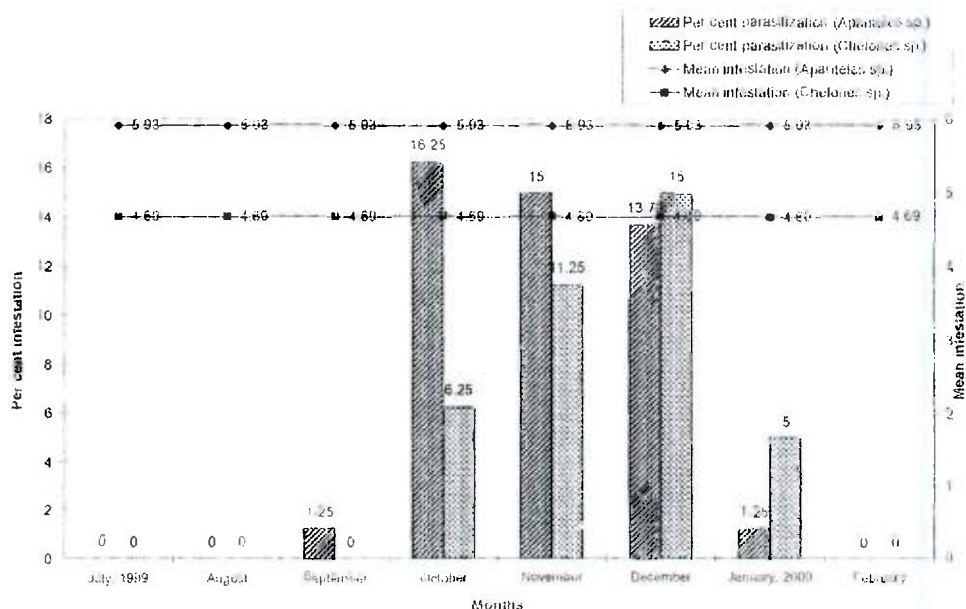


Fig. 2. Per cent parasitization of Braconid parasitoids on *Diaphania pulverulentalis* larvae during different months.

Fig. 2. Pourcentage de parasitisme des parasitoïdes Braconidés sur les larves de *Diaphania pulverulentalis* pendant différents mois.

The study has revealed the occurrence of some predators, parasitoids and pathogens on the leaf roller in the mulberry ecosystem. Further, studies are required to exploit the same for the effective management of the leaf roller as an eco-friendly approach.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1998a) Bionomics and integrated control of *Spilosoma obliqua* and the other important lepidopteran mulberry pests (seasonal incidence of the leaf roller pest and its parasitoids). Ann. Report, KSS R & DI, pp 106-109.
- ANONYMOUS (1998b) New record of natural enemies of the leaf roller *Diaphania pulverulentalis* (Lepidoptera: pyralidae) CST & TI News 7(3):2.
- GEETHA BAI, M. MARIMADIAH, B. NARAYANASWAMY K. C. & RAJGOPAL D. (1997) An outbreak of leaf roller pest *Diaphania* (= *Margarona*) *pulverulentalis* (hampson) on mulberry in Karnataka. Geobios news report 16(2): 73-74.
- GOVINDAN R., NARAYANASWAMY T. K. & DEVAIAH M. C. (1998) Principles of Silkworm Pathology. Seri Scientific Publication. P-350.
- REDDY D. N. R. & KOTIKAL Y. K. (1988) Pests of mulberry and their management, Indian silk, 28: 9-15.
- SIDDEGOWDA D. K., VINODKUMAR GUPTA, SEN A. K., BENCHAMIN K. V., MANIJUNATH D., SATHYA PRASAD K., MAGADUM S. B. & DATTA R. K. (1995) *Diaphania* sp. infests mulberry in south India. Indian silk, 39(8): 6-8.

ENNEMIS NATURELS DE *DIAPHANIA PULVERULENTALIS* (HAMPSON) (LEPIDOPTERA : PYRALIDAE) INFESTANT LE MURIER

R. SRINIVASA GOWDA, T. K. NARAYANASWAMY
& V. T. SANNAVEERAPPANAVAR *

Department of Sericulture, UAS, GKVK, Bangalore – 65, Inde.

Nous avons étudié l'incidence d'ennemis naturels de l'enrouleur de la feuille *Diaphania pulverulentalis* (Hampson) infestant la culture de mûrier dans le Kanakapura taluk, une zone rurale de Bangalore d'avril 1999 à mai 2000. Nous avons observé l'activité de l'enrouleur de la feuille de juillet à février. Nous avons trouvé deux parasitoïdes Braconidés *Apanteles* sp. et *Chelonus* sp. qui sont respectivement actifs de septembre à janvier et d'octobre à janvier. Le prédateur larvaire *Calosoma* sp. (Carabidae : Coleoptera) est actif d'août à novembre. On observe que les deux pathogènes fongiques *Aspergillus tamaritii* (Kita) et *Beauveria bassiana* infestent l'insecte respectivement de septembre à janvier et de septembre à décembre.

INTRODUCTION

Le mûrier (*Morus* sp) la seule plante hôte du ver à soie *Bombyx mori* L. fournit aussi de la nourriture et un abri à une variété de parasites insectes et non-insectes. Jusqu'à présent on a répertorié plus de 300 espèces de parasites sur le mûrier dans plusieurs endroits du globe (Reddy et Kokital, 1998). Parmi les insectes parasites, les lépidoptères causent souvent des dégâts sévères pour la culture du mûrier. Depuis quelques années, l'enrouleur de la feuille *Diaphania pulverulentalis* est devenu un parasite sérieux du mûrier dans le sud de l'Inde après la saison des pluies (Siddegowda et coll., 1995). On a répertorié un certain nombre de parasitoïdes et de prédateurs de ce parasite : on a signalé que deux parasitoïdes larvaires Braconidés *Apanteles hisulcatus* et *A. agilis* le parasitent (à respectivement 11,1 et 10,5 %) pendant les mois de décembre à janvier (Geetha Bai et coll., 1997 ; Anon., 1998a). Des études supplémentaires au Central Sericultural Research and Training Institute de Mysore révèlent la présence de parasitoïdes larvaires *Goniozus indicus* (Bethyridae : Hymenoptera), *Erihorus argenteopilus* et le prédateur larvaire, *Calosoma* sp. (Carabidae : Coleoptera), *Rihirbus trochantrichus*, *Ecanthecona furcellatus* (Reduviidae : Hemiptera) et *Menochiles sexmaculatus* (Coccinellidae : Coleoptera) sur les œufs de l'enrouleur de la feuille. Dans cette étude, nous avons fait des observations sur la présence d'ennemis naturels de l'enrouleur de la feuille de mûrier dans le taluk de Kanakapura, la zone rurale de Bangalore dans le Karnataka.

MATERIELS ET METHODES

Nous avons fait des observations sur la présence saisonnière d'ennemis naturels de l'enrouleur de la feuille tous les quinze jours dans quatre villages du taluk de Kanakapura. Pour étudier l'activité des parasitoïdes, nous avons recueilli 20 larves de l'enrouleur de la feuille (quel que soit leur âge) sur

* Department of Agril., Entomology, UAS, GKVK, Bangalore – 65, India.

chaque parcelle pour chaque étude et nous les avons maintenues individuellement dans le laboratoire pour que le parasitoïde émerge. Les cocons des différents parasitoïdes braconidés sont recueillis séparément et le degré de parasitisme par chaque espèce est exprimé en pourcentage.

L'activité des insectes prédateurs de l'enrouleur de la feuille est exprimée en tant que nombre total de larves de chaque espèce observé sur le nombre total de plants infestés inspectés. Pendant l'étude nous avons trouvé que les larves de *Calosoma* sp. ne sont présents que sur les plants qui sont infestés par *D. pulverulentalis*. La présence de pathogènes sur les larves de l'enrouleur de la feuille est exprimée en pourcentages. On isole les pathogènes sur différents milieux, milieu d'agar nutritif pour les bactéries et milieu agar mycologique pour les champignons entomopathogènes en se basant sur les symptômes des larves mortes. Les pathogènes fongiques sont identifiés d'après la morphologie des colonies (Govindan et coll., 1998). On fait aussi un examen microscopique pour les virus.

RESULTATS ET DISCUSSION

Pendant l'étude, deux parasitoïdes hyménoptères, *Apanteles* sp. et *Chelonus* sp. appartenant à la famille des Braconidae s'avèrent parasiter les larves de l'enrouleur de la feuille. *Apanteles* sp. est actif pendant les premiers âges larvaires de septembre à janvier avec un pic en octobre (16,25 %) tandis que *Chelonus* sp. est actif pendant les derniers âges larvaires d'octobre à janvier avec un pic de 15 % en décembre (Tableau I et Fig. 1).

De même, Geetha Bai et coll., (1997) ont observé *Apanteles bisulcatus* et *A. agilis* comme parasitoïdes prédominants sur l'enrouleur de la feuille.

Les autres parasitoïdes Hyménoptères, *Goniozus indicus* et *Eriborus argenteopilous* qui ont été répertoriés auparavant sur ce parasite (Anon., 1998b) ne sont pas observés pendant cette étude.

On observe que le prédateur larvaire *Calosoma* sp. a pour proie les larves de l'enrouleur de la feuille d'août à novembre avec un pic en septembre (Tableaux I & II). Des observations de type similaire ont été faites précédemment (Anon., 1998b). On trouve que les deux espèces de champignons *Aspergillus tamaris* (Kita) et *Beauveria bassiana* appartenant à la famille des Moniliaceae, infestent les larves de l'enrouleur de la feuille. On observe que le premier infeste les premiers âges larvaires de septembre à janvier avec un pic de 26,25 % en novembre et l'autre tous les stades larvaires de septembre à décembre avec un pic de 27,50 % d'infestation en novembre. Cela pourrait être dû à l'humidité plus élevée pendant ces mois qui coïncide avec une activité fongique plus élevée (Tableau I & Fig. 2).

L'étude a révélé la présence de certains prédateurs, parasitoïdes et pathogènes sur l'enrouleur de la feuille dans l'écosystème du mûrier. Il faudrait entreprendre des recherches supplémentaires pour exploiter cela pour lutter de manière efficace contre l'enrouleur de la feuille d'une manière qui n'est pas nuisible à l'environnement.

BIBLIOGRAPHIE - BIBLIOGRAPHY

Sériciculture générale	625
General sericulture	
Mûrier	627
Mulberry	
<i>Bombyx mori</i> : élevage, nutrition, pathologie	631
<i>Bombyx mori</i> : rearing, feeding, pathology	
Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie	637
Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology	
Vers à soie : génétique	639
Silkworms: genetics	
Vers à soie : physiologie, biochimie	643
Silkworms: physiology, biochemistry	
Vers à soie : oeufs, embryologie	649
Silkworms: eggs, embryology	
Vers à soie : glandes séricigènes.	651
Silkworms: silk glands	
Soie	653
Silk	

INDICATIFS DES LANGUES UTILISEES - LANGUAGE SYMBOLS USED

(Bg) Bulgare / <i>Bulgarian</i> .	(C) Chinois / <i>Chinese</i> .
(D) Allemand / <i>German</i> .	(E) Anglais / <i>English</i> .
(F) Français / <i>French</i> .	(J) Japonais / <i>Japanese</i> .
(I) Italien / <i>Italian</i> .	(Pl) Polonais / <i>Polish</i> .
(K) Coréen / <i>Korean</i> .	(R) Russe / <i>Russian</i> .
(Pt) Portugais / <i>Portuguese</i> .	(S) Espagnol / <i>Spanish</i> .
(Ro) Roumain / <i>Rumanian</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

Sericulture in Darjeeling hills.

BHUTIA R., BAGCHI S.N., DAS S.K., MONDAL K.
RSRS, CSB, Kalimpong, Darjeeling, West Bengal, India.
2001 Indian Silk, Vol. 40(5), 5-7. (E)

Socio-economic determinants of farmer oriented technology packages for sericulture. A field study.

GEETHA G.S., SRINIVASA G., JAYARAM H., IYENGAR M.N.S., VIJAYAPRAKASH N.B.
Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore 570008, India.
2001 Indian J. Seric., Vol. 40(1), 96-99.

The Comparison Test About the Adaptability of labour-saving Cultivation of Mulberry Variety.

GUOQING L., *et al.*
The Sericult. Res. Inst., Guangdong Acad. of Agricult. Sciences, Guangzhou 510640, China.
2001 Science of Sericulture, Vol. 27(3), 217-219. (C)

Management of industrial grainage and its economics.

KALAPPA H.K.
National Silkworm Seed Project, Bangalore 560068, India.
2001 Indian Silk, Vol. 40(7), 15-18. (E).

Why maximum care during Chawki (young instars) ?

KALAPPA H.K., BIRAM N.M., JAYASWAL J., REDDY S.
Central Silk Board, CSB Complex, BTM Layout, Madivala, Hosur Road, Bangalore 560068, India.
2001 Indian Silk, Vol. 40(7), 14. (E)

Prevalent rearing practices in Jammu - An overview.

KHAN R.A., RAINA S.K., DHAR A., TRIPATHI P.M., QADRI S.M.H.
Regional Sericultural Research Station, Miransahib, Jammu, India.
2001 India Silk, Vol. 40(8), 8-10. (E)

Mulberry-silkworm food chain— a templet to asses heavy metal mobility in terrestrial ecosystems.

PRINCE SP., SENTHILKUMAR P., SUBBURAM V.
Department of Environmental Sciences, Bharathiar University, Tamil Nadu, India.
2001 Environ. Manag. Assess., Vol. 69(3), 231-238. (E)

Participation of farm women in sericulture enterprise.

SARASWATHI J.M., SUMANGALA P.R.

Dept of Family Resource Management, College of Rural Home Science, Univ. Agric. Home Science, Dharwad 580005, India.

2001 Indian J. Seric., Vol. 40(1), 86-91. (E)

Use of organic manure in sericulture.

SIDDIQUI A.A., BABUDAL, DEEPAK K., AMARNATH S.

ZSSPO, CSB, Lucknow, Uttar Pradesh.

2001 Indian Silk, Vol. 40(7), 11-13. (E)

Correct usage of rotary moutage.

SINGH G.B., RAJAN R.K.

Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570008, India.

2001 Indian Silk, Vol. 40(7), 5-8. (E)

Towards an appropriate rearing house.

SWAIN J.

Commissioner, DOS, Tamil Nadu, India.

2001 Indian Silk, Vol. 40(8), 11-12. (E)

Relevance of sericulture in poverty alleviation.

SWAIN J.

Govt. of Tamil Nadu, Salem, India.

2001 Indian Silk, Vol. 40 (6), 5-8. (E)

Oak tasar culture in Uttaranchal state : role of appropriate technology India.

TIKEN SINGH N., NEGI B.S., DIMRI S., MISHRA P.N.

Appropriate Technology India, Ukhimath, Uttaranchal, India.

2001 Indian Silk, Vol. 40(5), 14-18. (E)

Sericulture in Ranga Reddy district of Andhra Pradesh.

VENKATARAMANA P., SRINIVASA RAO T.V.S.S., SREENIVASULU REDDY P., SURYANARAYANA N

Research Extension Centre, Kathua 184101, India.

2001 Indian Silk, Vol. 40(8), 19-21. (E)

Discussion on the industrialization of comprehensive development and utilization of silkworm and mulberry resources.

XIZHEN Y., SENTAI L., GENGSHENG X.

The Seric. Research Inst. of Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China.

2001 Science of Sericulture, Vol. 27(4), 297-302. (C)

The rearing technology of chinese silkworm race in southeast asian countries.

XY S., HAN Y., LU X., SHEN W., CHEN X., ZHENG B.

Biotech. Lab. for Silkworm and Silk, School of Life Science, Soochow University, Suzhou 215151, China

2001 Indian J. Seric., Vol. 40(1), 60-63. (E)

Mûrier

Mulberry

Effect of mulberry (*Morus indica* L.) therapy on plasma and erythrocyte membrane lipids in patients with type 2 diabetes.

ANDALLU B., SURYAKANTHAM V., LAKSHMI SRIKANTHI B., KESAVA REDDY G.
Dpt. of Home Science, Sri Sathya Sai Institute of Higher Learning, 515001, Andhra Pradesh, Anantapur, India.

2001 Clin. Chim. Acta, Vol. 314(1-2), 47-53. (E)

Polyhydroxylated Alkaloids Isolated from Mulberry Trees (*Morus alba* L.) and Silkworms (*Bombyx mori* L.).

ASANO N., *et al.*

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University, Ho-3 Kanagawa-machi, Kanazawa 920-1181, Japan.

2001 J. Agric. Food Chem., Vol. 49 (9), 4208-4213. (E)

Effect of some bases individually and their synergists with dimethoate and dichlorvos (DDVP) on the mulberry whitefly, *Aleuroclava* ps. Singh.

BANDYOPADHYAY U.K., SANTHAKUMAR M.V., DAS K.K., CHAKRABORTY N., SARATCHANDRA B.

Entomol. Division, Cent. Sericult. Res. and Train. Inst., Berhampore 742101, West Bengal, India.

2001 Int. J. Indust. Entomol., Vol. 3(1), 51-56. (E)

Primary Studies on the Potassium Nutrition of Mulberry Soil.

BO W., YUEMING Z.

College of Sericulture, Suzhou University, Suzhou 215151, China.

2001 Science of Sericulture, Vol. 27(3), 220-223. (C)

DNA amplified polymorphism among mulberry mutants.

FENG J., CHENGFU L., YOUZUO Z., MINGZHAI H.

Department of Sericulture and Apiculture, College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China.

2001 Science of Sericulture, Vol. 27(3), 165-169. (C)

Molecular modifications of baculoviruses for the control of forest insect pests.

FENG Q., ARIF B.M., PALLI S.R., SOHI S.S., RETNAKARAN A.

Great Lakes Forestry Centre, Canadian Forest Service, Sault Ste. Marie, Ontario, Canada, P6A 2E5.

2001 Adv. Virus Res., Vol. 57, 263-290. (E)

Effects of fluctuating temperature on mulberry sapling growth and dry matter accumulation.
FUKUI K.

National Institute of Sericultural and Entomological Science.

2001 *The Journal of Sericultural Science of Japan*, Vol.70(1),31-36.(E,j)

Importance of cultural practices in management of mulberry diseases.

GOVINDAIAH, SHARMA D.D.

Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 57008, India.

2001 *Indian Silk*, Vol.40(4),5-6. (E)

Breeding of a New Mulberry Hybridized Combination Shunnong 2 Resistant to *Pseudomonas solanacearum* Dowson.

HUASHOU C., EMU H., GUOHONG Z., MINGHAN L.

Shunde Agricultural Research Institute, Guangdong Province, Sunde 528308, China.

2001 *Science of Sericulture*, Vol. 27(3), 214-216. (C)

Recombinant baculoviruses for insect control.

INCEOGLU A.B., et al.

Dpt of Entomology and Cancer Research Center, Univ. of California, One Shields Avenue, Davis, CA 95616, USA.

2001 *Pest Manag. Sci.*, Vol. 57(10), 981-987. (E)

Studies on the Breeding of Fine Triploid Mulberry by Artificial Diploidization of Male Gamete.
JINHOU Y., XINHUA J.

Sericultural Research Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China.

2001 *Science of Sericulture*, Vol. 27(3), 177-180. (C)

Regional and varietal variation of 1-deoxynojirimycin (DNJ) content in the mulberry leaves.

KIM I., KIM J.W., LEE H.S., HA N.K., RYU K.S.

Dep. of Sericulture and Entomology, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-100, Korea

2001 *International Journal of Industrial Entomology*, Vol.2(2),141-147.(E)

SEM observations on the perithecia of *Phyllactinia corylea* causing powdery mildew disease in mulberry.

KUMAR V., DHAR A., GUPTA V.P., BABU A.M., SARKAR A., DATTA R.K.

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

2001 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 3(1), 63-67. (E)

Natural enemy complex in mulberry.

NARENDRA KUMAR J.B., MAGADUM S.B., SKIDAR A.K.

Regional Sericultural Research Station, Kodathi, Bangalore, India.

2001 *Indian Silk*, Vol. 40(5), 8-10. (E)

Insect pests of mulberry in Kerala.

PHILIP T., JOSEPHA A.V.M., SOUDAMINY P.V.

Research Extension Centre, Angamaly 683572, Kerala, India.

2002 *Indian Silk*, Vol. 40(9), 21-22. (E)

Whitefly incidence on mulberry in Andhra Pradesh.

RAJA ROPAL REDDY C., et al.

Department of Sericulture, Government of Andhra Pradesh, Anantapur, India.

2001 *Indian Silk*, Vol. 40 (6), 9-10. (E)

**Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae* pv *mori*.
RATANAPO S., NGAMJUNYAPORN W., CHULAVATNATOL M.**

Dept. of Biochemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Pholyothin Road, Chatujak, 10900, Bangkok, Thailand.

2001 Plant Sci., Vol. 160(4), 739-744. (E)

Assessment of manganese content in mulberry garden soils of West Bengal.

SAMANTA A., CHATTERJEE A.K., KAR K., MANDAL B.

Dept. of Agric. Chem. and Soil. Sci., Bidhan Chandra Krishi Viswavidyalaya, Kalyani 741235, West Bengal, India.

2001 Indian J. Seric., Vol. 40(1), 64-70. (E)

Influence of nitrogenous source fertilizers on yield and foliar constituents of rainfed mulberry.

SANNAPPA B., DEVAIAH M.C., GOVINDAN R., KRISHNA PRASAD N.K.

Department of Sericulture, UAS, GKVK, Banagalore - 65, India.

2000 Tge Mysore Journal of Agricultural Sciences, Vol.34(2),147-152. (E)

Mulberry moracins : scavengers of UV stress-generated free radicals.

SHARMA R., SHARMA A., SHONO T., TAKASUGI M., SHIRATA A., FUJIMURA T., MACHII H.

National Institute of Sericultural and Entomological Sciences (NISES), Tsukuba, Ibaraki, Japan.

2001 Biosci. Biotechnol. Biochem., Vol.65(6), 1402-1405. (E)

Diels-Alder type adducts from *Morus cathayana*.

SHEN R., LIN M.

Inst. of Materia Medica, Pecking Union Medical College, 1 Xian Nong Tan Street, 100050, People's Rep. of, Beijing, China.

2001 Phytochemistry, Vol. 57(8), 1231-1235. (E)

Cytotoxic flavonoids with isoprenoid groups from *Morus mongolica*.

SHI YQ., FUKAI T., SAKAGAMI H., CHANG WJ., YANG PQ., WANG FP., NOMURA T.

Faculty of Pharmaceutical sciences, Toho University, 2-2-1 Miyama, Funabashi, Chiba 274-8510, Japan.

2001 J. Nat. Prod., Vol. 64(2), 181-188. (E)

Breeding of new Mulberry Varieties-Nongsang 12 and Nongsang 14.

SHOUKANG L., ZHIQIANG L., DONGFENG J., GUOXIN S., YUNXIANG W.

Sericultural Research Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China.

2001 Science of Sericulture, Vol. 27(3), 210-213. (C)

Effect of salicylic acid on leaf yield and pigment content in mulberry (*morus* spp.).

SINGHVI N.R., KODANDARAMAIAH J., REKHA M., SARKAR A., DATTA R.K.

Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore 570008, India.

2001 Indian J. Seric., Vol. 40(1), 100-102. (E)

Quality evaluation of mulberry (*Morus* spp.) genotypes through bioassay under Rayalaseema conditions of Andhra Pradesh.

SUJATHAMMA P., DANDIN S.B., SAVITHRI G.

Department of Sericulture, S.P. Mahila Viswavidyalayam, Tirupati 517502, India

2001 Indian J. Seric., Vol. 40(1), 27-34. (E)

Cold acclimation - induced wap27 localized in endoplasmic reticulum in cortical parenchyma cells of mulberry tree was homologous to group 3 late-embryogenesis abundant proteins.

UKAJI N., KUWABARA C., TAKEZAWA D., ARAKAWA K., FUJIKAWA S.

Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589, Japan.

2001 Plan Physiol., Vol. 126(4), 1588-1597. (E)

Studies on the integrated effect of triacontanol and Azotobacter bio-fertilizer on mulberry leaf and silkworm cocoon yield.

VENKATARAMANA P., SANATHKUMAR Y.N., DAS P.K., DATTA R.K.

Research Extension Centre, Central Silk Board, Vikarabad 501101, India.

2001 Indian J. Seric., Vol. 40(1), 71-75. (E)

Effect of neem (*Azadirachta indica*), parthenium (*Parthenium hysterophorus*) and garlic (*Allium sativum*) extracts on the incidence of powdery mildew of mulberry caused by *Phyllactinia corylea*.

VIDYASAGAR G.M., RAJASAB A.H.

Plant Pathology Laboratory, Department of Botany, Gulbarga University, Gulbarga 585106, India.

2001 Indian J. Seric., Vol. 40(1), 81-85. (E)

Purification and characterization of three galactose specific lectins from Mulberry seeds (*Morus* sp.).

YEASMIN T., TANG M.A., RAZZAQUE A., ABSAR N.

Department of Biochemistry, University of Rajshahi, Rajshahi-6205, Bangladesh.

2001 Eur. J. Biochem., Vol. 268(23), 6005-6010. (E)

AFLP analysis of genetic background of polyploid breeding materials of mulberry.

ZHUOWEI W., MAODE Y., CHANG L., GUANGWEI Y., CHENGJUN J.

The Key Sericultural Laboratory of Agricultural Ministry, Southwest Agricultural University, Chongqing, 400716 China.

2001 Science of Sericulture, Vol. 27(3), 170-176. (C)

***Bombyx mori* : élevage, nutrition, pathologie**

***Bombyx mori* : rearing, feeding, pathology**

Inheritance of one cocoon shape mutant named "flossy cocoon" of the silkworm, *Bombyx mori*.
BANNO Y., FUJII H., DOIRA H.

Inst. of Genetic Resources, Kyushu Univ Grad. S. of Bior. and Bio. Sci., Hakozaki 6-10-1,
Fukuoka, 812-8581, Japan.

2001 Journal of Insect Biotechnology and Sericology, Vol. 70, 189-192. (E)

Identification of breeding ressource material for the development of thermo-tolerant breeds in the silkworm, *Bombyx mori*.

BEGUM NASEEMA A., BASAVARAJA H.K., REKHA M., AHSAN M.M., DATTA R.K.
Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore - 570 008, India.

2001 International Journal of Industrial Entomology, Vol.2(2),111-117. (E)

Nucleic Acid Binding Protein of *Bombyx mori* Cytoplasmic Polyhedrosis virus.

BOXIONG Z.

Department of Sericulture and Apiculture, College of Animal Sciences, Zhejiang University,
Hangzhou 310029, China.

2001 Science of Sericulture, Vol. 27(3), 193-196. (C)

Polyhedra productions of recombinant *Autographa californica* nucleopolyhedroviruses containing additional polyhedrin of *Autographa californica*, *Bombyx mori* of *Spodoptera exigua* Nucleopolyhedrovirus.

CHANG J.H., ROH J.Y., JIN B.R., JE Y.H.

School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, 103 Seodoo-Dong,
Suwon 441-744, Korea.

2001 Int. J. Indust. Entomol., Vol. 3(1), 13-18. (E)

Heterosis in relation to combining ability in multivoltine x bivoltine strains of silkworm, *Bombyx mori* L.

DATTA R.K., *et al.*

Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore 570008, India

2001 Indian J. Seric., Vol. 40(1), 1-6. (E)

Relationship of Drying Technology With Cocoon Body Temperature During Temperature Increasing Period.

FENGZHU Z., WEIGUO L., ZHIMEI M.

College of Forestry, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China.

2001 Science of Sericulture, Vol. 27(3), 206-209. (C)

Effect of potassium nitrate on the biochemical parameters of the silkworm, *Bombyx mori* L.
 GOUDAR K.S., KALI WAL B.B.
 Post-Graduate Department of Studies in zoology, Karnatak University, Dharwad 580003, India.
 2001 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 3(1), 93-96. (E)

Effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on the economic parameters of the silkworm *Bombyx mori* L.
 GOUDAR K.S., KALI WAL B.B.
 Post-Graduate Department of Studies in Zoology, Karnatak University, Dharwad 580003, India.
 2001 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 3(1), 83-88.

The effect of mineral salts, magnesium sulphate and potassium nitrate on the economic parameters of silkworm *Bombyx mori* L.
 GOUDAR K.S., KALI WAL B.B.
 Post-Graduate Department of Studies in Zoology, Karnatak University, Dharwad-580 003, India.
 2001 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 3(1), 69-73.

Study on the key techniques of artificial diet rearing for young silkworm, *Bombyx mori*.
 HONGLI W., CHENG FU L., WEI ZHENG C., YOU ZUO Z.
 Department of Sericulture, College of Forestry, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China.
 2001 *Science of Sericulture*, Vol. 27(4), 322-325. (C)

Comparison of pupation rate, whole cocoon weight and reelability percentage in hybrids performed Institute of Sericulture with those in Kanebo strain hybrids
 IIDA N.
 2001 *Journal of Dainippon Silk Foundation*, Vol. 49, 19-29. (J)

Analyses of the Copies of SSUrRNA Genes of Nine Microsporidia Pathogenic to the Silkworm, *Bombyx mori*.
 JIANYANG W., KEWEI H., YUN Z., CHANGDE L.
 The Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China.
 2001 *Science of Sericulture*, Vol. 27(3), 200-205. (C)

Management of industrial grainage and its economics (Part II)
 KALAPPA H.K.
 National Silkworm Seed Project, Bangalore 560 068, India.
 2001 *Indian Silk*, Vol. 40(8), 15-18. (E)

Comparative In Vitro analysis of geographic variants of nucleopolyhedrovirus of *Spodoptera litura* isolated from China and the Philippines.
 LAVINA-CAOILI B.A., *et al.*
 Lab. of Biodynamics, Grad. S. of Bio. Sci., Nagoya Univ., Chikusa, Nagoya 464-8601, Japan.
 2001 *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, Vol. 70, 199-209. (E)

Production of the wild entomopathogenic fungi, *Cordyceps militaris*, in the silkworm, *Bombyx mori*.
 LEE S.M., PARK N.S., CHO S.Y., HWANG J.S., JIN B.R.
 Dpt. of Seric. and Entomological Biology, Faculty of Agriculture, Miryang National University, Miryang 627-130, Korea.
 2001 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 3(1), 105-108. (E)

Some physiological and Biochemical Changes of Grown Silkworm Reared With Covering of Plastic Film.

LIANGEN S., JUNLIANG X.

Department of Sericulture and Apiculture, College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

2001 *Science of Sericulture*, Vol. 27(3), 189-192. (C)

Improved rearing for 4th instar larvae of silkworm using with simply prepared artificial diets, corresponding to repeated rearing throughout the year.

MOCHIDA Y., MATSUMOTO M.

2001 *Journal of Dainippon Silk Foundation*, Vol. 49, 37-40. (J)

Production potential of silkworm, *Bombyx mori* L. under different rearing temperatures.

MUNIRAJU E., SEKHARAPPA B.M., RAGHURAMAN R.

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Bangalore 560062, India.

2001 *Indian J. Seric.*, Vol. 40(1), 15-20. (E)

Effect of delayed brushing of black-boxed eggs on hatching and rearing performance in silkworm, *Bombyx mori* L.

MUNIRAJU E., SEKHARAPPA B.M., RAGHURAMAN R.

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore 560062, India.

2001 *Indian J. Seric.*, Vol. 40(1), 76-80. (E)

Combining ability for rearing traits among multivoltine x bivoltine hybrids of silkworm *Bombyx mori* L.

NARAYANASWAMY T.K., GOVINDAN R., ANANTHANARAYANA SR., RAMESH S.

Department of Sericulture, UAS, GKVK Bangalore - 560065, India.

2000 *The Mysore Journal of Africultural Sciences*, Vol.34(1),32-39. (E)

Stabilised chlorine dioxide - An ideal disinfectant for sericulture.

NATARAJU B., et al.

Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570008, India.

2001 *Indian Silk*, Vol. 40 (6), 11-12. (E)

A new type of sex-linked chocolate mutant, schl.

OHNUMA A.

2001 *Journal of Dainippon Silk Foundation*, Vol. 49, 1-6. (J)

Effect of photoperiod on the rearing of silkworm *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombycidae).

PORTO A.J.

Estação Experimental de Zootecnia, Instituto de Zootecnia, Caixa Postal 16, 17450-000, Galia-SP.

2000 *Boletim de Industria Animal*, Vol.57(2),105-112.(S,e)

Desinfectant spraying effects on silkworm (*Bombyx mori* L.).

PORTO A.J., OKAMOTO F.

Estação Experimental de Zootecnia, Instituto de Zootecnia, Caixa Postal 16, 17450-000, Galia, SP.

2000 *Boletim de Industria Animal*, Vol.57(2), 193-199.(S,e)

Hydro-dynamic incubator: a new device for incubation of silkworm eggs during summer.

PRASAD G.V., SURYANARAYANA N., DATTA R.K.

Research Extension Centre, Rayachoti, India.

2001 *Indian Silk*, Vol. 40(4), 7-9. (E)

Reproductive biology of the Indian ujjfly *Exorista bombycis* (Louis) a parasitoid of the mulberry silkworm *Bombyx mori* L.

SADATULLA F., SIDDAPPAJI C.

Sericulture College, Chintamani - 563 125, India.

2000 *The Mysore Journal of Agricultural Sciences*, Vol.34(1), 66-71.(E)

Ecdysis pattern of the Indian ujj flies *Exorista bombycis* (Louis), a lone parasitoid of the mulberry silkworm (*Bombyx mori* L.).

SADATULLA F., SIDDAPPAJI C.

Department of Sericulture, Sericultural College, Chintamani - 563 125, India.

2000 *The Mysore Journal of Agricultural Sciences*, Vol. 34(2)97-101. (E)

Identification of intermediary stages of *Nosema bombycis* for diagnosis of pebrine - A new approach.

SANTHA P.C., et al.

SSTL, Kodathi, Bangalore, India.

2001 *Indian Silk*, Vol. 40(6), 13-14. (E)

Rearing of a polyhybrid strain of *Bombyx mori* L. (Lepidoptera Bombycidae) on artificial diets containing different amounts of mulberry leaves.

SBRENNI G., MICCIARELLI A., CAPPELLOZZA L., CAPPELLOZZA S.

Istit. Sper. per la Zool. Agr. - Sezione Special. per la Bachicoltura di Padova, via dei Colli 28 - 35143 Padova, ITALY.

2000 *Redia*, Vol. LXXXIII, 175-186. (E)

Preliminary experiment on effects of the water dealt with magnetism on *Bombyx mori* quantitative characters.

SHENGHAI L., YAYING S.

Physics Department, Suzhou University, Suzhou 215006, China.

2001 *Science of Sericulture*, Vol. 27(4), 329-331. (C)

Space flight experiment of Chinese silkworm on board the Russian 10th Biosatellite.

SHI Z., ZHUANG D., ILYIN E.A.

Institute of Space Medico-Engineering, Beijing, China.

1998 *Adv. Space Res.*, Vol. 21 (8-9), 1145-1150. (E)

Manifestation of hybrid vigour and cocoon shape variability in F1 hybrids of the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L.

SINGH R., et al.

Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore - 570008, Karnataka, India.

2001 *International Journal of Industrial Entomology*, Vol.2(2),133-139.(E)

Line X tester analysis in sex-limited strains of mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. with coloured cocoons.

SINGH R., et al.

Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore 570008, India.

2001 *Indian J. Seric.*, Vol. 40(1), 39-43. (E)

Production potential of mulberry (*Morus* spp.) and commercial characteristics of silkworm (*Bombyx mori* L.) as influenced by exogenous supply of gibberellic acid (GA3).

SINGHVI N.R., et al.

Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore 570008, India

2001 *Indian J. Seric.*, Vol. 40(1), 50-54. (E)

Mulberry nutrition and Flacherie occurrence at field level.

SUBBASWAMY M.R. *et al.*

Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura,
Mysore 570008, India.

2001 *Indian Silk*, Vol. 40(8), 13-14 (E)

Effect of light intensity and duration of egg incubation on grainage performance of *Bombyx mori*.

SUDHAKARA K., REDDY D.N.R., SANNAPPA B.

Department of Sericulture, UAS, GKVK, Bangalore - 560065, India.

2000 *The Mysore Journal of Agricultural Sciences*, Vol.34(2),11-114. (E)

Evaluation and identification of promising bivoltine hybrids of silkworm, *Bombyx mori* L., for tropics.

SUDHAKARA RAO P., *et al.*

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

2001 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 3(1), 31-35. (E)

Studies on effect of high temperature on F1 hybrids between polyvoltine and bivoltine silkworm races of *Bombyx mori* L.

SURESH KUMAR N., YAMAMOTO T., BASAVARAJA H.K., DATTA R.K.

Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India.

2001 *International Journal of Industrial Entomology*, Vol.2(2),123-127.(E)

Effect of CaCO₃ on the feeding behavior of newly hatched larvae of the silkworm variety "To", *Bombyx mori*

TSUNEYAMA I., IIDA N., TANAKA Y.

2001 *Journal of Dainippon Silk Foundation*, Vol. 49, 9-16. (J)

Effect of CaCO₃ on the feeding behavior of the newly hatched larvae of the silkworm, *Bombyx mori*.

TSUNEYAMA I., TANAKA Y.

Institute of Sericulture, Iikura 1053, Ami-machi, Ibaraki, 300-0324 Japan.

2001 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 70(2), 97-101. (J)

Brief Report of Young Silkworm, *Bombyx mori*, Rearing With Pellet Artificial Diet.

WEIZHENG C., WEIGUO L., CHUNYING L., ANWEI C., HUIZI Z., SHUMIN J.

Department of Sericulture, College of Forestry, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China.

2001 *Science of Sericulture*, Vol. 27(3), 224-226. (C)

Rapid detection of multiple nucleopolyhedroviruses using polymerase chain reaction.

WOO SD.

School of Agricultural Biotechnology, College of Agriculture and Life Science, Seoul National University, Suwon, Korea.

2001 *Mol. Cells*, Vol. 11(3), 334-340. (E)

Transovarial transmission of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus in the silkworm.

XIA Q.L., ZHANG Z.F., YI Y.Z., HE J.L.

Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Zhznjiang Jiangsu, 212018, P.R., China.

2001 *International Journal of Industrial Entomology*, Vol.2(2), 119-122. (E)

Effects of time distribution of fluoride pollution in mulberry leaves at the stage of spring silkworm on the yield of silkworm cocoon.

XICHUAN B., JIANXIN W., JIN X.

Huzhou General Station of Sericultural Administration, Zhejiang Province, Huzhou 313000, China.

2001 Science of Sericulture, Vol. 27(4), 313-317. (C)

Studies on variation in the antioxidative activity of cocoon shell among strains of the silkworm *Bombyx mori*.

YAMAZAKI M., NAKAMURA N., KURIOKA A.

2001 Journal of Dainippon Silk Foundation, Vol. 49, 43-48. (J)

Additive effect of young silkworm's artificial diet with mulberry shoot powder and its processing character.

YAPING Z., QINIAN L., ANJIE W., CHAOYUN W.

Sericultural Research Institute of Shandong Province, Yantai 264002, China.

2001 Science of Sericulture, Vol. 27(4), 326-328. (C)

Studies on combining ability of female silkworm parthenogenetic clones, *Bombyx mori*.

YONGQIANG W., MENGKUI X., ZHIQI M., KERONG H., XIULING H.

Department of Sericulture and Apiculture, College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China.

2001 Science of Sericulture, Vol. 27(4), 272-276. (C)

Analysis of gene effects of cocoon characters in silkworm (*Bombyx mori* L.)

YUAN Z., ZHAOJUN W., HEYING Q., SIMEI H.

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

2001 Science of Sericulture, Vol. 27(4), 257-260. (C)

Studies on the Pathogenicity of a Microsporidium MZ1 (*Nosema* sp.) to the Silkworm, *Bombyx mori*.

ZHONGYUAN S., LI X.

The Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shenjiang 212018, China.

2001 Science of Sericulture, Vol. 27(3), 197-199. (C)

Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie

Non-mulberry silkworms : rearing, feeding, pathology

Stock maintenance in *Antheraea assama* WW. A concept.

DAS SENAPATI M., BANCHAMIN K.V., BRAHMA K.C.
CMERTI, Ladoigarh, Assam, India.

2001 *Indian Silk*, Vol. 40(8), 26-28 (E)

Collection and characteristics of the wild silkmoth, *Samia cynthia pryeri*, in Korea.

KIM B.Y., CHOI Y.W., PARK N.S., LEE S.M.

Dpt of Seric. and Entomological Biology, Faculty of Agriculture, Miryang National University,
Miryang 627-702, Korea.

2001 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 3(1), 101-103. (E)

Ovipositional behaviour of uzifly, *Blepharipa zebina* walker, an endoparasitoid of silkworm, *Antheraea mylitta* D.

KISHORE R., SHARMA S.P., THANGAVELU K.

Central Tasar Research and Training Institute, Piska Nagri, Ranchi 835303, India.

2001 *Indian J. Seric.*, Vol. 40(1), 92-95. (E)

Breeding of Big Cocoon Variety 91S20 of Chinese Tussah Silkworm.

LIJUN Y., SHUWEN R., DONGFENG W., JUAN F., TIANMAO W.

Sericultural Research Institute of Heilongjiang Province, Haerbin 150086, China.

2001 *Science of Sericulture*, Vol. 27(3), 240-242. (C)

Aruna variety, a unique host for the eri silkworm. Part2. Eri culture for stressed ecosystem.

MISRA S.D.

Experimental Field Station, Department of Zoology, J.V. University Jodhpur 342005, India.

2001 *Indian J. Seric.*, Vol. 40(1), 21-26. (E)

A path finder in tasar re-reeling.

MOON M.A., MITRA G.

Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampure,
Mysore 570008, India.

2001 *Indian Silk*, Vol. 40(8), 29-31. (E)

Integrated package for seed cocoon preservation and seed production in *A. mylitta* D.

NARAIN R., et al.

Central Sericultural Research and Training Institute, Manadavadi Road, Srirampura,
Mysore 570008, India.

2001 *Indian Silk*, Vol. 40 (6), 15-17. (E)

Foliar morphology and venation in primary and secondary food plants of muga silkworms.

PALIWAL D.P., JAYASWAL J., KHATRI R.K., PALIWAL
MSDP, P-4 Unit Tura, West Garo Hills, Meghalaya 794002, India
2001 Indian J. Seric., Vol. 40(1), 35-35. (E)

***Terminalia arjuna*: a break-through in micropropagation.**

RAMESH M., *et al.*
Plant Biotechnology Research Unit, Department of Botany, Kakatiya University, Warangal, A.P.
2001 Indian Silk, Vol. 40(4), 17. (E)

Disease management in tasar silkworms.

SAHYA A., THANGAVELU K.
Central Tasar Research & Training Institute, Nagri, Ranchi, Bihar, India.
2001 Indian Silk, Vol. 40(4), 13-16. (E)

Tasar crop planning in Bastar plateau of Chattisgarh.

SHANKAR RAO K.V.
RTRS, Jagdaplur, India.
2001 Indian Silk, Vol. 40(5), 11-13. (E)

Oak tasar egg incubation and chawki rearing management at high altitude.

SINGH N.T., MISRA P.N.
Appropriate Technology India, Ukhimath, India
2001 Indian Silk, Vol. 40(7), 19-20. (E)

Non-conventional energy for stifling of tasar cocoons.

SREENIVASA, SENGUPTA D., GHOSH S.S., THANGAVELU K.
Central Silk Board, CSB Complex, BTM Layout, Madivala, Hosur Road, Bangalore 560068, India.
2001 Indian Silk, Vol. 40 (6), 18-20. (E)

The breeding of New Tussah Variety Da San Yuan with High Diet Efficiency.

XIANMIN M., PEIFENG L.
Sericultural Research Institute of Liaoning Province, Fengcheng 118100, China.
2001 Science of Sericulture, Vol. 27(3), 236-239. (C)

Vers à soie : génétique

Silkworms : genetics

Identification and genetic mapping of RAPD markers linked to the densovirus refractoriness gene, nsd-2, in the silkworm, *Bombyx mori*.

ABE H., *et al.*

Depart. of Biol. Product., Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183-8509

2000 Genes & Genetic Systems, vol. 75(2), 93-96. (E)

A complete full-length non-LTR retrotransposon, BMC1, on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*.

ABE H., *et al.*

Depart. of Biol. Product., Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183-8509

1998 Genes & Genetic Systems, vol. 73(6), 353-358. (E)

Identification of novel random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) on the W chromosome of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, and the wild silkworm, *B. mandarina*, and their retrotransposable element-related nucleotide sequences.

ABE H., *et al.*

Depart. of Biol. Product., Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183-8509

1998 Genes & Genetic Systems, vol. 73(4), 243-254. (E)

Molecular structure of a novel gypsy-Ty3-like retrotransposon (Kabuki) and nested retrotransposable elements on the W chromosome of the silkworm *Bombyx mori*.

ABE H., OHBAYASHI F., SHIMADA T., SUGASAKI T., KAWAI S., MITA K., OSHIKI T.

Dep. of Biol. Prod., Fac. of Agr., Tokyo Univ. of Agr. and Technology Sawai-cho 3-5-8, Fuchu, Tokyo 183-8509, Japan.

2000 Mol. Gen. Genet., Vol.263,916-924.(E)

Identification of an enhancer-like element in the polyhedrin gene upstream region of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus.

ACHARYA A., GOPINATHAN K.P.

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

2001 J. Gen. Virol., Vol. 82(11), 2811-2819. (E)

AFLP analysis of Chinese mulberry wild silkworm (*Bombyx mandarina*) and domestic silkworm (*Bombyx mori*)

CHENG L., AICHUN Z., ZEYANG Z., ZHONGHUI X., CHUNLING X.

The Key Seric. Lab. of Agric. Ministry, College of Seric. and Silk, Southwest Agric. University, Chongqing 400716, China

*2001 Science of Sericulture, Vol. 27(4), 243-252. (C)****Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus chitinase gene.**

CHENGLIANG G.

Institute of Biochemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China.

*2001 Science of Sericulture, Vol. 27(4), 283-286. (C)***Rapid identification of *Bombyx mori* cells using PCR amplification following a direct procedure for genomic DNA preparation.**FUNATSUKI K., *et al.*

Division of Radiological Protection and Biology, Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku,

Tokyo 162-8640, Japan.

*2001 Journal of Insect Biotechnology and Sericology, Vol. 70(2), 129-136. (E)***Structure of the induced antibacterial protein from Tasar silkworm, *Antheraea mylitta*: implications to molecular evolution.**JAIN D., *et al.*

Structural Biology Unit, National Institute of Immunology, New Delhi 110067.

*2001 J. Biol. Chem., (E)***Generation of baculovirus expression vector using defective *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus gene maintained in *Escherichia coli* for occ+ virus production.**

JE Y.H., CHANG J.H., ROH J.Y., JIN B.R.

School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea.

*2001 International Journal of Industrial Entomology, Vol.2(2),155-160. (E)***Genetic analysis of the maternally conditioned "Mosaic of Tanaka" mutation in *Bombyx mori*.**

KAWAGUCHI Y., DOIRA H., KUSAKABE T., KOGA K.

Lab. of Silk. Sc., Fac. of Agriculture, Kyushu Univ. Grad. School, Hakozaki 6-10-1, Higashi-ku, Fukuoka 8128581, Japan.

*2001 Journal of Insect Biotechnology and Sericology, Vol. 70, 193-197. (E)***Study on Improvement of the Sex-linked Balanced Lethal Silkworm Strain by Backcross..**

KERONG H., XINRONG Z., JIANHUI H., JIANGUO X.

Sericultural Research Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China.

*2001 Science of Sericulture, Vol. 27(3), 185-188. (C)***Human serum albumin production in silkworm *Bombyx mori* fourth instar larvae.**

KOZUMA K., KATO M., HAMANO K.

Dept. of Biol. Prod., Faculty of Agric., Tokyo Univ. of Agric. & Tech., Saiwaicho 3-5-8, Fuchu, Tokyo 183-8509, Japan.

*2001 Journal of Insect Biotechnology and Sericology, Vol. 70, 183-188. (E)***Characterization of the cDNA encoding the 90 kDa heat-shock protein in the Lepidoptera *Bombyx mori* and *Spodoptera frugiperda*.**LANDAIS I., *et al.*

Laboratoire de Pathologie Comparée, INRA-CNRS-Université Montpellier II, UMR 5087, 30380 Saint-Christol-les-Alès, France

2001 Gene, Vol. 271, 223-231. (E)

Molecular cloning of the Antiapoptotic gene, p35, from *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus K1.

LEE K.S., PARK H.J., JE Y.H., SOHN H.D., JIN B.R.

College of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea.

2001 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 3(1), 25-29. (E)

Genome organization of the densovirus from *Bombyx mori* (BmDNV-1) and enzyme activity of its capsid.

LI Y., ZADORI Z., BANDO H., DUBUC R., FEDIERE G., SZELEI J., TIJSSEN P.

C.R. Microbiol. et Biotech., INRS-Inst. Armand Frappier, Univ. Quebec, 531 bd des prairies, Laval, QC, Canada H7V 1B7

2001 *J. Gen. Virol.*, Vol. 82(11), 2821-2825. (E)

Diversity, distribution, and mobility of bro gene sequences in *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus.

LOPEZ FERBER M., ARGAUD O., CROIZIER L., CROIZIER G.

Laboratoire de Pathologie Comparée, UMR 5087 INRA, CNRS, Université de Montpellier II, St Christol les Alès, France.

2001 *Virus Genes*, Vol. 22(3), 247-254. (E)

Comparison of multilocus RFLPs and PCR-based marker systems for genetic analysis of the silkworm, *Bombyx mori*.

NAGARAJU J., REDDY K.D., NAGARAJA G.M., SETHURAMAN B.N.

Labor. of Mol. Genetics, Centre for DNA Fingerprinting and Diagnostics, ECIL Road, Nacharam, Hyderabad, 560076, India.

2001 *Heredity*, Vol. 86 (5), 588-597. (E).

Molecular structure of the copia-like retrotransposable element Yokozuna on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*.

OHBA YASHI F., *et al.*

Depart. of Biol. Product., Faculty of agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183-8509

1998 *Genes & Genetic Systems*, vol 73(6), 345-352. (E)

Molecular cloning and sequencing of the ecdysteroid UDP-Glucosyl-transferase gene, EGT, from *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus K1.

PARK H.J., *et al.*

College of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea.

2001 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 3(1), 37-41. (E)

Molecular cloning and sequence analysis of the immediate early viral gene, IE1, from *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus K1.

PARK H.J., LEE K.S., JE Y.H., SOHN H.D., JIN B.R.

College of natural Resources and Life Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea.

2001 *Int. J. Indust. Entomol.*, Vol. 3(1), 43-49. (E)

Studies of the Meiotic Chromosomes of Mulberry Wild Silkworm (*Bombyx mandarina*).

PING'AN C., FANGZHOU S., YUNQIANG L.

Key Seric. Lab. of Agricult. Ministry, Col. of Sericulture and Silk, Southwest Agricult. Univ., Chongqing 400716, China.

2001 *Science of Sericulture*, Vol. 27(3), 181-184. (C)

Hybridization diversity of the chorion multigene families of *Bombyx mandarina* with reference to several genetic stocks of *Bombyx mori*.

SAKAGUCHI B., *et al.*

Lab. of Silk. Sci., Div. of Bio. & Bio. Sc., Kyushu Univ. Grad. S., Hakozaki 6-10-1, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

2001 Journal of Insect Biotechnology and Sericology, Vol. 70, 173-182. (E)

The mechanism of sex-specific splicing at the doublesex gene is different between *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*.

SUZUKI M.G., OHBAYASHI F., MITA K., SHIMADA T.

Dpt. of Agr. and Env. Biol., Gr. Sc. of Agr. and L. Sc., Univ. of Tokyo, Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku, 113-8657, Tokyo, Japan

2001 Insect Biochem. Mol. Biol., Vol. 31(12), 1201-1211. (E)

Research on the application of sch gene in the sex control of silkworm and the improvement of sex-limited male silkworm variety

YONG Z., PING C., TIANFU Z., CHENG L., ZHONGHUAI X.

The Key Seric. Lab. of Agric. Ministry, College of Seric. and Silk., Southwest Agric. Univ., Chongqing 400716, China.

2001 Science of Sericulture, Vol. 27(4), 253-256. (C)

Vers à soie : physiologie, biochimie

Silkworms : physiology, biochemistry

Rapid degradation of the silkworm diapause hormone by trypsin and its suppression by VAP-map, a synthetic analog of the cuticular peptide of silkworm, *Bm ACP-6.7* (VAP-peptide).
BABA H., KATSUZAKI H., KOMIYA T., YAMASHITA O., IMAI K.

Faculty of Bio-resources, Mie University, Tsu, Japan.

2001 Biosci. Biotechnol. Biochem., Vol. 65(5), 1033-1037. (E)

Esterase isozyme polymorphism, specific and nonspecific esterase, syngenic lines development and natural occurrence of a thermostable esterase in the tropical silkworm *Bombyx mori* L.

CHATTOPADHYAY G.K., SENGUPTA A.K., VERMA A.K., SEN S.K., SARATCHANDRA B.
Silkworm Breeding, Gen. and Mol. Biol. Lab., Central Seric. Res. and Train. Inst.,
Berhampore-742101, Murshidabad, India

2001 Insect Biochem. Mol. Biol., Vol. 31(12), 1191-1199. (E)

Ecdysteroid-induced programmed cell death and cell proliferation during pupal wing development of the silkworm, *Bombyx mori*.

FUJIWARA H., OGAI S.

Dept. of Integrated Biosci., Grad. Schl. of Frontier Sci., Univ. of Tokyo, Hongo 7-3-1, Bunkyo-ku,
Tokyo 113-0033, Japan

2001 Dev. Genes. Evol., Vol. 211(3), 118-123. (E)

Effect of cortisone and hydrocortisone on biochemical changes in the fat body and haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori* L.

GOUDAR K.S., KALI WAL B.B.

Post-Graduate Department of Studies in Zoology, Karnatak University, Dharwad-580003,
Karnataka, India.

2001 International Journal of Industrial Entomology, Vol.2(2),181-184.(E)

Effect of androstenedione and methyltestosterone on the biochemical constituents of the fat body and haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori* L.

GOUDAR K.S., KALI WAL B.B.

Post-Graduate Department of Studies in Zoology, Karnatak University, Dharwad 580003, India.

2001 Int. J. Indust. Entomol., Vol. 3(1), 89-92. (E)

Effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and Naphthoxyacetic Acid (NOA) on the biochemical changes in the fat body and haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori* L.

GOUDAR K.S., KALI WAL B.B.

Post-Graduate Department of Studies in Zoology, Karnatak University, Dharwad-580003,
Karnataka, India.

2001 Int. J. Indust. Entomol., Vol. 3(1), 7-11. (E)

The distribution of folate metabolic enzymes in the 5th instar larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. II. Enzymes catalyzing the C1-H4 folate formation and conversion.

HUANG L., ZHANG J., HAYAKAWA T., TSUGE H.

Department of Food Science, Faculty of Agriculture, Gifu University, Yanagido 1-1, Gifu 501-1193, Japan.

2001 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 70(2), 89-95. (J)

The distribution of folate metabolic enzymes in the 5th instar larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. I. Folic acid γ -glutamyl hydrolase (conjugase) and dihydrofolate reductase.

HUANG L., ZHANG J., HAYAKAWA T., TSUGE H.

Department of Food Science, Faculty of Agriculture, Gifu University, Yanagido 1-1, Gifu 501-1193, Japan

2001 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 70(2), 85-88. (J)

Binding specificity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa for purified, native *Bombyx mori* aminopeptidase N and cadherin-like receptors.

JENKINS J.L., DEAN D.H.

Dpt of Mol. Genetics, The Ohio State University, Columbus, OH 43210, USA.

2001 *BMC Biochem.*, Vol. 2(1), 12

Molecular cloning of silkworm paralytic peptide and its developmental regulation.

KAMIMURA M., NAKAHARA Y., KANAMORI Y., TSUZUKI S., HAYAKAWA Y., KIUCHI M.

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

2001 *Biochem. Biophys. Res. Commun*, Vol. 286(1), 67-73. (E)

The wings of *Bombyx mori* develop from larval discs exhibiting early differentiated state : a preliminary report.

KANGO-SINGH M., SINGH A., GOPINATHAN KP.

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

2001 *J. Biosci.*, Vol. 26(2), 167-177. (E)

Characterization of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus infection of *Spodoptera frugiperda* cells.

KATOU Y., IKEDA M., KOBAYASHI M.

Laboratory of Biodynamics, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-8601, Japan.

2001 *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, Vol. 70(2), 137-147. (E)

Molecular Cloning and Tissue Distribution of Farnesyl Pyrophosphate Synthase from the Silkworm *Bombyx mori*.

KIKUCHI K., HIRAI M., SHIOTSUKI T.

Dev. and Diff. Dpt, National Inst. of Agrob. Sciences, Owashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.

2001 *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, Vol. 70, 167-172. (E)

Isolation and characterization of an apoptosis-inhibiting component from the hemolymph of *Bombyx mori*.

KIM E.J., RHEE W.J., PARK T.H.

School of Chemical Engineering, Seoul National University, Kwanak-Gu Shilim-Dong San 56-1, Seoul 151-744, Korea.

2001 *Biochem. Biophys. Res. Commun*, Vol. 285(2), 224-228. (E)

Stress induction of Bml RNA in silkworm larvae, SINEs, an unusual class of stress genes.

KIMURA R.H., CHOUDARY P.V., STONE K.K., SCHMID C.W.

Department of Chemistry, University of California, Davis 95616, USA.

2001 *Cell Stress Chaperones*, Vol. 6(3), 263-272. (E)

Analysis of the BmDNV-2 specific DNA polymerase and the common terminal sequence binding proteins.

KOJIMA K., HIRANO A., ASANO S.I., SAHARA K., BANDO H.

Lab. of Appl. Molcc. Entomol., Divis. of Applied Biosc., Grad. School of Agric., Hokkaido Univ. Sapporo 060-8589, Japan

2001 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 70(2), 103-108. (J)

NADP-dependent malate dehydrogenase activity and associated biometabolic changes in hemolymph and fat body tissues of silkworm *Bombyx mori* L. following baculovirus infection.

KRISHNAN N., CHAUDHURI A., SENGUPTA A.K., CHANDRAA.K., SEN S.K., SARATCHANDRA B.

Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore - 742101, West Bengal, India.

2001 *International Journal of Industrial Entomology*, Vol. 2(2), 149-153. (E)

***Bombyx* cysteine proteinase inhibitor (BCPI) homologous to propeptide regions of cysteine proteinases is a strong, selective inhibitor of cathepsin L-like cystein proteinases.**

KURATA M., YAMAMOTO Y., WATABE S., MAKINO Y., OGAWA K., TAKAHASHI S.Y.

Lab. of Biochem. and Rad. Biol., Dpt of Veterinary Sciences, Fac. of Agric., Yamaguchi Univ., Yamaguchi 753-8515, Japan

2001 *J. Biochem.*, Vol. 130(6), 857-863. (E)

Modulation of leucine absorption in the larval midgut of *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae).

LEONARDI M.G., FIANDRA L., CASARTELLI M., CAPPELLOZZA S., GIORDANA B.

Dipartimento di Biologia, Università di Milano, via Celoria 26, 20133 Milano, Italy

2001 *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, Vol. 129, 665-672. (E)

Effect of Fenoxycarb on Leucine Uptake and Lipid Composition of Midgut Brush Border Membrane in the Silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae).

LEONARDI M.G., MARCIANI P., MONTORFANO P.G., CAPPELLOZZA S., GIORDANA B., *et al.*

Department of Biology, University of Milan via Celoria 26, 20133 Milan, Italy.

2001 *Pesticide Biochemistry and Physiology*, Vol. 70, 42-51. (E)

Modulation of leucine absorption in the larval midgut of *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae).

LEONARDI M.G., FIANDRA L., CASARTELLI M., CAPPELLOZZA S., GIORDANA B.

Dipartimento di Biologia, Università di Milano, via Celoria 26, 20133, Milano, Italy.

2001 *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, Vol. 129(2), 665-672. (E)

Purification and cDNA sequencing of vitellogenin of the wild silkworm, *Antheraea pernyi*.

LIANG LIU C., KAJIURA Z., SHIOMI K., TAKEI R., NAKAGAKI M.

Lab. of Silkworm Genetics and Pathology., and Tech. Shinshu Univ., Tokida 3-15-1, Ueda, Nagano, 380-8567, Japan.

2001 *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, Vol. 70(2), 95-104. (E)

Thermal stability and enzymatic activity of a smaller lysozyme from silk moth (*Bombyx mori*).

MASAKI K., AIZAWA T., KOGANESAWA N., NIMORI T., BANDO H., KAWANO K., NITTA K.

Div. of Biological Sciences, Graduate School of Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

2001 *J. Protein Chem.*, Vol. 20(2), 107-113. (E)

Induction of trimolting larvae by the imidazole compound, triflumizole, in the silkworm races with a thin cocoon filament, Hakugin and Honobono, and the resulted cocoon characters.

MIYAJIMA T., YAMAMOTO T., MASE K., IIZUKA T.

2001 *J. Seric. Sci. Jpn.*, vol. 70(1), 37-42. (J,e)

Extraction of superoxide dismutase from the tussah pupa powder.

PINGXIONG J., JUN H., FENGCAI X.

Dept. of Sericulture and Fashion, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China.

2001 *Science of Sericulture*, Vol. 27(4), 332-334. (C)

Antennal SNMPs (sensory neuron membrane proteins) of Lepidoptera define a unique family of invertebrate CD36-like proteins.

ROGERS M.E., KRIEGER J., VOGT R.G.

Department of Biological Sciences, University of South Carolina, Columbia, South Carolina, 29208 USA.

2001 *J. Neurobiol.*, Vol. 49 (1), 47-61. (E)

Changes of the superoxide dismutase activity in the Haemolymph of *Antheraea pernyi*.

RUNXI X., JIANNAN L.

Dept of Sericulture, College of Biological Science and Technology, Shengyang Agric. Univ., Shengyang 110161, China.

2001 *Science of Sericulture*, Vol. 27(4), 293-296. (C)

Nucleotide and deduced amino acid sequences of cDNA encoding a lipocalin protein in the central nervous system of *Bombyx mori*.

SAKAI M., WU C., SUZUKI K.

Departement of Agro-Bioscience, Faculty of Agriculture, Iwate UNiversity, Ueda 3-18-8, Morioka 020-8550, Japan.

2001 *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, Vol. 70(2), 105-111.(E)

Influence of a JH-mimic BPE epoxide on the commercial traits of silkworm, *Bombyx mori* L.

SASHINDRAN NAIR K., *et al.*

Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore 570008, India

2001 *Indian J. Seric.*, Vol. 40(1), 44-49. (E)

Molecular cloning of a functional allatostatin gut/brain receptor and an allatostatin preprohormone from the silkworm *Bombyx mori*.

SECHER T., *et al.*

Department of Cell Biology, University of Copenhagen, Copenhagen DK-2100.

2001 *J. Biol. Chem.*, (E)

Molecular cloning of *Bombyx* cerebral opsin (boceropsin) and cellular localization of its expression in the silkworm brain.

SHIMIZU I., YAMAKAWA Y., SHIMAZAKI Y., IWASA T.

Division of Mol. Ecology, Center for Ecological Research, Kyoto University, Kamitanakami, Otsu, Shiga, 522-2113, Japan

2001 *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 287 (1), 27-34. (E)

Mass isolation of cuticle protein cDNAs from wing of *Bombyx mori* and their characterizations.

TAKEDA M., MITA K., QUAN G., SHIMADA T., OKANO K., KANKE E., KAWASAKI H.

Faculty of Agriculture, Utsunomiya University, 350 Mine, Utsunomiya, 321-8505, Tochigi, Japan.

2001 *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 31(10), 1019-1028. (E)

A receptor type guanylyl cyclase expression is regulated under circadian clock in peripheral tissues of the silkworm: Light-induced shifting of the expression rhythm and correlation with eclosion.

TANOUE S., NISHIOKA T.

Laboratory of Insect Physiology, Kyoto University, Kyoto 606-8502.

2001 *J. Biol. Chem.*

Identification of a receptor type guanylyl cyclase in the antennal lobe and antennal sensory neurons of the silkworm, *Bombyx mori*.

TANOUE S., SUMIDA S., SUTSUGU T., ENDO Y., NISHIOKA T.

Lab. of Insect Physiol., Grad. School of Agr. Sci., Kyoto Univ., Kitashirakawa, Sakyo-ku, 606-8502, Kyoto, Japan.

2001 *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 31(10), 971-979. (E)

Insect photoperiodism and circadian clocks : models and mechanisms.

TAUBER E., KYRIACOU BP.

Department of Genetics, University of Leicester, UK.

2001 *J. Biol. Rythms*, Vol. 16(4), 381-390. (E)

Ecdysone-inducible foreign gene expression in stably-transformed lepidopteran insect cells.

TOMITA S., KAWAI Y., WOO S.D., KAMIMURA M., IWABUCHI K., IMANISHI A.S.

Dpt of Insect Genet. and Breeding, Nat. Inst. of Sericultural and Entomol. Science, Tsukuba, Japan

2001 *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, Vol. 37(9), 564-571. (E)

The juvenile hormone binding protein of silkworm haemolymph : gene and functional analysis.

VERMUNT AM., KAMIMURA M., HIRAI M., KIUCHI M., SHIOTSUKI T.

National Institute of Agrobiological Sciences, MAFF, Ohwashi 1-2,

Tsukuba - Ibaraki 305-8634, Japan.

2001 *Insect Mol. Biol.*, Vol. 10(2), 147-154. (E)

Diversity of pupal development of Chinese and Japanese *Bombyx mandarina moore*.

WEIDE S., ZHENGGUO W., YUQING Z., YUTING H.

Sericultral Department, School of Life Science, Zuzhou University, Zuzhou 215151, China.

2001 *Science of Sericulture*, Vol. 27(4), 277-282. (C)

Effects of different inducements on esterase proteins in the hemolymph of diapausing pupae of oak silkworm, *Antheraea pernyi*

WENCHU L.

Dept. of Sericulture and Fashion, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China.

2001 *Science of Sericulture*, Vol. 27(4), 287-292. (C)

Identification of three annexin IX isoforms generated by alternative splicing of the carboxyl-terminal exon in silkworm, *Bombyx mori*.

XIA Q.Y., FUJII H., KUSAKABE T., BANNO Y.

Institute of Genetic Resources, Fac. of Agric., Kyushu Univ. 6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, 812-8581, Fukuoka, Japan.

2001 *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 32(1), 9-14. (E)

Isolation and expression of cathepsin B cDNA in hemocytes during metamorphosis of *Bombyx mori*.

XU Y., KAWASAKI H.

College of Animal Sciences, Zhejiang University, 310029, Hangzhou, PR China.

2001 *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 130(3), 393-39. (E)

Effect of *Bacillus thuringiensis* and *Serratia marcescens* on the alkaline phosphatase activity in the midgut of silkworm, *Bombyx mori* L.

YUNGEN M., BHARATHI D.

Department of Sericulture and Apiculture, College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou, 310029, China.

2001 Indian J. Seric., Vol. 40(1), 103-105. (E)

Isolation and expression of an ecdysteroid-inducible neutral endopeptidase 24.11-like gene in wing discs of *Bombyx mori*.

ZHAO X., MITA K., SHIMADA T., OKANO K., QUAN G., KANKE E., KAWASAKI H.

Faculty of Agriculture, Utsunomiya University, 350 Mine, Utsunomiya, 321-8505, Tochigi, Japan.

2001 Insect Biochem. Mol. Biol., Vol. 31(12), 1213-1219.

Vers à soie : oeufs, embryologie

Silkworms : eggs, embryology

Starvation induced changes of some biomolecules in eggs and hatched larvae of indigenous strain of *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae).

CHAUDHURI A., KRISHNAN N., ROY G.C., SENGUPTA A.K., SEN S.K., SARATCHANDRA B.

Gen., Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore - 742101, West Bengal, India.

2001 *International Journal of Industrial Entomology*, Vol.2(2),107-110.(E)

Biomolecular variations in poly and bivoltine strains and their hybrids of *Bombyx mori* during embryonic development.

CHAUDHURI A., ROY G.C., KRISHNAN N., SENGUPTA A.K., SEN S.K., SARATCHANDRA B.

Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore - 742101, West Bengal, India.

2001 *International Journal of Industrial Entomology*, Vol.2(2),129-132.(E)

Regulation of diapause.

DENLINGER D.L.

Department of Entomology, Ohio State University, Columbus, Ohio 43210, USA.

2002 *Annu. Rev. Entomol.*, Vol. 47, 93-122. (E)

Amyloid-like fibrils from an 18-residue peptide analogue of a part of the central domain of the B-family of silkworm chorion proteins.

ICONOMIDOU V.A., CHRYSIKOS G.D., GIONIS V., VRIEND G., HOENGER A., HAMODRAKAS S.J.

Department of Cell Biology and Biophysics, University of Athens, Greece.

2001 *FEBS lett.*, Vol. 499(3), 268-273. (E)

Multiple gene expression up-regulated by diapause hormone in developing ovaries of the silkworm, *Bombyx mori*.

KATAGIRI N., IMAI K., YAMASHITA O.

Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-8601, Japan

2001 *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, Vol. 70(2), 113-120.(E)

Fertilization and the first cleavage mitosis in insects.

KAWAMURA N.

Biology Laboratory, Rakuno Gakuen University, 582 Bunkyo-dai Midorimachi, Ebetsu 069-8501, Japan.

2001 *Dev. Growth Differ.*, Vol. 43(4), 343-349. (E)

Parthenogenesis and cloning in the silkworm *Bombyx mori* L.: problems and prospects

KLYMENKO V.V.

Lab. Insect Gen. Biosec., Graduate S. of Agric. & Life Sci., Univ. Tokyo, Yayoi 1-1-1, Bunkyo, Tokyo 113-8657, Japan.

*2001 Journal of Insect Biotechnology and Sericology, Vol. 70, 155-165. (E)***Formulation of the relationship between incubation temperature and growth rate in embryonic development in post-diapausing eggs of silkworm, *Bombyx mori*, and their low development threshold temperature.**

MOCHIDA Y., MATSUMOTO M., HORIE Y.

*2001 Journal of Dainippon Silk Foundation, Vol. 49, 31-36. (J)***Samui, a novel cold-inducible gene, encoding a protein with a BAG domain similar to silencer of death domains (SODD/BAG-4), isolated from *Bombyx* diapause eggs.**

MORIBE Y., NIIMI T., YAMASHITA O., YAGINUMA T.

Laboratory of Sericulture and Entomoresources, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ., Chikusa, Japan

*2001 Eur. J. Biochem., Vol. 268(12), 3432-3442. (E)***Molecular cloning and expression of cDNAs encoding Testis-specific and non-specific atpase inhibitor - like proteins in *Bombyx mori*.**

OGURA I., KUSAKABE T., KAWAGUCHI Y., MAEDA T., KOGA K.

Lab. of Silkworm Science, Kyushu University Graduate School of Bioresource, Hakozaki 6-10-1, Fukuoka 812-8581, Japan.

*2001 Journal of Insect Biotechnology and Sericology, Vol. 70(2), 121-128. (E)***Effect of pebrine infection on fecundity and egg retention in silkmoth, *Antheraea Mylitta* D. in different seasons.**

RATH S.S., OJHA N.G., SINGH B.M.K.

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

*2001 Indian J. Seric., Vol. 40(1), 7-14. (E)***Cold acclimation - induced wap27 localized in endoplasmic reticulum in cortical parenchyma cells of mulberry tree was homologous to group 3 late-embryogenesis abundant proteins.**

UKAJI N., KUWABARA C., TAKEZAWA D., ARAKAWA K., FUJIKAWA S.

Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589, Japan.

*2001 Plant Physiol., Vol. 126(4), 1588-1597. (E)***Biochemical Effects and RAPD Analysis of N+ Beams Implantation Into Silkworm Eggs.**

YAN M., HOURONG X., ZHENGLONG Z., CHENG L., ZHONGHUAI X.

Department of Sericulture and Silk, Anhui Agricultural University, hefei 230036, China.

*2001 Science of Sericulture, Vol. 27(3), 227-232. (C)***Studies on temperature-sensitivity of sch in embryonic period using mRNA differential display.**

YINGXIA L., CHENG L., GUANRONG L., QINGYOU X., ZEYANG Z., ZHONGHUAI X.

The Key Seric. Lab. of Agric. Ministry, College of Seric. and Silk, Southwest Agric. Univ., Chongqing 400716, China.

2001 Science of Sericulture, Vol. 27(4), 267-271. (C)

Vers à soie : glandes séricigènes

Silkworms : silk glands

Cloning and comparison of *Bombyx mori* fibroin light-chain gene.

CHENGGANG Z., YONGFENG J., YAOZHOU Z., YUCHENG W.

Bioch. Res. Inst. of Zhejiang Univ. College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China.

2001 *Science of Sericulture*, Vol. 27(4), 261-266. (C)

Purification and characterization of fibroin from the tropical saturniid silkworm, *Antheraea mylitta*.

DATTA A., GHOSH AK., C KUNDU S.

Department of Biotechnology, Indian Institute of Technology, 721302, Kharagpur, India.

2001 *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 31(10), 1013-1018. (E)

Spider flagelliform silk : lessons in protein design, gene structure, and molecular evolution.

HAYASHI CY., LEWIS RV.

Department of Molecular Biology, University of Wyoming, Laramie, USA.

2001 *Bioessays*, Vol. 23(8), 750-756 (E)

Fibrillation of silk fibers from Japanese oak silkworm, *Antheraea yamamai*.

KAWAHARA Y., HANANOUCI T., TSUJI M., KIMURA T., KOHJIYA S.

Div. of Adv. Fibro-Science, Grad. School, Kyoto Inst. of Tech., Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan

2001 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 70(2), 109-115. (J)

The presence of estradiol-17beta and its specific binding sites in posterior silk gland of *Bombyx mori*.

KESHAN B., RAY A.K.

Department of Animal Physiology, Bose Institute, Calcutta, India

2001 *Gen. Comp. Endocrinol.*, Vol. 123 (1), 23-30. (E)

Changes in element composition along the spinning duct in a *Nephila* spider.

KNIGHT DP., VOLRATH F.

Zoology Department, University of Oxford, United Kingdom.

2001 *Naturwissenschaften*, Vol. 88(4), 179-182. (E)

The natural silk spinning process.

LI G., ZHOU P., SHAO Z., XIE X., CHEN X., WANG H., CHUNYU L., YU T.

The Key Lab. of Mol. Eng. of Polymers, Min. of Ed., Macrom. Sc. Dpt and Inst. of Genet., Fudan Univ., Shanghai, China

*2001 Eur. J. Biochem., Vol. 268(24), 6600-6606. (E)***Development of a realistic visualization system of silkworm spinning behaviour using a personal computer and OpenGL.**MOCHIZUKI S., *et al.*

Fujitsu SSL, Kosugicho 1-403, Nakahara, Kawasaki 211-0063, Japan.

*2001 Journal of Insect Biotechnology and Sericology, Vol. 70, 211-216. (E)***Identification of four small molecular mass proteins in the silk of *Bombyx mori*.**

NIMALA X., MITA K., VANISREE V., ZUROVEC M., SEHNAL F.

Institute of Entomology, University of South Bohemia, Branisovska, Ceske Budejovice, Szech Republic

*2001 Insect Molecular Biology, Vol. 10(5), 437-445. (E)***Insect silk contains both a Kunitz-type and a unique Kazal-type proteinase inhibitor.**

NIRMALA X., KODRIK D., ZUROVEC M., SEHNAL F.

Ent. Inst., Acad. of Sci., the Fac. of Biol. Sci., Univ. of South Bohemia, Branisovska Ceske Budejovice, Czech Republic

*2001 Eur. J. Biochem., Vol. 268, 2064-2073. (E)***Production of spider silk proteins in tobacco and potato.**

SCHELLER J., GUHRS KH., GROSSE F., CONRAD U.

Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben, 3, D-06466 Gatersleben, Germany.

*2001 Nature Biotechnology, Vol. 19(9), 573-577. (E)***Reduction-oxidation control of beta-sheet assembly in genetically engineered silk.**

SZELA S., AVTGES P., VALLUZZI R., WINKLER S., WILSON D., KIRSCHNER D., KAPLAN D.

Dpt of Chem. Engineering, Biotechnology Center, Tufts University, 4 Colby Street, Medford, Massachusetts 02155, USA.

*2000 Biomacromolecules, Vol. 1(4), 534-542. (E)***Identification and characterization of a silk gland-related matrix association region in *Bombyx mori*.**

ZHOU C., LIU B.

Dpt of Mol. and Cell Biol., School of Life Sciences, Univ. of Sc. and Tech. of China, Hefei, 230027, PR, Anhui, China.

2001 Gene, Vol. 277(1-2), 139-144. (E)

Soie

Silk

On the characteristic function of distribution of non-broken filament length of cocoon and its applications.

BAI L., WANG J., ZHOU Z.

2001 The Journal of Sericultural Science of Japan, Vol. 70(1), 17-22. (J,e)

On the division of distribution of non-broken filament length of cocoon.

BAI L., WANG J., ZHOU Z.

2001 The Journal of Sericultural Science of Japan, Vol. 70(1), 23-29. (J,e)

Application of lac dye on tasar silk.

GHOSH S.S., SREENIVASA D., SENGUPTA D., THANGAVELU K.

Central Tasar Research and Training Institute, Nagri, Ranchi, Jharkhand.

2001 Indian Silk, Vol. 40(4), 27-29. (E)

Effect of formic acid treatment on dyeing of mulberry and tasar silk using procian H dye.

GROVER E., GAHLOT M.

Dept. of Clothing and Textiles, College of Home Sci., GB. Pant Univ. of Agr. and Tech., Pantnagar, Uttar Pradesh, India.

2001 Indian Silk, Vol. 40(5), 19-21. (E)

Dyeing property of chitosan-treated tussah silk fabrics by direct dyes.

KAKO T.

Himeji Inst. of Tech., Sch. of hum. for envir. pol. and technol. Schinzaike-Hontyo 1-1-12, Himeji, Hyogo 670-0092, Japan

2001 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 70(2), 117-122. (J)

Poly(e-caprolactone-coD, L-lactide) /silk fibroin composite materials : preparation and characterization.

KESENCI K., MOTTA A., FAMBRI L., MIGLIARESI C.

Department of Materials Engineering, University of Trento, Italy.

2001 J. Biomater. Sci. Polym. Ed., Vol. 12(3), 337-351. (E)

Biomedical applications of silk protein.

KWEON H.Y., CHO C.S.

School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Suwon 441-774, Korea.

2001 Int. J. Indust. Entomol., Vol. 3(1), 1-6. (E)

Structures and physical properties of cross-linked sericin membranes.

NAGURA M., OHNISHI R., GITO H. Y., OHKOSHI Y.

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, 3-15-1 Tokida,
Ueda 386-8567, Japan.*2001 Journal of Insect Biotechnology and Sericology, Vol. 70(2), 149-153. (E)***Refined molecular and crystal structure of silk I based on Ala-Gly and (Ala-Gly) (2)-Ser-Gly peptide sequence.**

OKUYAMA K., SOMASHEKAR R., NOGUCHI K., ICHIMURA S.

Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo 184, Japan

*2001 Biopolymers Vol. 59 (5), 310-319. (E)***Natural dyes from copper-leaf plant**

Parul, JAHAN S.

College of Home Science, G.B. Pant University, Pantnagar, Uttar Pradesh, India.

*2002 Indian Silk, Vol. 40(9), 31-34. (E)***Self-Assembly of beta-Sheets into Nanostructures by Poly(alanine) segments incorporated in multiblock copolymers inspired by spider silk.**

RATHORE O., SOGAH D.Y.

Department of Chemistry and Chemical Biology, Cornell University, Baker Laboratory, Ithaca, New York 14853-1301, USA.

*2001 J. Am. Chem. Soc., Vol. 123(22), 5231-5239. (E)***Microstructural homogeneity of support silk spun by *Eriophora fuliginea* (C.L.Koch) determined by scanning X-ray microdiffraction.**

RIEDEL C., CRAIG C.L., BURGHAMMER M., MÜLLER M.

European Synchrotron Radiation Facility, BP 220, 38043 Grenoble Cedex, France.

*2001 Naturwissenschaften, Vol. 8, 67-72. (E)***Spider silk fibre extrusion : combined wide- and small-angle X-ray microdiffraction experiments.**

RIEDEL C., VOLLRATH F.

European Synchrotron Radiation Facility, B.P. 220, 38043 Grenoble Cedex, France

*2001 Int. J. Biol. Macromol., vol. 29(3), 203-210. (E)***Composition of the silk lipids of the spider *Nephila clavipes*.**

SCHULZ S.

Institut für Organische Chemie, Technische Universität Braunschweig, Germany.

*2001 Lipids, Vol. 36(6), 637-647. (E)***Acid-degumming of silk and useful application of degummed residues.**

SHIOZAKI H., AOKI A., KURIOKA F., KATSUNO M.

*2001 Journal of Dainippon Silk Foundation, Vol. 49, 41-42. (J)***A simple method for orienting silk and other flexible fibres in transmission electron microscopy specimens.**

TRANCIK J.E., CZERNUSZKA J.T., MERRIMAN C., VINEY C.

University of Oxford, Department of Materials, Parks Road, Oxford OX1 3PH, U.K.

2001 J. Microsc., Vol. 203 (3), 235-238. (E)

Structural characteristics and properties of the regenerated silk fibroin prepared from formic acid.

UM I.C., KWEON H., PARK Y.H., HUDSON S.

Dept of Natural Fiber Sci, College of Agri. and Life Science, Seoul National University, 441-744, Suwon, South Korea.

2001 Int. J. Biol. Macromol., Vol 29 (2), 91-97. (E)

The effect of spinning conditions of the mechanics of a spider's dragline silk.

VOLLRATH F., MADSEN B., SHAO Z.

Department of Zoology, Universitetsparken B135, 8000 Aarhus C., Denmark.

2001 Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci., Vol. 268(1483), 2339-2346. (E)

Silk.

WILSON T.

2000 Scalpel Tongs, Vol. 44(61), 62-64. (E)

INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

1) Les articles présentés doivent concerner soit des travaux originaux, soit des synthèses. Ils doivent être rédigés en français ou en anglais. Ils doivent avoir trait à la sériciculture qui inclut les vers à soie, les plantes nourricières, la filature de la soie quelle que soit la nature des recherches (fondamentales ou appliquées) et des sujets (biochimie, écologie, économie, virologie, génétique, etc.).

2) Les articles doivent être soumis à : **Dr G. CHAVANCY**. Les articles soumis au Rédacteur doivent être inédits et ne doivent pas être présentés pour publication chez un autre éditeur. Les articles acceptés pour publication dans *SERICOLOGIA* ne pourront être publiés ailleurs sous la même forme sans le consentement écrit de l'éditeur.

3) Les manuscrits et illustrations doivent être soumis en double exemplaire, l'auteur conservant une copie. Dans le cas d'une co-rédaction, les auteurs doivent indiquer le nom de celui qui recevra les épreuves.

4) Les manuscrits doivent être dactylographiés avec un double interligne et des marges importantes. Les auteurs sont priés de rédiger des communications aussi concises que possible. Les renvois de bas de page sont à éviter et les caractères en italique ne doivent pas être utilisés pour la mise en relief.

5) L'article doit être présenté de la façon suivante :

- Le titre suivi du nom de l'auteur et de son adresse complète.
- Le résumé qui doit indiquer le contenu et les conclusions de l'article et doit faire référence à des informations nouvelles. Le résumé ne doit pas excéder 200 mots et peut être divisé en paragraphes numérotés.
- Les mots clés. Une petite liste de mots clés permettant une rapide analyse du contenu de l'article et utilisable pour la compilation de l'index.
- Les articles doivent être divisés en : Introduction, Matériel et Méthodes, Résultats et Discussion. Pour les articles de synthèse, les auteurs peuvent choisir la présentation qui leur convient.
- Remerciements.
- Références. Les auteurs doivent suivre le "Harvard system". Les références doivent être données dans l'ordre suivant : nom de l'auteur et ses initiales, date (entre parenthèses), titre de l'article, nom du journal tel qu'il est abrégé dans la liste mondiale des périodiques scientifiques (4ème édit. 1963), le volume et les première et dernières pages de l'article.

Pour les livres, il est nécessaire d'indiquer le nom de l'auteur et ses initiales, la date de publication, le titre, l'édition, le nombre de pages, le nom de l'éditeur et le lieu d'édition.

Dans le texte, les références doivent être indiquées sous la forme suivante : Dupont (1964) ou (Dupont, 1964). Lorsque la référence comprend plus de deux auteurs, par exemple Dupont, Durand et Martin, l'article doit être cité comme Dupont et coll. sauf si cela peut prêter à confusion. Si l'on cite des articles d'un même auteur publiés la même année, ils doivent être distingués par les lettres a, b, etc.

La référence à un article sous presse doit signifier que l'article a été accepté pour publication et elle doit s'écrire de la façon suivante :

SETOYAMA K. (1982) Effect of water on molecular motion of silk fibroin. *J. Seric. Sci. Jpn.* Sous presse.

6) Illustrations. Le manuscrit sera accompagné de toutes les illustrations nécessaires mais celles-ci ne doivent pas être insérées dans le texte. Toutes les photographies, graphiques et diagrammes doivent être numérotés consécutivement en chiffres arabes, dans l'ordre de citation du texte.

Les photographies sur papier brillant, ou les épreuves positives (pas de négatifs ou de diapositives) doivent être envoyées si possible sans montage et en nombre limité.

Les cartes, graphiques ou diagrammes doivent être dessinés nettement à l'encre noire sur le papier ou du carton blanc de bonne qualité. Les inscriptions apparaissant sur les illustrations doivent être complètes et de taille suffisante pour permettre une réduction importante si nécessaire.

Les illustrations ne doivent pas dépasser le format 14 × 19 cm. Au dos de chaque illustration doivent être indiqués le nom de l'auteur, le n° de la figure (en chiffres arabes) et l'orientation de l'illustration si nécessaire.

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

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

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

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

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

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

INFORMATION FOR CONTRIBUTORS

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

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

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

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

5) The typescript should contain the following features:

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

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

- Acknowledgements.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

