

sericologia

Journal of the silkworms.

Revue des vers à soie.

publiée par la Commission Séricole Internationale.
25, quai Jean-Jacques Rousseau - 69350 La Mulatière - France.

Managing Director

Dr H. BOUVIER

Directeur Gérant

Editors

G. CHAVANCY
(Université Cl. Bernard, LYON, France)

Rédacteurs

A. FOURNIER
(Université Cl. Bernard, LYON, France)

EDITORIAL BOARD

CONSEIL DE REDACTION

B.H. CHOE
(SEOUL, Korea)

T. FUKUDA
(TSUKUBA, Japan)

J.P. GAREL
(LYON, France)

T. ITO
(TSUKUBA, Japan)

M.S. JOLLY
(Mysore, India)

G. REALI
(PADOVA, Italy)

J.M. LEGAY
(France)

I. LOGOFETICI
(România)

H. TOSHIO KITAHARA
(Brazil)

ERRATUM

K.L. JOSHI *

SEASONAL LIFE-TABLES OF ERI SILKWORM, PHILOSAMIA RICINI HUTT (LEPIDOPTERA : SATURNIIDAE) IN SEMI-ARID ZONE OF INDIA.

TABLES DE SURVIE DU PAPILLON ERI, PHILOSAMIA RICINI HUTT (LEPIDOPTERA : SATURNIIDAE) EN REGION SEMI-ARIDE DE L'INDE.

REFERENCES

- ANDREWARTHA H.G., BIRCH L.C., (1954), The distribution and abundance of animals; The University of Chicago press, Chicago.
- BARKALOW Jr. F.S., HAMILTON R.B., SCOTT Jr. R.F., (1970), The vital statistics of an unexploited gray squirrel population: J. Wildl. Mgmt., 34(3), p. 489-500.
- BIRCH L.C., (1948), The intrinsic rate of natural increase of an insect population: J. Anim. Ecol., 17, p. 15-26.
- COVILLE P.L., ALLEN W.W., (1977), Life table and feeding habits of Scolothrips sex-maculatus (Thysanoptera : Thripidae). AESSAI, 70(1), p. 11-16.
- DEEVEY E.S. Jr. (1947), Life tables for natural populations of animals; Quart. Rev. Biol., 22, p. 283-314.
- DHANDAPANI N., BALASUBRAMANIAN M., (1979), Life tables for gram pod borer, Heliothis armigera (Lep : Noctuidae) on cotton; J. Ent. Res., 3(2), p. 186-190.
- DHINDSA M.S., DHINDSA M.K., SEKHON B.S., (1980), Studies on the population growth of cotton leaf roller, Sylepta derogata (Pyrallidae : Lep.); Science and Culture, 46(6), p. 236-238.
- DUBLIN L.I., LOTKA A.J., (1925), On the true rate of increase as exemplified by population of the United States 1920; J. Am. Statist. A. 20, p. 305-339.
- EHRlich P.R., EHRlich A., HAND H., JOHN P., (1977), *Ecoscience : Population, Resources, Environment*, W.H. Freeman & Co., San Francisco.
- LESLIE P.H., RANSON R.M., (1940), The mortality, fertility and rate of natural increase of the vole (Microtus agrestis) as observed in the laboratory; J. Anim. Ecol., 9, p. 27-52.
- MISRA S.D., JOSHI K.L., (1980), Life table experimental of the castor silkworm, Philosamia ricini Hutt. (Saturniidae : Lepidoptera). Paper presented (in oral session) in the XVI International Congress of Entomology (August 3-9, 1980, Kyoto, Japan) and published in Study and Utilization of non-mulberry silkworm, p. 26-32 (Eds. S. Sakate and H. Yamada).
- WITTER J.A., KULMAN H.M., HODSON A.C., (1972), Life tables for the forest tent caterpillar, Malacosoma disstria (Lep. : Lasiocampidae). AESAAI, 65(1), p. 25-31.

* Further to an oversight in page setting, the references had not been enclosed in the paper published. We apologize to our readers and ask them to kindly put this fly sheet in their copy of *Sericologia* 24(2), between p. 154 and 155.

* Suite à une erreur de mise en page, les références n'avaient pas été incluses dans l'article. Nous demandons à nos lecteurs de nous excuser et de bien vouloir insérer ce feuillet dans le n° 24(2) de *Sericologia*, entre les pages 154 et 155.

Revue des vers à soie. Journal of the silkworms.

publiée par la Commission Séricicole Internationale.
25, quai Jean-Jacques Rousseau - 69350 La Mulatière - France.

CONTENTS

SOMMAIRE

International Sericultural Commission
Record and Information

Silk and Sericulture Information

Technical and Documentary Notes

Seasonal life-tables of eri silkworm, Philosamia ricini Hutt (Lepidoptera : Saturniidae) in semi-arid zone of India.

K.L. JOSHI

Studies on double cocoon formation in two races of Bombyx mori L. (Lepidoptera : Bombycidae).

R. NARAYANAPRAKASH, K. PERIASAMY, S. RADHAKRISHNAN

Kaempferol, a new pigment in the yellow cocoon of Bombyx mori.

R. THANGAMANI, M. VIVEKANANDAN

Scientific Papers

Evolution of the ecdysteroid rates of the Bombyx mori egg and embryo according to the type of diapausing or non diapausing egg.

M. COULON

Utilization of woven silk as insoluble support of enzymes.

L. GRASSET, D. CORDIER, A. VILLE

Deuterium exchange - a probe to study the fine structure, and the extent and type of order in silk fibroin.

G.S. NADIGER, M.R. PADHYE, N.V. BHAT

Descriptive Reviews

127 Commission Séricicole Internationale
Actes et Informations

129 Informations Soie et Sériciculture

149 Notes Techniques et Documentaires

151 *Tables de survie du papillon eri, Philosamia ricini Hutt (Lepidoptera : Saturniidae) en région semi-aride de l'Inde.*

K.L. JOSHI

167 *Etudes sur la formation du cocon double chez deux races de Bombyx mori L. (Lepidoptera : Bombycidae).*

R. NARAYANAPRAKASH, K. PERIASAMY, S. RADHAKRISHNAN

175 *Le kaempférol, un nouveau pigment du cocon jaune de Bombyx mori.*

R. THANGAMANI, M. VIVEKANANDAN

181 Articles Scientifiques

183 *Evolution des taux d'ecdystéroïdes de l'oeuf et de l'embryon de Bombyx mori en fonction du type de développement non diapausant ou diapausant.*

M. COULON

205 *Utilisation de la soie tissée comme support insoluble d'enzymes.*

L. GRASSET, D. CORDIER, A. VILLE

219 *Echange du deutérium - une sonde pour étudier la structure fine, l'étendue et le type d'ordre de la fibroïne.*

G.S. NADIGER, M.R. PADHYE, N.V. BHAT

235 Revue Signalétique

COMMISSION SERICOLE INTERNATIONALE

INTERNATIONAL SERICULTURAL COMMISSION

RECORD AND INFORMATION

ACTES ET INFORMATIONS

XIVth INTERNATIONAL SERICULTURAL CONGRESS

The XIVth International Sericultural Congress held in Bangalore (India) from 21st to 25th May 1984 was particularly important because of:

- its location: it was the first time that such a meeting took place outside of the Mediterranean basin;
- its theme: sericulture in tropical countries;
- the numerous participants: 105 persons coming from 13 different countries (Bangladesh, China, Egypt, France, India, Indonesia, Italy, Japan, Madagascar, Malaysia, Poland, Vietnam and Zaïre). Three international organizations were represented (E.S.C.A.P., F.A.O., I.S.A.).
- the great number of papers presented.

The preparation and organization of the Congress was remarkably handled by the Central Silk Board.

The Congress reports will be published in the next issue of Sericologia, but we would like to point out already the hearty welcome we were given in India. All participants will remember it for a long time.

XIVe CONGRES SERICOLE INTERNATIONAL

Le XIVème Congrès Séricicole International qui s'est tenu à Bangalore (Inde) du 21 au 25 mai 1984 a présenté une importance toute particulière en raison de :

- son implantation ; c'est la première fois qu'une telle réunion se tient hors du bassin méditerranéen;
- son sujet : la sériciculture en milieu tropical;
- du nombre des participants : 105 personnes provenant de 13 pays (Bangladesh, Chine, Egypte, France, Inde, Indonésie, Italie, Japon, Madagascar, Malaisie, Pologne, Vietnam et Zaïre). Trois organisations internationales étaient représentées (E.S.C.A.P., O.A.A., A.I.S.) ;
- du nombre des communications.

La préparation et l'organisation matérielle ont été assurées d'une façon remarquable par le Central Silk Board.

Les comptes-rendus du Congrès seront publiés dans le prochain numéro de Sericologia, mais dès maintenant doit être soulignée la gentillesse de l'accueil reçu en Inde. Les participants à ce XIVème Congrès Séricicole International en garderont le souvenir pendant longtemps encore.

CONFERENCE OF THE I.S.C.

Following the XIVth Congress was held in Bangalore the XIth Conference of the I.S.C., chaired by Mr S.K. MISRA, Vice Chairman of the Central Silk Board.

I.S.C. Secretary General Dr. Henri BOUVIER has been reelected for another period of three years. Dr. Gérard CHAVANCY, researcher of the C.N.R.S. (French National Centre for Scientific Research) has been elected Deputy Secretary General.

CONFERENCE DE LA C.S.I.

A la suite du XIVème Congrès, s'est tenue à Bangalore la XIème Conférence de la Commission Séricicole Internationale, sous la présidence de Monsieur S.K. MISRA, Vice-Président du Central Silk Board.

Le Docteur Henri BOUVIER, Secrétaire Général de la C.S.I., a été reconduit dans ses fonctions pour une nouvelle période de trois ans. Le Docteur Gérard CHAVANCY, chargé de recherches au Centre National de la Recherche Scientifique français, a été élu Secrétaire Général Adjoint.

INFORMATIONS SOIE ET SERICICULTURE

SILK AND SERICULTURE INFORMATION

INTERNATIONAL SILK ASSOCIATION

Directing Board and Technology and Research Committee

The Directing Board and the Technology and Research Committee met on 10th and 11th May 1984 at Venice (Italy).

On the meeting of the Technology and Research Committee chaired by Mr Paul ROCHAS, were presented papers on:

- automation of raw silk testing,
- dyeing affinity,
- scientific evaluation of silk qualities.

On the Directing Board meeting was confirmed the appointment of Mr Ronald CURRIE as Secretary General of the I.S.A. The next Congress of the I.S.A. was announced to be held in Lyon in autumn 1985.

ASSOCIATION INTERNATIONALE DE LA SOIE

Conseil de Direction et Commission de Technologie et de Recherche

Le Conseil de Direction de l'A.I.S. et la Commission de Technologie et de Recherche se sont réunis les 10 et 11 mai 1984 à Venise (Italie).

La Commission de Technologie et de Recherche présidée par Monsieur Paul ROCHAS, a entendu des communications sur :

- l'automatisation des essais de la soie grège,
- les problèmes d'affinité tinctoriale,
- l'évaluation scientifique des qualités de la soie.

Au cours du Conseil de Direction, la nomination de Monsieur Ronald CURRIE en qualité de Secrétaire Général de l'A.I.S. a été confirmée. La tenue du prochain Congrès de l'A.I.S., à Lyon à l'automne 1985, a été annoncée.

CHINA

CHINE

Production for 1983. Estimates announced
by the China Silk Corporation.

Production en 1983. Estimations données
par la China Silk Corporation.

	Mûrier / Mulberry		Tussah / Tussah	
	tonnes/ tons 1983	par rapport à/ comparison with 1982	tonnes/ tons 1983	par rapport à/ comparison with 1982
Cocons/ Cocoons	253 500	- 7 %	62 500	+ 33 %
Soie grège/ Raw silk	28 169	- 1 %	983	- 54 %

Silk fabrics production increased by
6.9%, amounting to 977 million metres.

(Source: I.S.A.)

La production de tissus de soie a aug-
menté de 6,9 % pour atteindre un total
de 977 millions de mètres.

(Source : A.I.S.)

THAILAND

THAILANDE

Silk production in 1982 and 1983.

Production de soie en 1982 et 1983.

	1982	1983
Production de cocons/ Production of cocoons	8 187 tonnes/ 8,187 tons	9 225 tonnes/ 9,225 tons
Production de fils/ Production of yarn	824.93 tonnes/ 824.93 tons	825.70 tonnes/ 825.70 tons
Importations de soies ouvrées/ Imports of thrown silk	516.50 tonnes/ 516.50 tons	441 tonnes/ 441 tons
Production de tissus de soie/ Production of silk fabrics	108 millions de mètres/ 108 million metres	105 millions de mètres/ 105 million metres

(Source: I.S.A.)

(Source : A.I.S.)

JAPAN

1983 supply and demand for raw silk in Japan. (Announced by M.A.F.F. on 21st February 1984.)

JAPON

Offre et demande de soie grège au Japon en 1983. (Chiffres annoncés par le M.A.F.F. le 21 février 1984.)

	JAN-DEC 1982	JAN-DEC 1983	Comparaison/ Comparison
Stock initial/ Starting stock			
Starting stock			
- sur le marché/ in the market	12 227	17 214	+ 41 %
- RSSPSA*	158 172	142 330	- 10 %
- Total	170 399	159 544	- 6 %
Production/ Production	216 542	207 611	- 4 %
Importations/ Imports	38 252	40 479	+ 6 %
Exportations/ Exports	-	-	-
Livraisons intérieures/ Domestic deliveries	265 649	220 369	- 17 %
Stock final/ Ending stock			
- sur le marché/ in the market	17 214	12 677	- 26 %
- RSSPSA	142 330	174 588	+ 23 %
- Total	159 544	187 265	+ 17 %

Unit: Bales

* RSSPSA = Raw Silk and Sugar Price Stabilization Agency.

(Source: J.S.A., I.S.A.)

Unité : Balles

* RSSPSA - Agence de Stabilisation des Prix de la Soie Grège et du Sucre.

(Source : A.J.S., A.I.S.)

LIST OF THE SERICULTURAL INSTITUTES,
LABORATORIES AND RESEARCH STATIONS IN
THE WORLD.

LISTE DES INSTITUTS, LABORATOIRES ET
STATIONS DE RECHERCHES SERICICOLES DANS
LE MONDE.

Fourth list.

Quatrième liste.

CHINE/CHINA

SHANGAI INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY

320 Yo Yang road
SHANGAI 200031

Rattaché à : Chinese Academy of Sciences
Affiliated to:

Activités/Activities : Section 2 de l'Institut : Etude de l'ARN de la glande séricigène de *Philosamia ricini*/ Section 2 of the Institute: research on RNA from silk-gland of *Philosamia ricini*.

THE SERICULTURAL RESEARCH INSTITUTE OF GUANGDONG ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCE

GUANGZHOU 510153
Guangdong Province

Rattaché à : 1. The Government of Guangdong Province
Affiliated to: 2. The Ministry of Agriculture, Animal Husbandry and Fisheries
Responsable :
Person in charge: Liu Shi Xian, Director

Chen Han Ying	Sélection du ver à soie/ Silkworm breeding
Su Da Dao	Moriculture/ Moriculture
Liu Shi Xian	Pathologie du ver à soie/ Silkworm pathology
Chen De Lung	Sélection du ver à soie eri/ Eri silkworm breeding

INDE/INDIA

ASIAN INSTITUTE FOR RURAL DEVELOPMENT

7/A, Ratnavilasa road
Basavanagudi
BANGALORE 560 004

Responsable :
Person in charge: M.V. RAJASEKHARAN, Executive Trustee & Coordinator

K. RANGANATHA RAO Production de pontes saines et de qualité pour les éleveurs,
Formation aux techniques de grainage,
Enseignement et vulgarisation./
Production of quality disease-free silkworm layings for supply to rearers,
Training in the seed production technology,
Extension education.

P.G. VENUGOPALAN NAYAR Elevage et fourniture de jeunes vers à soie (chawki) aux éleveurs,
Formation à l'amélioration de la technologie séricicole tropicale./
Rearing of young silkworms (chawki) for the benefit of rearers,
Training in improved tropical sericulture technology.

N.B. : L'A.I.R.D. est un organisme indépendant à but non lucratif./ A.I.R.D. is an autonomous non-governmental charitable trust.

CENTRAL SERICULTURAL RESEARCH & TRAINING INSTITUTE
and
INTERNATIONAL CENTRE FOR TRAINING & RESEARCH IN TROPICAL SERICULTURE
Sriramapuram
Manandavadi road
MYSORE 570 008

Rattaché à :
Affiliated to: Central Silk Board

Responsable :
Person in charge: Dr. Manjeet S. JOLLY, Director

Dr. M.S. JOLLY Responsabilité générale de la recherche, la formation et la vulgarisation/
Overall incharge of research, training and extension

Dr. R.K. DATTA Co-Directeur, Sériciculture : sélection de souches, contrôle des maladies et des parasites du ver à soie. Physiologie. Amélioration des techniques d'élevage./
Joint Director, Sericulture: evolution of superior silkworm breeds, control of diseases and pests of silkworm. Physiology. Rearing innovation technology.

G.R. SASTRY Co-Directeur, Moriculture : création de nouvelles variétés de mûrier, amélioration des variétés exis-

- tantes, méthodes de culture et contrôle des maladies et des parasites./
 Joint Director, Moriculture: evolution of different varieties, improvement of existing ones, studies on package of practices of mulberry and control of diseases and pests.
 Filature et technologie de la soie/
 Reeling and fibre technology
- S.S. SINHA
 Co-Directeur, Vulgarisation : application sur le terrain des résultats des recherches, démonstrations techniques de sériciculture et moriculture tropicales/
 Joint Director, Extension: transfer of research results to the field, demonstration of tropical technology of silkworm rearing and mulberry cultivation
- Dr. T. PAVAN KUMAR
 Co-Directeur, Formation : deux programmes de formation :
 1) Programme indien fédéral,
 2) ICTRETS (Centre International de Formation et de Recherche en Sériciculture Tropicale) : formation de stagiaires provenant de pays en développement./
 Joint Director, Training: two training programmes:
 1) Candidates deputed from Indian States Governments,
 2) Candidates deputed from developing countries (ICTRETS).
- Dr. G.D. PERSHAD
 Directeur Adjoint, Génétique du ver à soie : études génétiques biométriques./
 Deputy Director, Silkworm genetics: biometrical genetics studies.
- M.K.R. NOAMANI
 Directeur Adjoint, Sélection de vers à soie multivoltins: sélection de souches./
 Deputy Director, Multivoltine silkworm breeding: evolution of superior breeds.
- M.N.S. IYENGAR
 Directeur Adjoint, Sélection de vers à soie bivoltins/
 Deputy Director, Bivoltine silkworm breeding.
- Dr. S. VENUGOPALA
 Directeur Adjoint, Physiologie du ver à soie : études nutritionnelles, nouvelles techniques d'élevage et grainage./
 Deputy Director, Silkworm physiology: studies on nutritional aspects of silkworm, rearing innovation technology and seed technology.
- M.V. SANSON
 Directeur Adjoint, Pathologie du ver à soie, entomologie./
 Deputy Director, Silkworm pathology, entomology.
- Dr. S.R. DANDIN
 Directeur Adjoint, Sélection et génétique du mûrier./
 Deputy Director, Mulberry breeding and genetics.
- H.M. BASAVANNA
 Directeur Adjoint, Sciences du sol et chimie, biochimie des feuilles de mûrier, des cocons de ver à soie, etc, filature de cocons dans différents produits chimiques./
 Deputy Director, Soil sciences and chemistry, biochemistry of mulberry leaves, silkworm cocoons, etc, reeling of cocoons in different chemicals.

S.K. CHOUDHURY	Directeur Adjoint, Filature et technologie de la soie : fabrication et modification du matériel de filature et de filage, études du brin de soie dévidé et du brin de soie filé./ Deputy Director, Reeling and fibre technology: fabrication and modification of reeling and spinning equipment, testing of reeled yarn and spin silk yarn.
N.K. GANESH	Directeur Adjoint, Formation : formation de stagiaires de pays en développement (ICTRETS)./ Deputy Director, Training: training of candidates deputed from developing countries (ICTRETS).
S. RAJE URS	Directeur Adjoint, Formation : formation de stagiaires indiens./ Deputy Director, Training: training of inservice candidates (PGDS).
V. THIYAGARAJAN	Directeur Adjoint, Formation : stages courte durée./ Deputy Director, Training: short term programmes.
Dr. C.K. KAMBLE	Directeur Adjoint, Vulgarisation : application sur le terrain des résultats des recherches grâce aux 19 Centres de Vulgarisation./ Deputy Director, Extension: transfer of research results through 19 research extension centres.

CENTRAL TASAR RESEARCH & TRAINING INSTITUTE

Post Hehal
 RANCHI 834 005
 (Bihar)

Rattaché à : Central Silk Board
 Affiliated to:
 Responsable : Dr. K. SENGUPTA, Director
 Person in charge:

B.L. TIKOO	Projet Fédéral sur la soie tussah : recherche et conseil technique./ Inter-State Tasar Project: research and technical guidance.
N. SURYANARAYANA	Arboriculture : recherche appliquée sur la sélection des plantes hôtes du tussah./ Arboriculture: applied research on tasar host plant breeding.
D.N. PRASAD	Arboriculture : recherche appliquée sur la reproduction des plantes hôtes./ Arboriculture: applied research on tasar host plant propagation.
Dr. S.N. CHATTERJEE	Sélection et génétique du ver à soie : recherche appliquée./ Silkworm breeding and genetics: applied research.
Dr. P. MUKERJEE	Vulgarisation et grainage./ Extension and basic seed multiplication.

K.N. SINGH	Formation en sériciculture non-mûrier./ Training in non-mulberry sericulture.
S.S. GHOSH	Filature et filage : recherche appliquée./ Reeling and spinning: applied research.
Dr. A.K. SINHA	Chimie : recherche appliquée./ Chemistry: applied research.
U.P. GRIYAGHEZ	Pathologie du ver à soie : recherche appliquée./ Silkworm pathology: applied research.
J. JAISWAL	Physiologie du ver à soie : recherche appliquée./ Silkworm physiology: applied research.
P.K. DASS	Entomologie : recherche appliquée./ Entomology: applied research.

Souches/Strains : *Antheraea mylitta*, *Terminalia tomentosa*, *Terminalia arjuna*, *Lagers-tromia indica*.

Stations rattachées/ Affiliated stations :

BASIC SEED MULTIPLICATION & TRAINING CENTRE
L-74 Housing Board Colony
BALAGHAT 481 001
(M.P.)

Responsable :
Person in charge: M.K. SINGH

BASIC SEED MULTIPLICATION & TRAINING CENTRE
Babupeth
CHANDERPUR 442 403
(Mahavashtra)

Responsable :
Person in charge: R.K. PANDYA

BASIC SEED MULTIPLICATION & TRAINING CENTRE
P.O. Chinoor
District Adilabad
(Andhra Pradesh)

Responsable :
Person in charge: S.S. SARAN

BASIC SEED MULTIPLICATION & TRAINING CENTRE
P.O. Dawripur
District Bhandara
(Mahavashtra)

Responsable :
Person in charge: Mr SURENDRA PRASAD

BASIC SEED MULTIPLICATION & TRAINING CENTRE
P.O. PALLAHARA 759 119
District Dhenkand
(Orissa)

Responsable :
Person in charge: S.S. SINGH

BASIC SEED MULTIPLICATION & TRAINING CENTRE
P.O. MADHUPUR 815 353
Santhal Pargana
(Bihar)

Responsable :
Person in charge: N.G. OHJA

BASIC SEED MULTIPLICATION & TRAINING CENTRE
P.O. AMBIKAPUR 497 001
District Sarguja
(M.P.)

Responsable :
Person in charge: J.V. KRISHNA RAO

BASIC SEED MULTIPLICATION & TRAINING CENTRE
P.D. NOWRANGPUR 764 059
District Koraput
(Orissa)

Responsable :
Person in charge: H.C. MOHAPATRA

BASIC SEED MULTIPLICATION & TRAINING CENTRE
P.O. KATHIKUND 814 103
District Dumka
(Bihar)

Responsable :
Person in charge: B.M.K. SINGH

BASIC SEED MULTIPLICATION & TRAINING CENTRE
P.O. NOAMUNDI 833 218
District Singhbhum
(Bihar)

Responsable :
Person in charge: D.N. SAHAY

BASIC SEED MULTIPLICATION & TRAINING CENTRE
P.O. BOIRDADAR 496 004
District Raigarh
(M.P.)

Responsable :
Person in charge: G.P. BHARGAWA

BASIC SEED MULTIPLICATION & TRAINING CENTRE
P.O. BASTAR 494 223
Jagdalpur
(M.P.)

Responsable :
Person in charge: S.B. SARASWAT

BASIC SEED MULTIPLICATION & TRAINING CENTRE
PATELNAGAR
District Birbhum
(West Bengal)

Responsable :
Person in charge: Dr. M.S. HAQUE

BASIC SEED MULTIPLICATION & TRAINING CENTRE
P.O. SANKARA 770 020
Sundergarh
(Orissa)

Responsible :
Person in charge: Mr DIPANKAR CHAKRABORTY

BASIC SEED MULTIPLICATION & TRAINING CENTRE
P.O. PALI 495 449
District Bilaspur
(M.P.)

Responsible :
Person in charge: A.K. DEBNATH

BASIC SEED MULTIPLICATION & TRAINING CENTRE
P.O. KHARSWAN 833 216
District Singhbhum
(Bihar)

Responsible :
Person in charge: R.P. KHANNA

EXTENSION CENTRE
P.O. DUDHI 231 208
Mirzapur District
(U.P.)

Responsible :
Person in charge: S.N. CHATURVEDI

EXTENSION CENTRE
P.O. MULUG 506 343
District Warrangal
(Andhra Pradesh)

Responsible :
Person in charge: V. SESHUBABU

EXTENSION CENTRE
Champia
AIZAWAL 796 102
(Mizoram)

Responsible :
Person in charge: M.R. YUSUF

EXTENSION CENTRE
P.O. KIKRUMA 797 107
District Phek
Nagaland

Responsible :
Person in charge: N. IBOHAL SINGH

EXTENSION CENTRE
P.O. UMRANGSHU
(Shillong)
Via Jowai (Assam)

Responsable :
Person in charge: B.C. PRASAD

EXTENSION CENTRE
Dirang Bomdila
District Kameng
(Arunachal Pradesh)

Responsable :
Person in charge: J.P. GAWR

EXTENSION CENTRE
P.O. BIR 175 032
District Kangra
(H.P.)

Responsable :
Person in charge: R.K. BAHL

EXTENSION CENTRE
P.O. BANGRIPOSI 757 032
District Majurbanj
(Orissa)

Responsable :
Person in charge: N.D. BANERJEE

EXTENSION CENTRE
P.O. KATHGORA 495 445
District Bilaspur
(M.P.)

Responsable :
Person in charge: B.D. SINGH

EXTENSION CENTRE
HATGAMARIA 833 214
District singhbhum
(Bihar)

Responsable :
Person in charge: Mr KAMLA KANTII

CENTRAL TASAR SILKWORM SEED STATION, LAKHA
P.B. N° 15
P.O. RAIGARH 496 001
(M.P.)

Rattaché à :
Affiliated to: Central Silk Board

Responsable :
Person in charge: B.R.R.P. SINHA, Deputy Director

Activités/Activities : Conservation de germes plasmes de différentes éco-races de *Antheraea mylitta*, fourniture d'oeufs P3 de *A. mylitta*. / Maintenance of germ plasm bank of different eco-races of *Antheraea mylitta*, supply of P3 silkworm eggs of *A. mylitta*.

DEPARTMENT OF SERICULTURE

University of Agricultural Sciences
G.K.V.K. Campus
BANGALORE 560 065

Rattaché à :
Affiliated to: University of Agricultural Sciences

Responsable :
Person in charge: Dr. M.C. DEVAIAH, Professor

Dr. M.C. DEVAIAH
Dr. M-B. SHYAMALA
C. SIDDAPPAJI
T.G. NANDAKISHORE
K.P. CHINNASWAMY
Miss NEELU NANGIA
M. VIJENDRA
G.C. KUBERAPPA

Sériciculture : enseignement, recherche et vulgarisation./

Sericulture: teaching, research and extension.

T. SHIVASHANKAR
K.N. SREENIVASA
T.T. PUTTARAJU
S.VENKATAGIRIYAPPA
Mrs. VASUNDARA M.

Sériciculture : enseignement, recherche et vulgarisation./

Sericulture: teaching, research and extension.

M.A. SHANKAR

Moriculture : enseignement, recherche et vulgarisation./

Moriculture: teaching, research and extension.

Souches/Strains : *Bombyx mori*, *Philosamia cynthia ricini*.

DEPARTMENT OF SERICULTURE

Agricultural College
University of Agricultural Sciences
DHARWAD

Rattaché à :
Affiliated to: University of Agricultural Sciences

Responsable :
Person in charge: R. GOVINDAN, Associate Professor

R. GOVINDAN
R. RAJASHEKARA GOUDA
T.K. NARAYANA SWAMY
R.H. PATIL

Sériciculture : enseignement, recherche et vulgarisation./

Sericulture: teaching, research and extension.

Souches/Strains : *Bombyx mori*, *Philosamia cynthia ricini*.

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

University of Allahabad
ALLAHABAD 211 002
Cuttar Pradesh

Rattaché à :
Affiliated to:
1. Indian Council of Agricultural Research
2. Department of Science & Technology
3. University Grants Commission

Activités/Activities : Recherche appliquée, élevage du ver à soie du chêne et grainage./ Applied research, oak tasar silkworm rearing and seed production.

Souches/Strains : *Antheraea proylei*.

REGIONAL TASAR RESEARCH STATION

P.O. MANTRIPOKHARI

Post Box 29

IMPHAL 795 001

(Manipur)

Rattaché à :
Affiliated to: Central Silk Board

Responsable :
Person in charge: M.P. NIGAM, Joint Director

V.N. BARDAIYAR	Sélection du ver à soie : recherche appliquée sur <i>A. proylei</i> ./ Silkworm breeding: applied research on <i>A. proylei</i> .
C.C. CHOWDHURY	Physiologie du ver à soie : recherche appliquée sur <i>A. proylei</i> ./ Silkworm physiology: applied research on <i>A. proylei</i> .
R. CHAKARVORTY	Recherche appliquée sur les plantes nourricières du ver à soie tussah./ Applied research on oak tasar host plants.
M.K. JHA	Grainage./ Silkworm seed production.

Souches/Strains : *Antheraea pernyi*, *Antheraea proylei*, *Antheraea roylei*.

JAPON/JAPAN

EHIME KEN SERICULTURAL EXPERIMENT STATION

2278, Tokunomori

Ozu-shi

EHIME KEN

Responsable : Osamu ANDO
Person in charge:

K. KOTOKU	Sélection du ver à soie/ Silkworm breeding
K. SUEMITSU	Aliment artificiel/ Artificial food
M. IKEGAMU	Pathologie des invertébrés/ Invertebrate pathology
K. MITSUDA	Sélection du ver à soie/ Silkworm breeding
T. ABE	Moriculture (désherbage)/ Moriculture (research for weed)
S. FUKUMOZU	Moriculture (agronomie)/ Moriculture (agronomical analysis)
S. ISHIIISHIKAWA	Moriculture (physiologie végétale)/ Moriculture (botanical physiology)
N. SAITO	Gestion générale des recherches/ Management of total research

SERICULTURAL EXPERIMENT STATION

1-2 Ohwashi

YATABE

Ibaraki ken 305

Rattaché à :
Affiliated to: Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries

Responsable : Kazuo HAZAMA, Director General
Person in charge:

Y. HORIUCHI	Directeur du Département de la Plannification de la Recherche et de la Coordination/ Director, Department of Research Planning and Coordi- nation
K. TAKAMIYA	Section Plannification de la Recherche/ Section of Research Planning
Y. SASAKI	Section Coordination/ Section of Coordination
K. YAMAKAWA	Section Gestion de l'exploitation agricole/ Section of Farm Management
K. KITaura	Directeur du Département de Moriculture/ Director, Department of Moriculture

K. KATAGIRI	Génétique du mûrier/ Mulberry genetics
M. OGURE	Sélection du mûrier (régions tempérées)/ Mulberry breeding (temperate region)
M. WADA	Sélection du mûrier pour la résistance à la rouille/ Mulberry breeding for resistance to die-back disease
T. MURAKAMI	Physiologie du mûrier/ Mulberry physiology
M. ONO	Culture du mûrier/ Mulberry cultivation
K. TAKAHASHI	Pathologie du mûrier/ Mulberry pathology
M. KIKUCHI	Insectes parasites du mûrier/ Mulberry insect pest
K. INAMATSU	Sol/ Soil
T. YAMASHITA	Nutrition du mûrier/ Mulberry nutrition
H. OOI	Directeur du Département Sélection du Ver à Soie/ Director, Department of Silkworm Breeding
K. KIGUCHI	Génétique du ver à soie/ Silkworm genetics
A. SHIBUKAWA	Sélection de races de vers à soie/ Silkworm breeding for basic races
A. WATANABE	Sélection du ver à soie (méthodologie de sélection et d'évaluation)/ Silkworm breeding (methodology for breeding and evaluation)
Y. OHTSUKI	Physiologie et biologie du développement des oeufs de ver à soie/ Physiology and developmental biology of silkworm egg
K. TOTANI	Gestion du grainage et de la distribution/ Management of egg production and distribution
H. TAKIZAWA	Grainage/ Silkworm egg production
T. YAMAMOTO	Elevage de lignées stock/ silkworm stock-culture
H. AOKI	Oeufs de reproduction (méthodologie de grainage d'oeufs diapausants)/ Reproductive silkworm egg (methodology for diapause egg production)
Y. NAGAIKE	Oeufs de reproduction (méthodologie de grainage d'oeufs non-diapausants)/ Reproductive silkworm egg (methodology for non-dia- pause egg production)

S. ISHIKAWA	Directeur du Département de Sériciculture/ Director, Department of Sericulture
H. AKAI	Physiologie du ver à soie (développement et régulation)/ Silkworm physiology (Development and regulation)
H. YANAGAWA	Physiologie du ver à soie (nutrition et métabolisme)/ Silkworm physiology (nutrition and metabolism)
T. OKABE	Sériciculture (mécanisation du travail)/ Sericulture (mechanization of sericultural work)
S. KURIBAYASHI	Sériciculture (méthodologie pour l'élevage du ver à soie)/ Sericulture (methodology for silkworm rearing)
M. MATSUDA	Aliment artificiel (amélioration et conservation)/ Silkworm artificial food (improvement and preservation)
S. UEDA	Aliment artificiel (système d'élevage)/ Silkworm artificial food (silkworm rearing system)
K. KAWAKAMI	Pathologie du ver à soie (maladies et parasites)/ Silkworm pathology (disease and pest)
G. AYUZAWA	Pathologie du ver à soie (contrôle des maladies et parasites)/ Silkworm pathology (control of disease and pest)
K. YAGIOKA	Directeur du Département Filature et Transformation de la Soie/ Director, Department of Filature and Silk Processing
K. INOUE	Qualité des cocons/ Cocoon quality
T. NISHIDE	Automatisation de la filature/ Filature automation
T. TERASHIMA	Contrôle du processus de filature/ Filature process control
K. KATAOKA	Propriétés physiques et chimiques de la soie/ Silk physics and chemistry
A. AOKI	Tissus de soie pour la confection/ Silk clothing materials
H. KATO	Traitement chimique de la soie/ Silk chemical processing
K. KOMATSU	Utilisation de la soie et de ses sous-produits/ Silk and by-product utilization
M. KODIARA	Directeur de la Matsumoto Branch Station/ Director, Matsumoto Branch Station
H. FUJITA	Moriculture/ Moriculture
H. MIZUSAWA	Sériciculture/ Sericulture

Y. MANO	Sélection du ver à soie (sélection de races pour la productivité)/ Silkworm breeding (breeding for practical races characteristic of productivity)
Y. HIGASHI	Sélection du ver à soie (sélection de races pour la qualité du cocon)/ Silkworm breeding (breeding for practical races characteristic of cocoon quality)
M. MIZUIDE	Directeur de la Division de Filature Expérimentale/ Director, Division of Filature Experiment
J. MURAYAMA	Traitement des cocons/ Cocoon treatment
H. TAKEKAWA	Particularités de la soie grège/ Particular raw silk
U. KOBAYASHI	Technologie de la filature/ Filature technology

THE JAPANESE SOCIETY OF SERICULTURAL SCIENCE

c/o The Sericultural Experiment Station
Yatabe
Ibaraki 305

Responsable :
Person in charge: Seijiro MORDHOSHI, President

Toshio ITO	Vice Président/ Vice-President
Narumi YOSHITAKE	Vice Président/ Vice-President
Yasuhiro HORIE	Directeur Général/ Director (general affairs)
Kiyoshi KITaura	Directeur Général/ Director (general affairs)
Fumio MUKAIYAMA	Directeur Financier/ Director (accounting)
Hitoshi WATANABE	Directeur de la Publication/ Director (editorial)

Activités/Activities : La J.S.S.S. publie la revue "Journal of Sericultural Science of Japan" et compte 1293 membres./ The J.S.S.S. publishes the "Journal of Sericultural Science of Japan" and numbers 1293 members.

N.B. :

Actualisation de la seconde liste (Sericologia 23-4, p. 206)/

Actualization of the second list (Sericologia 23-4, p. 206)

SANHINSHU KENKYU JO

INSTITUTE OF SILKWORM GENETICS & BREEDING

1054 Iikura

Ami-machi

IBARAKI 300 04

Responsable :

Person in charge: Dr. Yataro TAZIMA, Director

PAYS-BAS/NETHERLANDS

ROYAL TROPICAL INSTITUTE

63 Mauritskade

1092 AD AMSTERDAM

Responsable :

Person in charge: J.C.J. MOHRMANN, President

R.M. WILSON

Responsable de la Section Information et Documentation
Agricole : collection et publication de documentation
sur tous les aspects de la sériciculture./

Head of Section of Agricultural Information and Docu-
mentation: collecting and publishing information on
all aspects of sericulture.

C.A. DE VRIES

Département de la Recherche Agronomique : Conseiller
en sériciculture./

Agricultural Research Department: Consultant on seri-
culture.

U.S.A./U.S.A.

DEPARTMENT OF GENETICS AND DEVELOPMENT

515 Morill Hall
University of Illinois
505 S. Goodwin Avenue
URBANA IL 61801

Rattaché à : University of Illinois
Affiliated to:

Judith H. WILLIS

Etude du mode d'action de l'hormone juvénile chez *Hyalophora cecropia*./

Studies on the mechanism of action of juvenile hormone in *Hyalophora cecropia*.

Caractérisation des protéines de la cuticule chez *H. cecropia* et chez d'autres membres du même genre par les techniques électrophorétiques et immunologiques./

Characterization of cuticular proteins of *H. cecropia* and other members of genus by electrophoretic and immunological techniques.

Culture de tissus d'ailes de chrysalides, étude *in vitro* des réponses aux ecdystéroïdes et juvénoides et synthèse des protéines cuticulaires./

Tissue culture of pupal wings, studying responses to ecdysteroids and juvenoids *in vitro*, and synthesis of cuticular proteins.

Cultures de courte durée de tégument pour déterminer le lieu et le moment des synthèses des protéines cuticulaires chez chaque individu./

Short term cultures of body integument to ascertain site and time of synthesis of individual cuticular proteins.

Souches/Strains : *Hyalophora cecropia*, *Antheraea polyphemus*.

NOTES TECHNIQUES ET DOCUMENTAIRES

TECHNICAL AND DOCUMENTARY NOTES

ERRATUM

EFFECTIVE UTILIZATION OF TUKRA DISEASED MULBERRY LEAVES AS SILKWORM BOMBYX MORI L. FEEDING

UTILISATION EFFICACE DES FEUILLES DE MURIER ATTEINTES DE LA MALADIE TUKRA POUR L'ALIMENTATION DU VER A SOIE BOMBYX MORI L.

R. THANGAMANI et M. VIVEKANANDAN

*Department of Botany, Bharathidasan University
Tiruchirappalli-620 023
India.*

Sericologia, 1983, 23(4), p. 213-223.

In table 3 of this article, an inversion was made in the content of Chlorophyll total between control and tukra leaves :

Control : 146.5 (mg/100 g fresh weight)

Tukra : 86.94 (mg/100g fresh weight)

Dans le tableau 3 de cet article, une inversion a été faite dans la teneur en chlorophylle totale entre les feuilles témoin et tukra :

Témoin : 146,5 (mg/100 g de poids frais)

Tukra : 86,94 (mg/100 g de poids frais)

SEASONAL LIFE-TABLES OF ERI SILKWORM, PHILOSAMIA RICINI HUTT
(LEPIDOPTERA : SATURNIIDAE) IN SEMI-ARID ZONE OF INDIA

K. L. JOSHI

Regional Sericultural Research Station
Central Silk Board, Government of India,
Titabar, Assam,
India.

Life tables of Eri silkmoth, *Philosamia ricini* were constructed in three different seasons (winter, summer and monsoon). It was observed that expectancy of life (ex), net replacement rate (R_0) and mean length of generation (T) were maximum in season winter. The value of innate capacity for increase (r_m) remained less important in winter than in monsoon and summer.

INTRODUCTION

Life tables are now being studied more and more for insects (*Malacosoma disstria* (Witter *et al.*, 1972); *Scolothrips sexmaculatus* (Coville and William, 1977); *Heliothis armigera* (Dhandapani and Balasubramanian, 1977); *Philosamia ricini* (Misra and Joshi, 1980) and *Sylepta derogata* (Dhindsa *et al.*, 1980), etc.) and can also be employed to assess the value of different ingredients of the environment.

The present study was therefore undertaken to know the effect of different seasons (winter, summer and monsoon) on the Eri silkmoth *Philosamia ricini* in the semi-arid region (Rajasthan) of India. This study is part of our exploration to find the best suited season for introducing Ericulture as a new agro-cottage industry in the Indian semi-arid zone. It is hoped that this introduction would prove to be an energy subsidy in a region where the largest human and live stock populations per unit area have converted most of the grasslands into agro-ecosystems.

MATERIAL AND METHODS

In each season the life tables were constructed with the eggs laid by disease-free females of Eri silkmoth, *P. ricini*, having five replications each having hundred eggs.

The temperature and relative humidity indoor ranging during the different seasons of the year 1979 were as follows :

Winter	Temp.	18°C - 24°C
	R.H.	50 - 56 %
Summer	Temp.	27°C - 33°C
	R.H.	45 - 59 %
Monsoon	Temp.	25°C - 31°C
	R.H.	60 - 90 %

The larvae of Eri silkmoth, *P. ricini* were reared in Petri-dishes with covers up to the third instar so as to provide fresh food with high humidity but thereafter they were reared in trays.

The tender leaves of castor, *Ricinus communis* L. (var. GCH-3) were fed to the first and the second instar larvae, more mature ones to the third instar while the most mature leaves were fed to the fourth and the fifth instar larvae.

In the life table the age category (days) was designated as x and the surviving series l_x . The dx indicates the mortality. If the starting population is computed as unity the mortality rate (dx), survivals (l_x) would be in fractions of one (not given in the tables 1-3). The expectancy of life has been computed from notional stationary populations (L_x and T_x). Actually all the individuals do not die suddenly at the end of the age class interval as shown (dx) in the life table for the purpose of calculations. The mortality continues in a random manner all through the interval, therefore, L_x is visualized as the number of individuals surviving at the middle point of the class interval, being the average survival of two successive intervals (l_x).

Population is dynamic, because new recruits are entering each of the various age-class intervals constantly being governed by an abstraction which however can be calculated as potential fecundity of the species. When a number of individuals crosses the age-class interval by growing older, thus entering the next higher class interval, the place is immediately taken up by another number of individuals who have qualified from the lower class interval. Thus at the upper threshold of the class interval in T_x , there are not only the numbers shown as L_x , for that class interval but are also all these batches who have passed through this class interval. This notional statistic is called T_x , representing total number of individuals who have lived all the class interval earlier. This statistic is computed from the bottom of the L_x column upward, carrying the running cumulative total right to the top. Thus the cumulative total at the top of T_x column represents the notional population that has lived the entire life span, from which the expectancy of life (ex) can be computed as the proportion T_x/l_x (Deevey, 1947).

The net replacement (reproduction) rate of the female population on each successive day was determined from the product of the average number of eggs produced (natality rate, m_x) by the females surviving at the age (l_x). The summation of the column R_0 gives the total replacement made by an average female from each generation. This would be the carrying capacity of the average insect under specified environmental conditions.

Innate capacity for increase (r_m) is the only statistic which adequately summarizes the physiological qualities of an animal with respect to its capacity to increase in number (Andrewartha and Birch, 1954, p. 43) during one generation time (T), which is mathematically determined by an equation due to Dublin and Lotka (1925) :

$$T = \frac{1x \cdot mx \cdot x}{1x \cdot mx}$$

$$r_m = \frac{\log_e .R_o}{T}$$

RESULTS AND DISCUSSIONS

Expectancy of life (ex)

The expectancy of life is the longest (59 days, Table-1) (at the egg stage) when the larvae were reared in season winter, followed by that in season monsoon (42 days, Table-3) and summer (37 days, Table-2).

It can be seen that ex of Eri silkmoth decreases continuously (Tables 1 to 3) as the age of moth increases, showing a uniform mortality rate. This is a general trend in all animals as can be seen by a similar pattern, observed for mountain sheep (Deevey, 1947), gray squirrel (Barkalow *et al.*, 1970) and humans (Ehrlich *et al.*, 1977, p. 13-14). In organisms where mortality is very high during the young stages, the pattern will be different.

Survivorship (lx)

Since the beginning was made with 100 eggs in each replication of the experiment, the sex-ratio, rates of survival, death and birth can reasonably be assumed to be the result of differences in the environmental conditions, when food (castor, var. GCH-3) was the same in all cases.

The survival of adults (lx) on the completion of pupation shows a range of 87 (Winter season, Table-1) to 59 (Summer season, Table-2) in between which lie the value 67 (Monsoon season, Table-3). These figures show that in the matter of survivorship the monsoon season comes only next to the best (winter season). In the matter of age specific survival of females (l_x), the females of monsoon season (Table-6) are slightly lesser in number than the females of summer season (Table-5) but the higher natality rate (197 eggs/day) of females of monsoon season compensated the lower female survival and comes close to the best season (winter).

Net reproduction rate (R_o)

The net reproduction rate explains the total number of female offspring produced by a female during a life time

The R_o is maximum (147.85) in winter season (Table-4), minimum in summer season (78.42) (Table-5) and in-between these two lie the value (99.42) of season monsoon (Table-6), indicating that the maximum population turn-over occurs in the winter season followed by that in the monsoon and the summer (in descending order). It can also be seen that R_o is maximum on the first day of oviposition (Tables 4-6) and the value reduces successively thereafter.

The decreasing pattern of R in the advancement of the age of the female is a common observation e.g. Rice weevil, *Calendra oryzae* (Birch, 1948); Voles, *Microtus agrestis* (Leslie and Ranson, 1940).

Innate capacity for increase (r_m)

This statistic gives instantaneous rate of population increase, which is mathematically computed as the mean period elapsing from birth of parents to birth of offspring (T).

It is interesting to note that the value of r_m (Table-7) is lesser in the winter season (0.084) than in the summer (0.100) and monsoon (0.105). The lesser value of r_m in winter is due to the time T (Table 7) which is maximum (59.12 days) because the metabolic rate at lower temperature decreases.

CONCLUSION

Considering various life table parameters it can be said that the winter season is best for the Eri silkworm, *P. ricini*. The monsoon and summer seasons can be kept at second and third position.

ACKNOWLEDGEMENT

The author wishes to express thanks to Prof. S. D. MISRA (the then Professor and Head of the Zoology Department, University of Jodhpur, Jodhpur) for providing the facilities and inspiring guidance throughout the investigation.

Age in days / Age en jours	No. of survivors / Nbre de survivants	No. of dying / Nbre de décès	Average alive / Moyenne des survivants	Total alive / Total des survivants	Life expectancy x class interval / Espérance de vie x intervalle de classe (4.5)
x	lx	dx	Lx	Tx	ex
Zero	100	-	100	1 304.0	58.68
4.5	100	-	100	1 204.0	54.18
9.0	100	4	98	1 104.0	49.68
13.5	96	-	96	1 006.0	47.146
18.0	96	1	95.5	910.0	42.656
22.5	95	2	94.0	814.5	38.583
31.5	93	5	90.5	720.5	34.862
36.0	88	-	88.0	630.0	32.216
40.5	88	-	88.0	542.0	27.716
45.0	88	1	87.5	454.0	23.216
49.5	87	-	87.0	366.5	18.959
54.0	87	-	87.0	279.5	14.549
58.5	87	2	86.0	192.5	9.959
63.0	85	21	74.5	106.5	5.639
67.5	64	64	32.0	32.0	2.250

Table 1. Life table of Eri silkmoth, *Philosamia ricini* when the larvae are reared in winter.
 Tableau 1. Table de survie du papillon Eri *Philosamia ricini* lorsque les larves sont élevées en hiver.

Age in days / Age en jours	No. of survivors / Nbre de survivants	No. of dying / Nbre de décès	Average alive / Moyenne des survivants	Total alive / Total des survivants	Life expectancy x class interval / Espérance de vie x intervalle de classe (2.5)
x	lx	dx	Lx	Tx	ex
Zero	100	-	100	1 465.0	36.625
2.5	100	-	100	1 365.0	34.125
5.0	100	2	99	1 265.0	31.625
7.5	98	7	94.5	1 166.0	29.745
10.0	91	1	90.5	1 071.5	29.438
12.5	90	5	87.5	981.0	27.250
15.0	85	-	85.0	893.5	26.280
17.5	85	2	84.0	808.5	23.780
20.0	83	2	82.0	724.5	21.823
22.5	81	10	76.0	642.5	19.830
25.0	71	4	69.0	566.5	19.948
27.5	67	-	67.0	497.5	18.563
30.0	67	-	67.0	430.5	16.063
32.5	67	-	67.0	363.5	13.563
35.0	67	-	67.0	296.5	11.063
37.5	67	8	63.0	229.5	8.563
40.0	59	-	59.0	166.5	7.055
42.5	59	5	56.5	107.5	4.555
45.0	54	30	39.0	51.0	2.360
47.5	24	24	12.0	12.0	1.250

Table 2. Life table of Eri silkmoth, *Philosamia ricini* when the larvae are reared in summer.

Tableau 2. Table de survie du papillon Eri *Philosamia ricini* lorsque les larves sont élevées en été.

Age in days / Age en jours	No. of survivors / Nbre de survivants	No. of dying / Nbre de décès	Average alive / Moyenne des survivants	Total alive / Total des survivants	Life expectancy x class interval / Espérance de vie x intervalle de classe (2.5)
x	lx	dx	Lx	Tx	ex
Zero	100	-	100	1 659.0	41.475
2.5	100	-	100	1 559.0	38.975
5.0	100	-	100	1 459.0	36.475
7.5	100	2	99	1 359.0	33.975
10.0	98	-	98	1 260.0	32.143
12.5	98	1	97.5	1 162.0	29.643
15.0	97	-	97.0	1 064.5	27.435
17.5	97	5	94.5	967.5	24.935
20.0	92	1	91.5	873.0	23.723
22.5	91	6	88.0	781.5	21.470
25.0	85	8	81.0	693.5	20.398
27.5	77	-	77.0	612.5	19.888
30.0	77	3	75.5	535.5	17.388
32.5	74	-	74.0	460.0	15.540
35.0	74	1	73.5	386.0	13.040
37.5	73	6	70.0	312.5	10.703
40.0	67	-	67.0	242.5	9.048
42.5	67	1	66.5	175.5	6.548
45.0	66	13	59.5	109.0	4.130
47.5	53	30	38.0	49.5	2.338
50.0	23	23	11.5	11.5	1.250

Table 3. Life table of Eri silkmoth, *Philosamia ricini* when the larvae are reared in monsoon.

Tableau 3. Table de survie du papillon Eri *Philosamia ricini* lorsque les larves sont élevées en période de mousson.

Age in days / Age en jours	Age specific survival rate of the Female / Taux de survie de la femelle en fonction de l'âge	Nativity rate / Taux de natalité	Net reproduction rate / Taux de reproduction net
x	$l x_1$	$m x$	$R_0 = l x_1 . m x$
58.5	0.37	232	85.84
59.5	0.37	105	38.85
60.5	0.37	48	17.76
61.5	0.30	13	3.90
62.5	0.30	5	1.50
63.5	0.22	0	0
64.5	0.11	0	0
65.5	0	0	0

Net reproduction rate / Taux de reproduction net = 147.85

N.B. : The zero at the end of the observed columns indicates that the observations were carried out till the end / le zéro en fin de colonne indique que les observations ont été effectuées jusqu'au bout.

Table 4. Life table and net reproduction (replacement) rate of Eri silkmoth, *Philosamia ricini*, when the larvae are reared in winter.

Tableau 4. Table de survie et taux de reproduction net (remplacement) du papillon Eri *Philosamia ricini* lorsque les larves sont élevées en hiver.

Age in days / Age en jours	Age specific survival rate of the female / Taux de survie de la femelle en fonction de l'âge	Nativity rate / Taux de natalité	Net reproduction rate / Taux de reproduction net
x	$l x_1$	$m x$	$R_0 = l x_1 . m x$
43	0.29	180	52.20
44	0.29	72	20.88
45	0.28	12	3.36
46	0.22	9	1.98
47	0.01	0	0
Net reproduction rate / Taux de reproduction net = 78.42			

N.B. : The zero at the end of the observed columns indicates that the observations were carried out till the end / le zéro en fin de colonne indique que les observations ont été effectuées jusqu'au bout.

Table 5. Life table and net reproduction (replacement) rate of Eri silkmoth, *Philosamia ricini*, when the larvae are reared in summer.

Tableau 5. Table de survie et taux de reproduction net du papillon Eri, *Philosamia ricini* lorsque les larves sont élevées en été.

Age in days / Age en jours	Age specific survival rate of the female / Taux de survie de la femelle en fonction de l'âge	Natality rate / Taux de natalité	Net reproduction rate / Taux de reproduction net
x	l_x	m_x	$R_0 = l_x \cdot m_x$
43	0.28	197	55.16
44	0.28	102	28.56
45	0.28	43	12.04
46	0.28	12	3.36
47	0.10	3	0.30
48	0.04	0	0
Net reproduction rate / Taux de reproduction net = 99.42			

N.B. : The zero at the end of the observed columns indicates that the observations were carried out till the end / le zéro en fin de colonne indique que les observations ont été effectuées jusqu'au bout.

Table 6. Life table and net reproduction (replacement) rate of Eri silkmoth, *Philosamia ricini*, when the larvae are reared in monsoon.

Tableau 6. Table de survie et taux de reproduction net (remplacement) du papillon Eri *Philosamia ricini*, lorsque les larves sont élevées en période de mousson.

Season / Saison	Expectancy of life / Espérance de vie	Net reproduction rate / Taux de reproduction net	Mean length of generation / Durée moyenne de la génération	Innate capacity for increase / Capacité innée à se multiplier
	ex	R_o	T	r_m
Winter / Hiver	58.68	147.85	59.12	0.084
Summer / Été	36.62	78.42	43.43	0.100
Monsoon / Mousson	41.47	99.42	43.64	0.105

Table 7. Comparative performance of life expectancy (ex), net reproduction (replacement) rate (R_o), mean length of generation (T), and innate capacity for increase (r_m) of Eri silkmoth, *Philosamia ricini*, when the larvae are reared in the three different seasons (winter, summer and monsoon).

Tableau 7. Performance comparative de l'espérance de vie (ex) du taux de reproduction net (remplacement) (R_o), durée moyenne de la génération (T), capacité innée à se multiplier (r_m) du papillon Eri *Philosamia ricini* élevé en hiver, en été et en période de mousson.

TABLES DE SURVIE DU PAPILLON ERI, PHILOSAMIA RICINI HUTT
(LEPIDOPTERA : SATURNIIDAE) EN REGION SEMI-ARIDE DE L'INDE

K. L. JOSHI

Regional Sericultural Research Station
Central Silk Board, Government of India,
Titabar, Assam,
India.

Les tables de survie de *Philosamia ricini* ont été établies au cours de trois saisons différentes (hiver, été et mousson). Nous avons observé que l'espérance de vie (ex), le taux de remplacement (R_0) et la longévité moyenne d'une génération sont plus élevés en hiver. La capacité à se multiplier reste moins élevée en hiver qu'en été et qu'en période de mousson.

INTRODUCTION

Les tables de survie sont maintenant de plus en plus étudiées pour les insectes (*Malacosoma disstria* (Witter et al., 1972); *Scolothrips sexmaculatus* (Coville et William, 1977); *Heliothis armigera* (Dhandapani et Balasubramanian, 1977); *Philosamia ricini* (Misra et Joshi, 1980) et *Sylepta derogata* (Dhindsa et al., 1980), etc.) et peuvent être également utilisées pour évaluer la valeur des différents éléments de l'environnement.

Cette étude a donc été entreprise pour connaître les effets des différentes saisons (hiver, été et mousson) sur le papillon Eri, *Philosamia ricini* dans la région semi-aride de l'Inde (Rajasthan). Cette étude fait partie d'un plan de recherches destiné à déterminer la saison la plus favorable à l'introduction de l'Ériculture en tant qu'industrie artisanale dans la région semi-aride de l'Inde. Nous espérons que cette introduction sera une ressource d'énergie dans une région où la plus forte concentration en hommes et en bétail a transformé la plupart des pâturages en agro-écosystèmes.

MATERIEL ET METHODES

Les tables de survie ont été établies à chaque saison avec des pontes de femelles saines de papillon Eri, *P. ricini*. Chaque expérience portant sur cent oeufs a

été répétée cinq fois. La température et le taux d'humidité à l'intérieur au cours des différentes saisons étaient les suivants :

Hiver	Temp.	18°C - 24°C
	R.H.	50 - 56 %
Eté	Temp.	27°C - 33°C
	R.H.	45 - 59 %
Mousson	Temp.	25°C - 31°C
	R.H.	60 - 90 %

Les larves du papillon *Eri^P. ricini* ont été élevées dans des boîtes Petri fermées jusqu'au troisième âge afin d'assurer une nourriture fraîche et une forte humidité, puis les larves ont été mises sur des claies.

Les larves du premier et du deuxième âge ont été nourries avec des feuilles tendres de ricin, *Ricinus communis* L. (variété GCH-3), celles du troisième âge ont été nourries avec des feuilles plus mûres, les feuilles les plus matures servant à nourrir les larves du quatrième et du cinquième âge.

Dans la table de survie, la tranche d'âge (jours) est désignée par x et les séries de survivants par l_x , dx indiquant la mortalité. Si la population de départ est de 1, le taux de mortalité (dx) et les survivants (l_x) seront exprimés en fractions de 1 (n'est pas donné dans les tableaux 1 à 3). L'espérance de vie a été calculée à partir d'une population fictive stationnaire (L_x et T_x). Cependant, tous les individus ne meurent pas brutalement à la fin de l'intervalle de la tranche d'âge comme l'indique, pour faciliter les calculs, le taux de mortalité (dx) dans la table de survie. La mortalité survient d'une manière aléatoire à n'importe quel moment de l'intervalle, aussi l_x représente le nombre d'individus survivants au milieu de l'intervalle de la tranche d'âge.

La population est variable car de nouveaux individus entrent dans chacun des différents intervalles d'âge, phénomène qui peut être considéré comme la fécondité potentielle de l'espèce. Lorsqu'un certain nombre d'individus traverse une classe d'âge en vieillissant et entre ainsi dans la classe d'âge supérieure, ils sont immédiatement remplacés par d'autres individus qui proviennent de la classe inférieure. Ainsi, au sommet de la classe d'âge T_x , on compte non seulement le nombre d'individus l_x mais également tous les lots qui ont traversé cette classe d'âge. Cet élément statistique fictif est appelé T_x et représente le nombre total d'individus qui a vécu précédemment dans la classe d'âge. Cet élément statistique est calculé de bas en haut de la colonne l_x ; le total cumulé se trouve donc en haut de la colonne. Le total cumulé en haut de la colonne T_x représente ainsi la population fictive qui a survécu à tous les âges et qui nous permet de calculer l'espérance de vie (ex) en faisant le rapport T_x/l_x (Deevey, 1947).

Le taux de remplacement net (reproduction) de la population femelle est déterminé, pour chaque jour, par le produit du nombre moyen d'oeufs pondus (taux de natalité m_x) par le nombre moyen de femelles survivantes pour chaque âge (l_x). La somme de la colonne R_0 donne le remplacement total pour une femelle moyenne de chaque génération.

La capacité innée à se développer (r) est le seul élément statistique qui résume de façon adéquate les qualités physiologiques d'un animal concernant sa capacité à se multiplier (Andrewartha et Birch, 1954, p. 43.) au cours d'une génération

(T). Ceci se traduit mathématiquement par l'équation de Dublin et Lotka (1925) :

$$T = \frac{l_x \cdot m_x \cdot x}{l_x \cdot m_x}$$

$$r_m = \frac{\log_e R_0}{T}$$

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Espérance de vie (ex)

L'espérance de vie des larves est la plus longue (59 jours, Tableau 1) lorsqu'elles sont élevées en hiver. Elle est moins longue en période de mousson (42 jours Tableau 3) et en été (37 jours, Tableau 2).

On peut remarquer que l'espérance de vie du papillon *Eri* diminue constamment (Tableaux 1 à 3) au fur et à mesure qu'il vieillit, ce qui indique un taux de mortalité uniforme. C'est une tendance générale chez tous les animaux que l'on peut observer chez les moutons (Deevey, 1947), les écureuils gris (Barkalow *et al.*, 1970) et chez les humains (Ehrlich *et al.*, 1977, p. 13-14). Chez les organismes où la mortalité est très élevée parmi les jeunes, le tableau sera différent.

Taux de survie (lx)

Puisque la population de départ est de cent oeufs pour chaque répétition de l'expérience et que la nourriture donnée (feuilles de ricin) est identique pour toutes les larves, on peut raisonnablement penser que la répartition sexuelle et les taux de survie, de mortalité et de natalité dépendent des différentes conditions d'environnement auxquelles sont soumises les larves.

Le taux de survie des adultes (lx) à la fin de la pupation est de 87 en hiver (Tableau 1), de 67 en période de mousson (Tableau 3) et de 59 en été (Tableau 2). Ces chiffres montrent qu'en matière de survie, la période de mousson ne vient qu'en deuxième position après l'hiver qui est la meilleure saison. Pour ce qui concerne le taux de survie des femelles en fonction de l'âge (lx₁), on s'aperçoit qu'il est légèrement plus faible en période de mousson (Tableau 6) qu'en été (Tableau 5), mais ceci est compensé par un taux de natalité plus élevé (197 oeufs/jour) ce qui rapproche qualitativement la mousson de la meilleure saison (hiver).

Taux de reproduction net (R₀)

Le taux de reproduction net indique le nombre total de descendants femelles produit par une femelle pendant sa vie.

Ce taux est le plus élevé en hiver : 147,85 (Tableau 4) et le plus faible en été : 78,42 (Tableau 5). Il est de 99,42 en période de mousson (Tableau 6). La population atteint son chiffre maximum en hiver et décroît en période de mousson et en été. On note également que R₀ est maximal le premier jour de l'oviposition (Tableaux 4 à 6) puis diminue progressivement par la suite.

La baisse du taux de reproduction au fur et à mesure que la femelle vieillit est une observation courante par exemple Rice weevil, *Calendra ozysae* (Birch, 1948); Voles, *Microtus agretis* (Leslie et Ranson, 1940).

Capacité innée à se multiplier (r_m)

Cet élément statistique donne immédiatement le taux d'accroissement de la population qui est mathématiquement calculé comme période moyenne écoulée entre la naissance des parents et la naissance des descendants (T).

Il est intéressant de noter que la valeur de r_m (Tableau 7) est moins élevée en hiver (0,084) qu'en été (0,100) et qu'en période^m de mousson (0,105). La valeur moindre de r_m en hiver est due au temps T (Tableau 7) qui est au maximum (59,12 jours) parce^m que le métabolisme diminue lorsque la température baisse.

CONCLUSION

Les différents paramètres de la table de survie permettent de dire que la meilleure saison pour le papillon *Eri, P. ricini* est l'hiver, la mousson et l'été venant respectivement en deuxième et troisième position.

REMERCIEMENTS

L'auteur remercie le Professeur S. D. MISRA (alors Professeur et Directeur du Département de Zoologie de l'Université de Jodhpur) pour l'aide qu'il lui a apporté.

STUDIES ON DOUBLE COCOON FORMATION IN TWO RACES
OF BOMBYX MORI L. (LEPIDOPTERA : BOMBYCIDAE)

R. NARAYANAPRAKASH, K. PERIASAMY and S. RADHAKRISHNAN

Department of Botany, Bharathidasan University
Tiruchirapalli 620 023
India

The percentage of double cocoon with one male and one female was higher in both races. Volume of double cocoon increased about 70% over single cocoon in GN3 race. Number of eggs laid by double cocoon females was higher than that laid by single cocoon females. The mounting of the double cocoon progeny larvae of this race at a high density of 80 to 90/sq. ft. resulted in only 3.5% double cocoon.

INTRODUCTION

Occurrence of double cocoon, in which two larvae jointly spin a cocoon and pupate inside it, is not uncommon in silkworm. It usually constitutes about 5% of the crop. Double cocoons are unreliable. They are also not used for seed purpose because of the notion that double cocoon formation is genetic and so inheritable. So far there has been no study of the various aspects of the formation of double cocoon. We report here a preliminary study on double cocoon in two races of silkworm *Bombyx mori*.

MATERIALS AND METHODS

Disease free layings of KA x NB4D2 (Bivoltine hybrids) were purchased from Central Sericultural Research and Training Institute Extension Center, Salem, and F2 layings of polyvoltine Chinese race Guangnong-3 (GN3) prepared in our laboratory, were used in the present study. Eggs of KA x NB4D2 were hatched in August, and that of Guangnong-3 in September-October 1983 and reared on the leaves of *Morus indica*. When the larvae reached terminal phase they were left in mountage for comfortable spinning. After the completion of spinning single and double cocoons were separately harvested and counted. About 100 single cocoons were opened, the pupae removed and

sex identified, and weight and volume of the shell estimated. Shell volume (mm^3) was found out by pipetting water into the shell. The same procedure was followed for double cocoon also. The pupae of double cocoons may be two males, two females or one male and one female. The frequency of occurrence of the different combinations of pupae was studied for both races. Layings were prepared from the adult moths collected from the double cocoons of GN3 for studying double cocoon formation in the next generation also, but no layings were prepared from KA x NB4D2 race, as these eggs undergo hibernation.

RESULTS

The percentage of double cocoons containing two males, or two females or one male and one female varied in both races being 24:29:47 in KA x NB4D2 and 20:16:64 in GN3. This showed that in both races the one male and one female combination was more frequent.

In KA x NB4D2, the volume of the single cocoon was 3.2 for female and 3.1 mm^3 for male, whereas in GN3 it was 3.0 and 2.7 mm^3 respectively. The volume of the double cocoon shell containing 2 ♂, 2 ♀ and 1 ♂ : 1 ♀, increased by 38, 91 and 40% over single cocoon in KA x NB4D2, while the increase in GN3 was of 67, 67 and 72%.

Normally, the shell weight of a double cocoon is twice that of a single cocoon. In KA x NB4D2, almost all the double cocoon shells weighed 17% less than what is expected. In GN3, 71% of 1 ♀ : 1 ♂ combination weighed 8% less while the rest had the expected weight but the shell weight of all the 2 ♀ combination was 7% less.

The number of eggs laid is proportional to the weight of the adult moth. Hence weight difference between female moth emerged from single cocoon and double cocoon in GN3 was statistically analysed. The weight of double cocoon female moth showed a significant increase ($t=3.229$, df , 24, $P<0.01$) over single cocoon females. The number of eggs laid by double cocoon females also showed a significant increase ($t=3.612$, df , 20, $P<0.002$) over single cocoon females. The females collected from double cocoons were heavier and oviposited more eggs (440) than single cocoon females (365).

The percentage of double cocoons observed in double cocoon layings was 4 and 3% in F2 and F3 generation of GN3 and averaged to 3.5% (Table 1). However, only 2% of double cocoons occurred in single cocoon layings. When males or females or an equal number of male and female larvae of single cocoon progeny were mounted separately, the percentage of double cocoons was 1.5%.

DISCUSSION

The percentage of double cocoons with one female and one male was higher in KA x NB4D2 and GN3 (Pure) races. This may be due to some attractant released either by the male or female larvae during spinning and not due to random encounter of male and female. It is not yet known whether larvae can produce any such attractants. We can assume that double cocoon formation is not to ensure successful mating after the emergence, because the emergence of moths in double cocoons is almost nil. Moreover, the volume of the double cocoon is not doubled and shows only about 70% increase over the single cocoon in GN3, which is not enough to accommodate two moths and hence the free movement of moths inside the cocoon is curtailed. The difference between observed and expected weight of double cocoon shell in GN3 and KA x NB4D2 races led to assume that some amount of silk protein is conserved without being utilized for spinning the cocoon. It is possible that as the larvae reach the final

Parents of DFLs	Larvae mounted (No.)	Mounting density (No./sq.ft.)	SC (No.)	DC (No.)	DC (%)
LARVAE MOUNTED WITHOUT CONSIDERING SEX					
Double cocoon	679	80 to 90	651	28	4
Double cocoon	986	80 to 90	959	27	3
Single cocoon	1 690	80 to 90	1 658	32	2
Single cocoon	338	60 to 70	336	2	0.6
LARVAE MOUNTED WITH DEFINITE SEX RATIO					
Single cocoon					
Male only	345	80 to 90	338	7	2
Female only	312	80 to 90	310	2	0.6
Male : Female (1 : 1)	446	80 to 90	438	7	2

Table 1. Occurrence of double cocoon in layings derived from single cocoon and double cocoon moths in the race Guangnong-3 of *Bombyx mori*.

stage of spinning, the volume inside the cocoon is so much reduced as to hamper the free spinning movement and this makes the larvae terminate the spinning before the complete utilization of the silk protein for the cocoon formation.

The increase in the number of eggs produced by moths emerged from double cocoon over that of single cocoon in GN2 shows that the double cocoon moths can also be profitably used for seed purpose. The larvae derived from double cocoon laying when mounted at as high a density as 90/sq. ft., as against the optimum mounting density of 40 to 45/sq. ft. (Krishnasamy, 1978), showed only 3.5% of double cocoons in GN3 (see Table 1). This disproves the notion that double cocoon formation is genetic.

From the present work it may be concluded that double cocoons can very well be used for seed purpose. However, as the double cocoon moths are not able to pierce the shell of their own accord it is advisable to make an opening on the shell in advance.

ACKNOWLEDGEMENT

The work was done under a Research Scheme "Improvement of Sericulture in Tamil Nadu" financed by the (DST) Government of India and this help is gratefully acknowledged.

REFERENCE

KRISHNASAMY S. New Technology of Silkworm Rearing, 1978, Bulletin n°2, Central Sericultural Research and Training Institute (Mysore).

ETUDES SUR LA FORMATION DU COCON DOUBLE CHEZ DEUX RACES
DE BOMBYX MORI L. (LEPIDOPTERA : BOMBYCIDAE)

R. NARAYANAPRAKASH, K. PERIASAMY and S. RADHAKRISHNAN

Department of Botany, Bharathidasan University
Tiruchirapalli 620 023
India

Le pourcentage de cocons doubles contenant un mâle et une femelle est le plus élevé chez les deux races. chez la race GN3, le volume du cocon double augmente d'environ 70 % par rapport à celui du cocon simple. Le nombre d'oeufs pondus par des femelles provenant de cocons doubles est plus élevé que celui obtenu chez les femelles de cocons simples. La montée des larves de cette race de cocons doubles effectuée avec une forte densité de 800 à 900 larves au m² ne donne que 3,5 % de cocons doubles.

INTRODUCTION

Il n'est pas rare que deux vers à soie tissent ensemble un cocon qui les enveloppera et dans lequel ils se métamorphoseront. Environ 5 % des cocons sont doubles. Les cocons doubles ne sont pas dévidables. Ils ne sont pas utilisés pour la reproduction car on suppose que cette caractéristique est génétique et donc héréditaire. Jusqu'à présent, aucune étude n'a été faite sur les divers aspects de la formation du cocon double. Nous indiquons ici les résultats d'une étude préliminaire sur le cocon double chez deux races de vers à soie *Bombyx mori*.

MATERIELS ET METHODES

Nous avons utilisé une ponte saine de KA x NB4D2 (hybrides bivoltins) achetée au Central Sericultural Research and Training Institute Extension Center de Salem et une ponte F2 de la race chinoise polyvoltine Guangnong-3 (GN3) obtenue dans notre laboratoire. Les oeufs de KA x NB4D2 ont éclos en août, ceux de Guangnong-3 (GN3) ont éclos en septembre-octobre 1983. Les larves ont été nourries sur des feuilles de *Morus indica*. La montée s'est effectuée librement. Les cocons simples et doubles

ont été ramassés séparément puis comptés. Environ 100 cocons simples ont été ouverts. Les chrysalides ont été enlevées et sexées, le poids et le volume de la coque soyeuse ont été déterminés. Le volume de la coque (mm³) a été calculé en versant de l'eau dans la coque au moyen d'une pipette. La même opération a été faite pour les cocons doubles. Les chrysalides des cocons doubles peuvent être soit deux mâles, soit deux femelles soit encore un mâle et une femelle. La fréquence des différentes combinaisons de chrysalides a été étudiée chez les deux races. Les pontes ont été préparées à partir de papillons adultes provenant de cocons doubles de GN3 afin d'étudier également la formation du cocon double chez la génération suivante. Aucune ponte de KA x NB4D2 n'a été préparée car ces oeufs subissent une hibernation.

RESULTATS

Le pourcentage de cocons doubles contenant deux mâles, deux femelles ou un mâle et une femelle varie chez les deux races. Chez KA x NB4D2, il est respectivement de 24, 29 et 47; chez GN3 il est de 20, 16 et 64. Ces chiffres montrent clairement que chez les deux races, la combinaison un mâle-une femelle est plus fréquente.

Chez KA x NB4D2, le volume du cocon simple est de 3,2 mm³ pour le cocon femelle et de 3,1 mm³ pour le cocon mâle. Chez GN3, le volume est respectivement de 3,0 et de 2,7 mm³. Le volume du cocon double contenant deux mâles, deux femelles ou un mâle et une femelle augmente respectivement de 38, 91 et 40 % par rapport au cocon simple chez KA x NB4D2. Chez GN3, l'augmentation de volume est respectivement de 67, 67 et 72 %.

Le poids de la coque soyeuse d'un cocon double est normalement deux fois plus élevé que celui du cocon simple. Chez la race KA x NB4D2, presque toutes les coques soyeuses des cocons doubles pèsent 17 % de moins que prévu. Chez la race GN3, 71 % des coques de la combinaison un mâle une femelle pèsent 8 % de moins que prévu, mais toutes les coques de la combinaison deux femelles pèsent 7 % de moins.

Le nombre d'oeufs pondus est proportionnel au poids du papillon adulte. Aussi a-t-on analysé statistiquement chez la race GN3 la différence de poids entre les papillons femelles émergeant de cocons simples et les papillons femelles émergeant de cocons doubles. Le poids des papillons femelles de cocon double est supérieur à celui des papillons femelles de cocon simple. ($t=3,229$, df , 24, $P<0,01$). Les femelles provenant de cocons doubles sont plus lourdes et ont une oviposition plus nombreuse (440) que les femelles de cocon simple (365).

Le pourcentage de cocons doubles chez les pontes de GN3 de cocons doubles est de 4 pour la génération F2, il est de 3 pour la génération F3, soit une moyenne de 3,5 % (Tableau 1). Chez les pontes de cocons simples, seulement 2 % des cocons sont doubles. Lorsque les larves mâles ou les larves femelles ou un nombre égal de larves mâles et femelles issues de cocons simples sont placés séparément pour la montée, le pourcentage de cocons doubles est de 1,5 %.

DISCUSSION

La combinaison un mâle une femelle dans les cocons doubles est la plus fréquente chez les races (pures) KA x NB4D2 et GN3. Cela est peut-être dû à une substance attirante dégagée soit par la larve mâle soit par la larve femelle pendant le tissage du cocon. Il n'est cependant pas encore établi que les larves puissent produire de telles substances. Nous ne pouvons pas supposer que la formation du cocon double assure le succès de l'accouplement après l'émergence car l'émergence des papillons chez les cocons doubles est presque nulle. De plus, le volume du cocon double n'augmente que de 70 % par rapport au cocon simple chez la race GN3. Ce n'est pas suf-

Parents	Nbre de larves encabanées	Densité d'encabanage (Nbre/m ²)	CS (Nbre)	CD (Nbre)	CD (%)
LARVES ENCABANEES, SANS DISCRIMINATION DE SEXE					
Cocon double	679	800 à 900	651	28	4
Cocon double	986	800 à 900	959	27	3
Cocon simple	1 690	800 à 900	1 658	32	2
Cocon simple	338	600 à 700	336	2	0.6
LARVES ENCABANEES, SELON LE SEXE					
Cocon simple					
Mâles	345	800 à 900	338	7	2
Femelles	312	800 à 900	310	2	0.6
Mâles/Femelles (1/1)	446	800 à 900	438	7	2

Tableau 1. Fréquence des cocons doubles dans les pontes dérivées de papillons à cocon simple et double chez la souche Guangnong-3 de *Bombyx mori*.

faisant pour abriter deux papillons et de ce fait, leur liberté de mouvement à l'intérieur du cocon est limitée. Chez les races KA x NB4D2 et GN3, la différence entre le poids réel de la coque du cocon double et celui auquel on pouvait s'attendre, permet de supposer qu'une certaine quantité de protéine de soie n'est pas utilisée pour le tissage du cocon. Il est possible qu'au dernier stade du tissage, le volume intérieur du cocon est si réduit qu'il gêne les mouvements des larves. Celles-ci terminent alors le tissage avant que toute la protéine de soie destinée à la formation du cocon ne soit utilisée.

Chez GN3, les papillons provenant de cocons doubles pondent plus d'oeufs que les papillons provenant de cocons simples, ce qui indique que les papillons de cocons doubles peuvent être également utilisés en vue du grainage. Les larves dérivées de pontes de cocons doubles ne donnent que 3,5 % de cocons doubles chez GN3 lorsque la montée s'effectue avec une densité très élevée de l'ordre de 900 larves au m² - la densité maximale est de 400 à 450 larves au m² - (Krishnasamy, 1978) (cf. Tableau 1). Ceci réfute le principe selon lequel la formation du cocon double est génétique.

En conclusion, nous pouvons dire que les cocons doubles peuvent très bien être utilisés pour le grainage. Cependant, les papillons de cocons doubles ne pouvant percer tous seuls la coque du cocon, il est recommandé de pratiquer une ouverture dans la coque avant l'éclosion.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué dans le cadre d'un plan de recherche "Amélioration de la Sériciculture dans le Tamil Nadu" financé par le gouvernement indien (DST) dont l'aide fut précieuse.

REFERENCE

KRISHNASAMY S. New Technology of Silkworm Rearing, 1978, Bulletin n° 2, Central Sericultural Research and Training Institute (Mysore).

KAEMPFEROL, A NEW PIGMENT IN THE YELLOW COCOON OF BOMBYX MORI

R. THANGAMANI and M. VIVEKANANDAN

Department of Botany, Bharathidasan University,
Tiruchirappalli 620 023,
India.

The yellow colour of the silk cocoon of Bombyx mori L. is due to kaempferol, a flavonol and not due to carotenoids as reported in literature. β -carotene, present in the leaves of Morus indica could not be located in the yellow cocoons but only kaempferol, a flavonol. Therefore, it is suggested that Apiginin (flavone) present in the leaves of Morus may be hydroxylated to kaempferol either in the guts or in the silk gland of the larvae.

INTRODUCTION

In silk cocoons of *Bombyx mori* L., white and yellow colours are common in India. The yellow colour mostly produced in multivoltine races was reported to be derived from the colour of the carotenoid pigments present in mulberry leaves via silk glands after assimilation through the guts and haemolymph of the larvae (Jucci, 1935; Mununta, 1937; Doira, 1978). The aim of the present study is to find out the pigment responsible for the yellow colour in the silk cocoon and compare it with *Morus indica* L. leaf pigments.

MATERIALS AND METHODS

The cocoons were raised in the university sericulture rearing shed from the eggs (variety L x NB₄D₂, a cross breed of the multivoltine and a bivoltine) obtained from the Tamil Nadu Government's sericultural grainage, Salem, India. The leaf of Berhampur local variety of *Morus indica* was used as feeding. 500 mg of fresh mulberry leaves was ground using motor and pestle in 20 ml of 3:1 chloroform-methanol mixture. The homogenate was filtered and the filtrate was spun at 3000 g using K-24. The supernatant was evaporated in a water bath at 70°C and the residue dissolved in 5ml of hexane and the carotene was eluted through an alumina column (1 x 20 cm) using 25 ml hexane. The eluted carotenes were analysed for their spectral characteristics

in both UV and visible regions using Spectronic-2000. The residue of hexane fraction obtained by boiling over a water bath was dissolved in ethanol and its spectral absorption determined. Another 500 mg of fresh leaves was extracted in ethanol and the 3000 g supernatant was partitioned with petroleum ether to remove the chloroplast pigments in a separating funnel. The ethanol portion was decanted and its spectral characteristics were studied in both UV and visible regions for presence of flavonoids.

5 g of yellow silk cocoons was cut into bits and extracted in 50 ml of boiling ethanol (80 %) till the cocoon was completely bleached. The extract was centrifuged at 3000 g for 5 minutes. 5 ml of the supernatant was taken in each of 5 different test tubes and evaporated to dryness over a water bath at 70°C. The residue was dissolved in 5 ml of ethanol, hexane, petroleum-ether, acetone and chloroform separately and analysed for spectral characteristics in both the UV and visible regions.

RESULTS AND DISCUSSION

The hexane fraction of the mulberry leaves showed characteristics absorption maxima at 426, 453 and 484 nm and the ethanol fraction at 425, 444 and 475 nm which correspond to β -carotene (Karrer & Jucker, 1950; Katayama *et al.*, 1972). But the cocoon extracts did not show any absorption in this region. Instead, it showed strong absorption at 214, 254 and 363 nm. To study the nature of this pigment, absorption shift characteristics before and after addition of sodium ethoxide, aluminium chloride, HCl, sodium acetate and boric acid were obtained. From the given in Table 1, the pigment responsible for the yellow colour of the cocoon was identified as kaempferol (Mabry *et al.*, 1970), a flavonol. The ethanol fraction of mulberry leaves showed absorption peaks at 225, 271 and 335 nm, characteristic of the pigment, apiginin, a flavone (Mabry *et al.*, 1970). The yellow colouration of the silk cocoon of *Bombyx mori* was attributed to carotenoid pigments of the mulberry leaf feed (Vaney & Pelosse, 1922; Harizuka, 1953).

But the present study clearly indicates that the yellow colour of the cocoon is due to kaempferol and not due to carotenoids. The leaf extract indicates the presence of only the flavone, apiginin. This suggests that this flavone might undergo hydroxylation during the digestion of leaf in the gut of the silkworm to form flavonol, which is responsible for the yellow colour. Therefore, it is rather difficult to comprehend the earlier view (Jucci, 1935; Mununta, 1937) that the leaf carotenoids could be transferred from the gut of the larvae to the silk gland and finally to the shell of the cocoon. This is further supported by the research work that β -carotene of the leaf feed is utilised in the enhancement of egg production by the moth (Kwata *et al.*, 1968). It is also not known whether carotenoids play any part in insect physiology, although in mammals vitamin A is the derivative of carotene.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors kindly acknowledge the financial assistance provided by the Department of Science and Technology, New Delhi, and Dr. S. Nagarjan, Department of Chemistry, Bharathidasan University, Tiruchirappalli for his kind help in identifying the pigments.

Tableau 1. Caractéristiques d'absorption et de mouvement de l'extrait à 80 % d'éthanol du cocon de *Bombyx mori*.

Table 1. Absorption and shift characteristics of 80% ethanol extract of the shell of *Bombyx mori*.

Additifs/ Additives	max (nm)			
	I	II	I	II
Ethanol (normal)	363	254		
EtOH + NaOEt	420	273	57	19
EtOH + AlCl ₃	419	261	56	9
EtOH + AlCl ₃ + HCl	417	260	54	6
EtOH + NaOAc	382	273	19	19
EtOH + NaOAc + Boric acid	369	272	6	18

REFERENCES

- DOIRA H. (1978) : "Silkworm, an important laboratory tool"., Ed. Tazima, Y. Kodensha Publication, Tokyo, p. 61.
- HARIZUKA M. (1953) : Bull. Sericult. Exp. Sta., 14, p. 153.
- JUCCI C. (1935) : Arch. Zool. Ital., 22, p. 259.
- KARRER P., JUCKER E. (1950) : "Carotenoids" Elsevier, New York and Amsterdam.
- KATYAMA T., KATAMA T., CHICHESTER C.O. (1970) : Int. J. Biochem., 3, p. 363.
- KUWATA K., YAMAMATO E., HAMAMURA Y. (1968) : J. Seric. Sci. Japan, 37, p. 63.
- MABRY T.J., MARKHAM K.R., THOMAS M.B. (1970) : "The systematic identification of flavonoids", Springer Verlag, New York.
- MUNUNTA G. (1937) : Arch. Zool. Ital., 24, p. 385.
- VANEY G., PELOSSE J. (1922) : C. R. Acad. Sci., 174, p. 1566.

LE KAEMPFEROL, UN NOUVEAU PIGMENT DU COCON JAUNE DE BOMBYX MORI

R. THIANGAMANI et M. VIVEKANANDAN

Department of Botany, Bharathidasan University,
Tiruchirappalli 620 023,
India.

Le cocon du Bombyx mori doit sa couleur jaune au kaempferol, un flavonol, et non aux caroténoïdes comme l'indique la bibliographie. Le β -carotène que l'on trouve dans les feuilles de Morus indica n'a pu être détecté dans les cocons jaunes. Seul le kaempferol, un flavonol, a été décelé. Aussi peut-on supposer que l'apigénine (flavone) présente dans les feuilles de Morus peut être hydroxylée en kaempferol soit dans l'intestin, soit dans la glande séricigène de la larve.

INTRODUCTION

En Inde, les cocons de *Bombyx mori* L. sont fréquemment blancs et jaunes. La couleur jaune, que l'on trouve surtout chez les races multivoltines a été attribuée aux pigments caroténoïdes présents dans les feuilles de mûrier (Jucci, 1935 ; Mununta, 1937 ; Doira, 1978). Le but de cette étude est de découvrir le pigment qui donne au cocon sa couleur jaune et de le comparer aux pigments des feuilles de *Morus indica* L.

MATERIEL ET METHODES

L'élevage s'est déroulé au Centre d'Elevage Séricicole de l'Université, avec des oeufs de la variété L x NB₂D₂, un croisement de multivoltin et bivoltin. Ces oeufs proviennent du Centre de Grainage de Salem, Gouvernement du Tamil Nadu, Inde. Les feuilles d'une variété locale du Berhampur de *Morus indica* sont utilisées comme aliment. 500 mg de feuilles fraîches sont pilés et mélangés à une préparation de 20 ml de chloroforme méthanol (3/1). L'homogénat est filtré et le résidu est centrifugé à 3 000 g par K-24. Après évaporation dans un bain-marie à 70° C, le résidu est dissout dans 5 ml d'hexane et le carotène est élué à travers une colonne d'alumine de 1 x 20 cm avec 25 ml d'hexane. Les caractéristiques des carotènes élués sont ana-

lysées au moyen du Spectronic 2000 à la fois dans les régions UV et dans les régions visibles. Le résidu de la fraction d'hexane obtenu par évaporation au bain-marie bouillant est dissout dans de l'éthanol et son spectre d'absorption est déterminé. Un autre lot de 500 mg de feuilles fraîches est dissout dans de l'éthanol et le surnageant obtenu à 3 000 g est fractionné avec de l'éther de pétrole pour en séparer les pigments chloroplastiques dans un ballon de décantation. La fraction d'éthanol est décantée et son spectre est étudié à la fois dans les régions UV et les régions visibles pour déterminer la présence de flavonoïdes.

5 g de cocons jaunes sont coupés en morceaux et dissouts dans 50 ml d'éthanol bouillant (solution à 80 %) jusqu'à ce que le cocon devienne complètement blanc. L'extrait est centrifugé à 3 000 g pendant 5 minutes. 5 ml de chaque extrait sont disposés dans 5 tubes à essai différents et soumis à évaporation complète au-dessus d'un bain à 70° C. Le résidu est dissout séparément dans 5 ml d'éthanol, d'hexane, d'éther de pétrole, d'acétone et de chloroforme. Leur spectre est ensuite analysé dans les régions UV et les régions visibles.

RESULTATS ET DISCUSSION

La fraction d'hexane des feuilles de mûrier a son absorption maximale à 426, 453 et 484 nm et la fraction d'éthanol, à 425, 444 et 475 nm, ce qui correspond au β -carotène (Karrer et Jucker, 1950 ; Katayama *et al.*, 1972). Mais les extraits de cocon ne montrent pas d'absorption dans cette région. Ils montrent une forte absorption en revanche à 214, 254 et 363 nm. Pour connaître la nature de ce pigment, on a analysé les caractéristiques de l'absorption avant et après l'addition d'éthoxyde de sodium, de chlorure d'aluminium, d'acide chlorhydrique, d'acétate de sodium et d'acide borique. Le Tableau 1 montre que le pigment responsable de la couleur jaune du cocon est le kaempférol (Mabry *et al.*, 1970), un flavonol. La fraction d'éthanol des feuilles de mûrier montre des pics d'absorption à 225, 271 et 335 nm, ce qui est caractéristique de l'apiginine, un flavonol (Mabry *et al.*, 1970). La coloration jaune du cocon de *B. mori* est attribuée habituellement aux pigments caroténoïdes de la feuille de mûrier (Vaney et Pelosse, 1922 ; Harizuka, 1953).

Mais la présente étude indique clairement que la couleur jaune du cocon est due au kaempférol et non aux caroténoïdes. L'extrait de feuille montre uniquement la présence de l'apiginine. Ceci suggère que ce flavone subit peut-être une hydroxylation pendant la digestion de la feuille dans l'intestin du ver à soie et forme un flavonol lui-même à l'origine de la couleur jaune. Il est donc assez difficile de comprendre les points de vue antérieurement exprimés (Jucci, 1935 ; Munnta, 1937) selon lesquels les caroténoïdes de la feuille pourraient être transférés de l'intestin de la larve à la glande séricigène, et enfin à la coque soyeuse. Ceci a été appuyé par le travail de recherche effectué par Kwata *et al.*, 1968, selon lequel le β -carotène de la feuille aliment est utilisé par le papillon pour favoriser la production des oeufs. On ne sait pas non plus si les caroténoïdes jouent un rôle dans la physiologie de l'insecte, bien que chez les mammifères, la vitamine A soit un dérivé du carotène.

REMERCIEMENTS

Les auteurs adressent leurs remerciements au Department of Science & Technology, New Delhi, pour son aide financière, et au Dr S. Nagarjan, Department of Chemistry, Bharathidasan University, Tiruchirappalli, pour l'aide précieuse qu'il a apporté lors de l'identification des pigments.

ARTICLES SCIENTIFIQUES

SCIENTIFIC PAPERS

EVOLUTION DES TAUX D'ECDYSTEROIDES DE L'OEUF ET DE
L'EMBRYON DE BOMBYX MORI EN FONCTION DU TYPE DE
DEVELOPPEMENT NON DIAPAUSANT OU DIAPAUSANT

Madeleine COULON

Département de Biologie Générale et Appliquée,
Laboratoire de Biologie des Populations (LA CNRS 243)
Université Claude Bernard Lyon I.
43, Boulevard du 11 Novembre 1918,
69622 VILLEURBANNE
France.

La diapause, période particulière du développement permettant à l'organisme de synchroniser ses phases d'activité aux conditions de l'environnement, peut se situer à différents stades du programme de développement de l'insecte. *Bombyx mori* apparaît comme un bon modèle pour l'étude de la diapause: cet insecte présente suivant les races (monovoltine, bivoltine, polyvoltine) une diapause embryonnaire précoce au stade gastrula. Lors du développement des races bivoltines, les conditions de l'environnement (photopériode, température) n'interviennent pas directement sur le stade diapausant, mais sur l'embryon de la génération précédente. Durant le développement pupal, le déterminisme de l'ovocyte dans le sens diapausant est lié à l'action d'une hormone de diapause (HD). (pour revue Cf. M. COULON soumis pour publication).

L'oeuf déterminé comme diapausant présente certaines caractéristiques, en particulier du métabolisme des carbohydrates (travaux de HASEGAWA, YAMASHITA, et al.). Nous nous intéressons aux caractéristiques hormonales de l'oeuf diapausant. En effet, de nombreux travaux ont mis en évidence l'importance du groupe des hormones stéroïdiennes dans l'oeuf d'insecte (MIZUMO et al. 1975, KAPLANIS et al. 1973, LAGUEUX et al. 1977, HERN et al. 1977, IMBODEN et al. 1978, HSIAO et al. 1979, BULLIERE et al. 1979, LOUVET et al. 1979, GANDE et al. 1979, DINAN et al. 1980...). Ces ecdystéroïdes joueraient un rôle prépondérant durant l'embryogenèse (LAGUEUX et al. 1979, 1980, 1981, 1982, 1983). Les ecdystéroïdes d'origine maternelle jouent un rôle important au moins jusqu'à la blastocinèse (SALL et al. 1983). Chez *Bombyx mori*, les ecdystéroïdes de l'oeuf sont synthétisés et accumulés par l'ovaire durant le développement pupal (LEGAY et al. 1976, OHNISHI et al. 1977, COULON et al. 1980). Chez cet insecte cinq types de molécules d'ecdystéroïdes ont été identifiées à ce jour dans l'ovocyte ou dans l'oeuf à la ponte: ecdysone, 2-déoxyeecdysone, 2-déoxy-20-OH-ecdysone, 20-OH-ecdysone, 2-22-bidéoxyeecdysone, ces ecdystéroïdes étant présents sous forme libre ou conjuguée (IKEKAWA et al. 1980, OHNISHI 1981). Peut-on observer une différence quantitative ou qualitative entre les oeufs déterminés durant le développement pupal

comme diapausant (D) ou non diapausant (ND) ? L'embryogenèse post-diapause diffère-t-elle en ce qui concerne les ecdystéroïdes par rapport aux stades correspondants du développement continu ?

MATERIEL ET TECHNIQUES

Les oeufs de trois races de *Bombyx mori* sont utilisés :

Une race bivoltine C108 étudiée durant la génération diapausante (D) et la génération non diapausante (ND) de l'oviposition à l'éclosion. L'embryogenèse a lieu dans les conditions suivantes :

1ère génération : 18-19°C, obscurité. Les femelles issues de ces embryons donneront des oeufs ND.

2ème génération : 25°C, photopériode longue. Les femelles issues de ces embryons donneront des oeufs D.

Deux races monovoltines européennes 141 et hybride 200x300. L'incubation a lieu à 22°C.

L'évolution de la pigmentation des oeufs D nous sert de critère de synchronisation du développement durant l'embryogenèse et l'initiation de la diapause. Les oeufs ND sont synchronisés lors de la ponte, la femelle est déplacée toutes les deux heures durant celle-ci; les prélèvements sont effectués en fonction du temps de développement après la ponte. Les embryons de l'hybride 200x300 sont disséqués sous la loupe durant l'embryogenèse post-diapause du stade E à l'éclosion (COULON 1967); les embryons C108 sont isolés du stade G₄ à l'éclosion. Lors des micro-dissections toute trace de vitellus est soigneusement écartée (à l'exception du vitellus contenu dans le mesenteron).

Les échantillons sont broyés dans du méthanol 60% pour en extraire des ecdystéroïdes, puis chauffés à 56°C. Après centrifugation à 8000g le surnageant est prélevé, le culot lavé trois fois à l'éthanol. Après évaporation sous courant d'azote, les stéroïdes sont repris dans du tampon citrate (0,1M, pH 6,2) et dosés en par radioimmunologie-RIA selon la méthode de DE REGGI et al., 1975. Les anticorps et l'antigène [25] nous ont été fournis par HIRN (Laboratoire d'immunologie CNRS-INSERM de Marseille). Les échantillons extraits comme précédemment peuvent être soumis à une chromatographie liquide HPLC., les fractions étant dosées en RIA.

RESULTATS

Les valeurs données sont exprimées en pmol équivalent ecdystérone, et représentent les moyennes de deux à cinq extractions totalement indépendantes. Les échantillons comprennent 10 embryons par stade ou 10-50 ou 100 oeufs par stade.

La figure 1 nous donne le schéma du développement pour les deux types de races.

1. EVOLUTION DU TAUX GLOBAL DES ECDYSTEROÏDES AU COURS DE L'EMBRYOGENESE

1.1. Evolution entre la ponte et la gastrula. (stade A)

Les oeufs ND ont atteint ce stade 24 heures après la ponte à 25°C, ce stade ne sera atteint qu'après trois jours à 22°C pour les oeufs 200x300 (figure 1).

On enregistre un pic d'ecdystéroïdes (S) précédant la sécrétion de la cuticule sérosale et le début de la pigmentation de la séreuse des oeufs (D) (stade Y : oeufs

jaunes, la pigmentation apparaît au stade P : oeufs rosés). Ces données sont représentées figure 2.

1.2. Evolution entre la gastrula et l'éclosion

Cette évolution a été enregistrée soit au niveau de l'oeuf soit dans l'embryon isolé.

Evolution dans l'oeuf : en ce qui concerne l'hybride 200x300 nos premiers dosages mettaient en évidence trois pics d'ecdystéroïdes durant cette phase de l'embryogenèse (HIRN et al., 1976). Ces données concernant l'embryogenèse post-diapause sont représentées figure 3. Ces trois pics se retrouvent lors du développement continu de la génération (ND) des C108 (Figure 4).

Le pic I précède la blastocinèse, il est relativement peu important. Le pic II suit la blastocinèse et la différenciation de la glande prothoracique, ce pic est très supérieur au précédent. Le pic III précède la mue embryonnaire et le dépôt de la cuticule larvaire, il suit l'ingestion du vitellus par la pré-larve.

Evolution dans l'embryon : nous mettons en évidence le pic II qui suit la blastocinèse et la fermeture dorsale de l'embryon, une partie du vitellus est dès lors présente dans le mésenteron, une cuticule embryonnaire avec des soies est sécrétée. (Figure 5). Nous observons le pic III en fin d'embryogenèse, avant la sécrétion de la première cuticule larvaire, et lorsque plus aucune trace de vitellus "libre" n'est présente dans l'oeuf.

Nous remarquons que la quantité d'ecdystéroïdes de l'embryon au stade G_4 est la même que l'embryogenèse ait été continue ou interrompue par une diapause : 300pg/embryon pour (ND) et 290pg/embryon pour (D).

II. EVOLUTION DU TAUX GLOBAL DES ECDYSTEROÏDES EN LIAISON AVEC L'INITIATION DE LA DIAPAUSE, ET LA DIAPAUSE

Il apparaît figure 2A qu'une quantité d'ecdystéroïdes très supérieure est présente dans l'oeuf déterminé comme diapausant au moment du pic S (précédant le dépôt de la cuticule sérosale) :

ND : $2 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ d'oeuf	race C108
D : $12 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ d'oeuf	

Une étude de deux races strictement monovoltines (après RIA : figure 2A, ou HPLC suivie d'un RIA sur chacune des fractions : figure 2B) met en évidence :

un pic S très important

un deuxième pic qui serait lié à l'entrée en diapause au stade Gr + 1 jour (pigmentation grise de la séreuse).

La quantité d'ecdystéroïdes diminue ensuite au cours de la diapause pour atteindre $1 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ d'oeuf (données non représentées). Les premières données feraient apparaître une différence qualitative de la composition en ecdystéroïdes.

CONCLUSION - DISCUSSION

Nous avons retrouvé chez *Bombyx mori* quatre pics caractéristiques de l'embryogénèse décrits chez *Locusta* (LAGUEUX et al.). Le premier pic (S) précède la mise en place de la cuticule sérosale. Les trois autres pics se situent durant la morphogénèse. Deux d'entre eux (pic II et pic III) au moins sont observés dans l'embryon isolé. Cependant nous devons noter que si ces pics précèdent l'élaboration des cuticules (embryonnaire et première cuticule larvaire) ils suivent l'incorporation d'une partie ou de la totalité du vitellus dans l'embryon. Si, comme cela est observé chez *Locusta* (LAGUEUX et al. 1982), les ecdystéroïdes sous forme conjuguée sont liés à la vitellogénine, l'augmentation du taux des ecdystéroïdes pourrait être en relation avec ces faits.

Enfin nous soulignerons plus particulièrement deux points :

- la présence d'une quantité d'ecdystéroïdes très supérieure dans l'oeuf diapausant au moment du pic S ;
- un pic d'ecdystéroïdes est observé au stade gris + 1 jour (Gr₁), soit à l'entrée en diapause des oeufs.

Un petit pic de 20-OH-ecdysone est observé chez *Pimpla instigator* (CLARET et al., 1978) et chez *Ostrinia* (BEAN et al., 1983) (à diapause larvaire), à l'entrée en diapause. En conclusion, nous observons chez l'oeuf déterminé comme diapausant une quantité très supérieure d'ecdystéroïdes qui serait liée à la diapause.

Les travaux d'OHNISHI et al. (1975-1977), tendent à mettre en évidence qu'une majorité des ecdystéroïdes se trouve sous forme conjuguée. Nos propres analyses (après TLC, HPLC et RIA, précédées d'une hydrolyse des produits à haute polarité) confirment ces observations. Nous savons que l'anticorps utilisé pour nos dosages RIA, présente un coefficient de liaison très différent suivant le type de conjugué dosé, affinité toujours très inférieure à celle observée pour les molécules d'hormones libres. Ainsi les quantités d'ecdystéroïdes sont sous-estimées. Par ailleurs, l'ensemble des molécules d'ecdystéroïdes conjugués représente :

- d'une part des ecdystéroïdes d'origine maternelle, qui peuvent être considérés comme molécules "stock", à l'origine d'hormone libre active au moins au début de l'embryogénèse ;
- d'autre part des produits de dégradation au cours de l'embryogénèse.

Notre hypothèse est donc la suivante :

Une forte proportion de molécules d'ecdystéroïdes d'origine maternelle sous forme de conjugués "de réserve" est présente dans l'oeuf diapausant. En fin de développement de diapause, ces conjugués libèrent des molécules d'ecdystéroïdes libres, (ou tout au moins une forme active) permettant la reprise de l'embryogénèse, ce qui est corroboré par l'observation :

- 1) d'une augmentation du taux d'ecdystéroïdes en fin de développement de diapause à 5°C (HIRN et COULON 1977)
- 2) de la reprise de l'embryogénèse après un traitement à l'ecdysone ou la 20-OH-ecdysone (GARIB et al., 1980); une protéosynthèse de type embryonnaire est observée (COULON et DOREL, 1983).

- 3) par l'observation de l'augmentation du taux d'hormone libre et une reprise de l'embryogenèse après traitement à HCl (COULON et DOREL, 1983, et soumis pour publication).

Nous rappelons qu'une autre molécule : le glycogène, est beaucoup plus abondante dans l'ovocyte déterminé comme diapausant (+35% dans l'ovocyte D par rapport à ND); ce glycogène donnant une molécule de réserve : le sorbitol à l'initiation de la diapause. Le glycogène, molécule mobilisable pour l'embryogenèse étant libéré en fin de développement de diapause, l'ensemble de ces processus s'effectuant à 5°C. Il est à remarquer qu'un traitement à HCl entraîne les mêmes modifications du métabolisme des molécules de carbohydrates (travaux de HASEGAWA et al. et de YAMASHITA et al.).

Ainsi nous donnerons le schéma suivant :

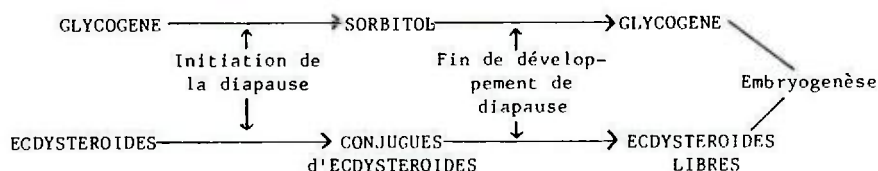


Figure 1. Evolution du développement embryonnaire de *Bombyx mori*.

* Embryogenèse continue ND

* Embryogenèse interrompue par une diapause (D) au stade gastrula, ou Gr de la pigmentation de la séreuse

A, D, ... : stades de l'embryogenèse (COULON 1967)

Y ... Gr : évolution de la pigmentation sérosale des oeufs diapausants (cf. figure 2)

Figure 1. Evolution of the embryonic development of *Bombyx mori*.

* Continuous embryogenesis ND

* Diapause interrupted embryogenesis (D) at the gastrula stage, or Gr stage of the serous pigmentation.

A, D, ...: embryogenesis stages (COULON 1967)

Y ... Gr: serosal pigmentation evolution of the diapausing eggs (cf. figure 2)

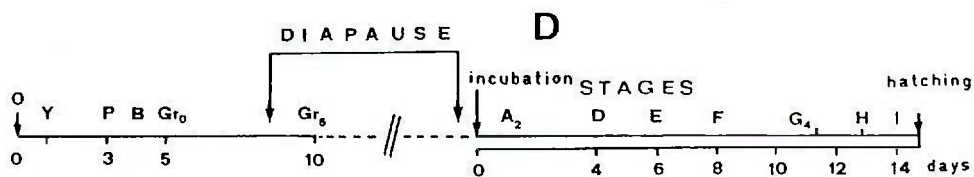
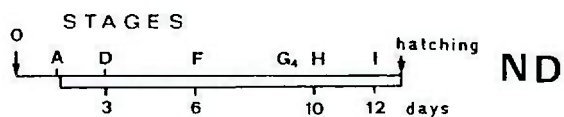


FIGURE 1

Figure 2. Evolution du taux des ecdystéroïdes de l'oeuf de *Bombyx mori*.

- * Développement non diapausant (ND) de la ponte au stade D
- * Développement diapausant (D) de la ponte à la gastrula (stade A), et à l'initiation de la diapause
 - hybride 200x300 monovoltin
 - 141 : monovoltin
 - C108 : bivoltin
- A : extraction au méthanol 60 %, dosage RIA global (RIA Marseille)
- B : extraction au méthanol 60 %, suivie d'une analyse en HPLC (gradient acétonitril-eau, colonne reverse phase Rp8 Merck), chaque fraction est dosée par RIA ; la courbe représente la somme des fractions RIA+
- S : pic précédant la sécrétion de la cuticule sérosale
- D : pic lié à l'initiation de la diapause
- I : pic lié au développement embryonnaire des oeufs ND
- O : oviposition ; Y : oeuf jaune : séreuse non pigmentée ; P : oeuf rosé ; B : oeuf brun ; Gr : oeuf gris. L'évolution de la pigmentation de la séreuse permet la datation précise des oeufs. Gr₁ ... Gr₅ : pigmentation totale depuis 1 jour à 5 jours. Température 22-23° C

Figure 2. Evolution of the ecdysteroid level of the egg of *Bombyx mori*.

- * Non diapausing development (ND) from laying to D stage
- * Diapausing development (D) from laying to gastrula (A stage) and to diapause initiation
 - 200x300 monovoltine hybrid
 - 141 monovoltine
 - C108 bivoltine
- A: 60% methanol extraction, total RIA assay (RIA Marseille)
- B: 60% methanol extraction, followed by an analysis in HPLC (acetonitril-water gradient, reverse phase column Rp8 Merck), each fraction being titrated by RIA; the curve indicates the RIA+ fraction sum
- S: peak preceding the serosal cuticle secretion
- D: peak related to the diapause initiation
- I: peak related to the embryonic development of the ND eggs
- O: oviposition; Y: yellow egg: non pigmented serosa; P: pinky egg; B: brown egg; Gr: grey egg. The serous pigmentation evolution allows a precise datation of the eggs. Gr₁ ... Gr₅: total pigmentation from 1 day to 5 days. Temperature 22-23°C

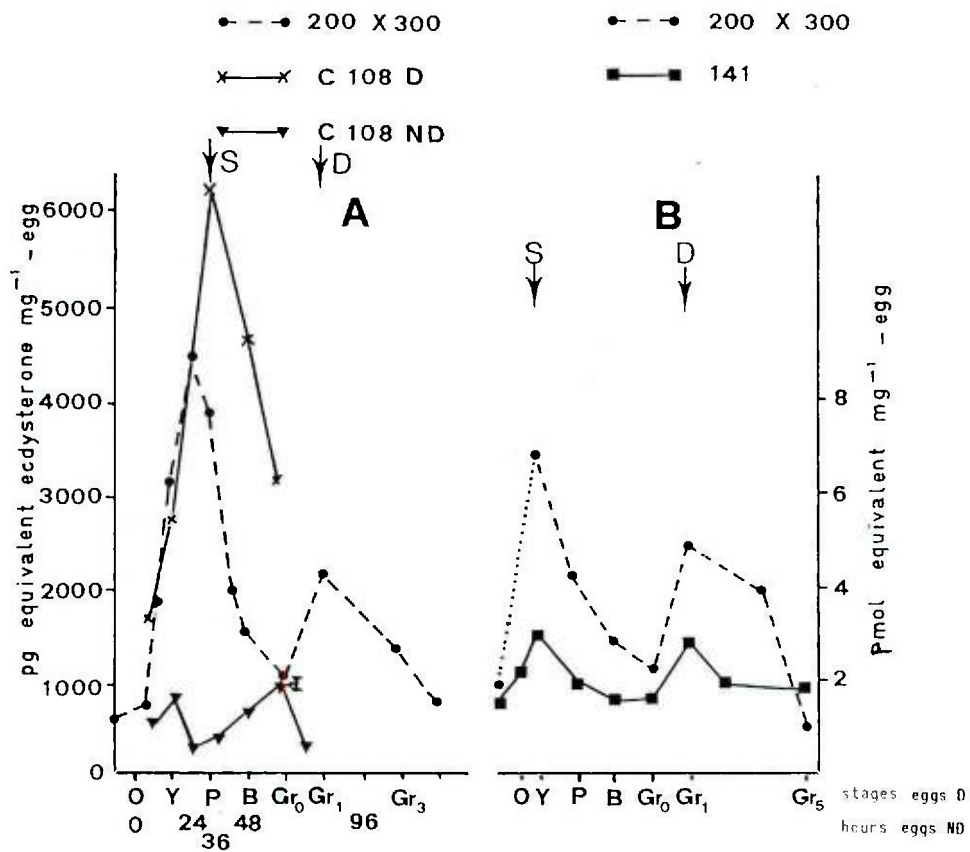


FIGURE 2

Figure 3. Evolution du taux d'ecdystéroïdes de l'oeuf de *Bombyx mori* hybride 200x300, après élimination de la diapause (du stade B à l'éclosion).

Extraction à l'acide perchlorique 1N et dosage RIA (Marseille). Les taux sont exprimés en pmol équivalent ecdystérone.

Nous soulignerons que cette extraction peut modifier les quantités d'ecdystéroïdes dosés dans l'oeuf (pH acide, précipitation des protéines plus importantes que lors d'une extraction au méthanol 60 %).

Figure 3. Evolution of the ecdysteroid level in the egg of *Bombyx mori* 200x300 hybrid, after diapause elimination (from stage B to hatching).

Extraction by 1N perchloric acid and titration by RIA (Marseille). The rates are expressed in ecdysterone equivalent (pmol).

It is to be noted that this extraction may modify the quantity of ecdysteroids titrated in the egg (acid pH, protein precipitation more important than for a 60% methanol extraction).

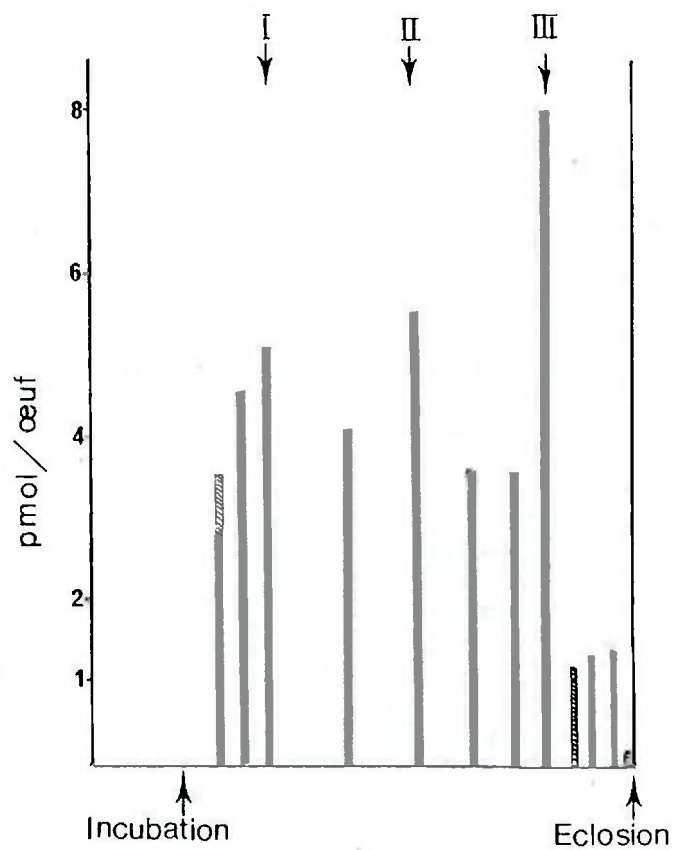


FIGURE 3

**Figure 4. Evolution du taux d'ecdystéroïdes de l'oeuf ou de l'embryon
de *Bombyx* C108, génération ND (bivoltin).**

Extraction méthanol 60 % de l'oeuf entier ; de l'embryon après dissection. Dosage RIA global. Taux exprimés en pmol équivalent 20-Ohecdysone.

**Figure 4. Evolution of the ecdysteroid level in the egg or in the embryo
of C108 *Bombyx*, ND generation (bivoltine).**

60% methanol extraction of the total egg; of the embryo after dissection. Total RIA. Rates expressed in 20-Ohecdysone equivalent pmol.

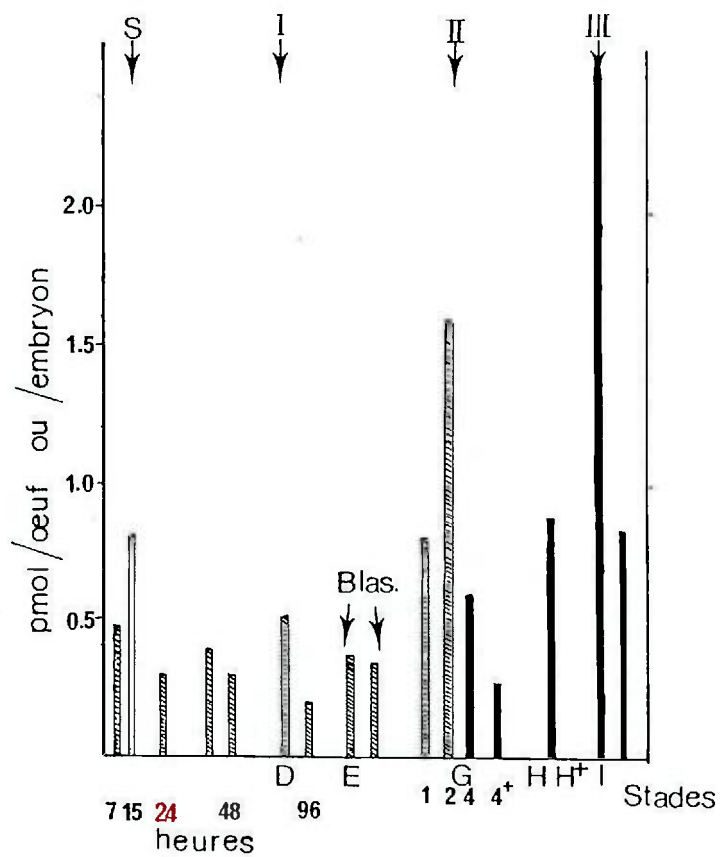


FIGURE 4

Figure 5. Evolution du taux d'ecdystéroïdes de l'embryon de *Bombyx mori* hybride 200x300 monovoltin durant l'embryogenèse post-diapause.

Extraction méthanol 60 % après dissection de l'embryon et définition du stade de développement. Dosage RIA. Taux exprimés en pmol équivalent 20-Ohecdysone.

- E : stade du début de la blastocinèse ; F : fin de la blastocinèse ;
 G₁ : embryon ne présentant ni soie ni stemmate ; G₂ : soies et stemmates présents ;
 G₄ : trachées visibles avec un début de chitinisisation ;
 H : stade fugace, mandibules chitinisées, vitellus désagréé ;
 H⁺ : capsule céphalique, stomodeum avec vitellus ;
 I : début du dépôt de la première cuticule larvaire.

Figure 5. Evolution of the ecdysteroid level in the embryo of monovoltine 200x300 hybrid of *Bombyx mori* during the post diapause embryogenesis.

60% methanol extraction after the embryo dissection and definition of the development stage. RIA: expressed in 20-Ohecdysone equivalent pmol.

- E: beginning of blastokinesis; F: end of blastokinesis;
 G₁: embryo presenting neither hair no stemmate; G₂: hairs and stemmates present;
 G₄: visible trachea with a chitinisisation start;
 H: transitory stage, chitinized mandibles, desagregated vitellus;
 H⁺: cephalic capsule, stomodeum with vitellus;
 I: appearance of the deposit of the first larval cuticle.

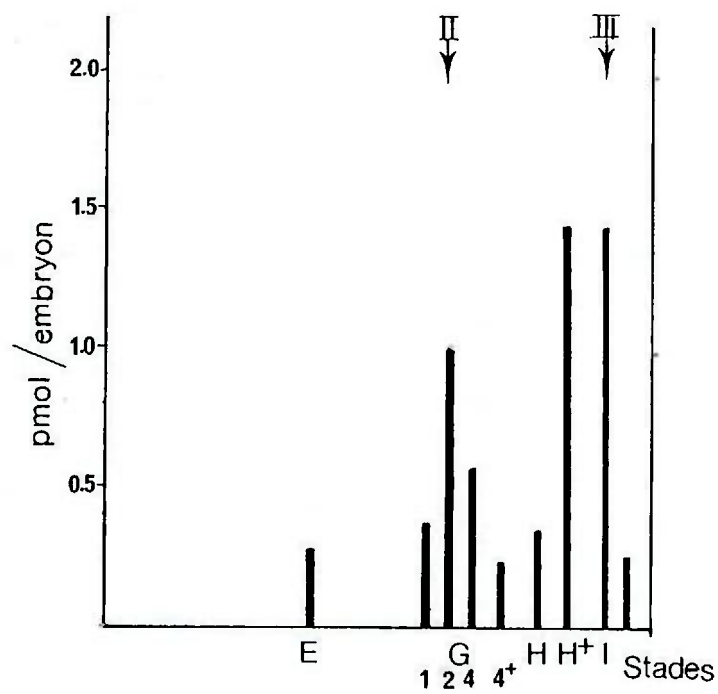


FIGURE 5

REFERENCES

- D. W. BEAN, BECK S. D., J. Insect. Physiol., 1983, 29, p. 687.
- D. BULLIERE, F. BULLIERE, M. DE REGGI, Roux's Arch. Dev. Biol., 1979, 186, p. 103.
- J. CLARET, P. PORCHERON, F. DRAY, C. R. Acad. Sci. Paris, 1978, 286, p. 639.
- M. COULON, Bull. Soc. Zool., 1967, 92, p. 757.
- M. COULON, M. LAMY, J.M. LEGAY, N. JULIEN-LAFERRIERE, Bull. Soc. Zool., 1980, 105, p. 445.
- M. COULON, C. DOREL, 2ème Colloque International Hormones d'Invertébrés, Strasbourg, 1983.
- M. COULON, (1984), soumis pour publication/submitted for publication.
- L. N. DINAN, H. H. REES, J. Insect Physiol., 1981, 27, p. 51.
- A. R. GANDE, E. D. MORGAN, J. Insect Physiol., 1979, 25, p. 289.
- M. HIRN, M. COULON, M. DE REGGI, C. R. Acad. Fr., 1977, 284, p. 2147.
- T. H. HSIAO, C. HSIAO, J. Insect Physiol., 1979, 25, p. 45.
- N. IKEKAWA, I. IKEDA, T. MIZUMO, E. OHNISHI, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1980, 448.
- H. IMBODEN, B. LANZREIN, J. P. DELBECQUE, M. LUSCHER, Gen. Comp. Endocr., 1978, 36, p. 628.
- J. N. KAPLANIS, W. E. ROBBINS, M. J. THOMPSON, S. R., DUTKY, Science, 1973, 180, p. 307.
- M. LAGUEUX, M. HIRN, J. A. HOFFMANN, J. Insect Physiol., 1977, 23, p. 109.
- M. LAGUEUX, C. HETRU, F. GOLTZENE, C. KAPPLER, J. A. HOFFMANN, J. Insect Physiol., 1979, 25, p. 709.
- M. LAGUEUX, C. SALL, J. A. HOFFMANN, Amer Zool., 1981, 21, p. 715.
- M. LAGUEUX, P. HARRY, J. A. HOFFMANN, Mol. Cell. Endocr., 1981, 24, p. 325.
- J. M. LEGAY, B. CALVEZ, M. HIRN, M. DE REGGI, Nature, 1976, 262, p. 489.
- T. MIZUMO, E. OHNISHI, Dev. Growth Dif., 1975, 17, p. 219.
- E. OHNISHI, T. MIZUMO, N. IKEKAWA, S. SAKURAI, Science, 1977, 197, p. 66.
- E. OHNISHI, T. MIZUMO, N. IKEKAWA, T. IKEDA, Insect Biochem., 1981, 11, p. 155.
- M. DE REGGI, M. HIRN, M. DELAAGE, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975, 66, p. 1307.
- C. SALL, G. TSOUPRAS, C. KAPPLER, M. LAGUEUX, D. ZACHARY, B. LUU, J. A. HOFFMANN, J. Insect. Physiol., 1983, 29, p. 491.

* * *

EVOLUTION OF THE ECDYSTEROID RATES OF THE BOMBYX MORI
EGG AND EMBRYO ACCORDING TO THE TYPE OF DIAPAUSING
OR NON DIAPAUSING EGG

Madeleine COULON

Département de Biologie Générale et Appliquée,
Laboratoire de Biologie des Populations (LA CNRS 243),
Université Claude Bernard Lyon 1,
43, boulevard du 11 Novembre 1918,
69622 VILLEURBANNE,
France.

The diapause, a particular period of the development allowing the organism to synchronise its activities to the environment conditions may happen at different stages of the insect development programme. *Bombyx mori* appears to be a good model for the study of the diapause stage; this insect shows an early embryonic diapause at the gastrula stage, according to the different races (monovoltine, bivoltine, multivoltine). During the development of bivoltine strains, the environment conditions (photoperiod, temperature) do not interfere directly on the diapausing stage, but on the preceding generation embryo. During pupal development, the oocyte determinism towards the diapausing stage is linked with the effect of a diapause hormone (DH), (see review: M. COULON submitted for publication).

The egg defined as diapausing shows some characteristics, particularly of the carbohydrate metabolism (works of HASEGAWA, YAMASHITA et al.). The hormonal features of the diapausing egg is of interest to us. Many works have indeed pointed out the importance of the steroidian hormone group in the insect egg (MIZUMO et al. 1975, KAPLANIS et al. 1973, LAGUEUX et al. 1977, HIRN et al. 1977, IMBODEN et al. 1978, HSIAO et al. 1979, BULLIERE et al. 1979, LOUVET et al. 1979, GANDE et al. 1979, DINAN et al. 1980...). These ecdysteroids would be liable to play a leading part during the embryogenesis (LAGUEUX et al. 1979, 1980, 1981, 1982, 1983). The ecdysteroids of a maternal origin play an important part up to blastokinesis (SALL et al. 1983). The ecdysteroids of the *Bombyx mori* eggs are synthesized and accumulate in the ovaries during the pupal development (LEGAY et al. 1976, OHNISHI et al. 1977, COULON et al. 1980). Until now, five types of ecdysteroid molecules have been identified in this insect, in the oocyte or in the egg, at laying time: ecdysone, 2-deoxyecdysone, 2-deoxy-20-OH-ecdysone, 20-OH-ecdysone, 2-22-bideoxyecdysone, these ecdysteroids being present in a free or conjugated form (IKEKAWA et al. 1980, OHNISHI 1981). Can a quantitative or qualitative difference between the eggs determined during the pupal development as diapausing (D) or non-diapausing (ND) be observed? Does the

post-diapause embryogenesis differ, with regard to the ecdysteroids, from the continuous development stages?

MATERIAL AND TECHNIQUES

The eggs from three *Bombyx mori* races are being used:

A C108 bivoltine race, studied during the diapausing generation (D), and the non-diapausing generation (ND) from the oviposition to the hatching. The embryogenesis takes place as follows:

1st generation: 18-19°C, obscurity. The females from these embryos will lay ND eggs.

2nd generation: 25°C, long photoperiod. The females from these embryos will lay D eggs.

Two European monovoltine races, 141 and 200x300 hybrid. The incubation takes place at 22°C.

The pigmentation evolution of the D eggs was used as a synchronization criterion of the development during embryogenesis and diapause initiation. The ND eggs were synchronized during laying, the females being moved then every two hours; the samples were taken off according to the development time after laying. The 200x300 hybrid embryos were dissected under lenses during the post-diapause embryogenesis from the E stage to hatching (COULON 1967); the C108 embryos were isolated from the G stage to the hatching. When microdissections were being carried out, any trace of vitellus was carefully left aside (except for the vitellus contained in the mesenteron).

The samples were homogenized in 60% methanol in order to extract the ecdysteroids, then heated at 56°C. After a 8000g centrifugation, the supernatant was taken off, the pellet washed three times with ethanol. After evaporation under a nitrogen flow, steroids were taken up again in a citrate buffer (0.1M, pH 6.2) and titrated by radioimmunoassay (RIA), according to DE REGGI et al. method (1975). The antibodies and antigens ¹²⁵I have been provided by HIRN (Immunology Laboratory CNRS-INSERM, Marseille). The samples taken off as mentioned above can be submitted to a HPLC liquid chromatography, the fractions being titrated by RIA.

RESULTS

The values given are expressed in ecdysterone equivalent (pmol) and represent an average of 2 to 5 totally independent extractions. The samples include 10 embryos per stage or 10-50 or 100 eggs per stage.

Fig. 1 shows the development for two types of races.

I. EVOLUTION OF THE TOTAL RATE OF ECDYSTEROIDS DURING EMBRYOGENESIS

1.1. Evolution between laying and gastrula (stage A).

The ND eggs reach this stage 24 hours after laying at 25°C, this stage will be reached only after three days at 22°C for the 200x300 eggs (Fig. 1).

A peak of ecdysteroids (S) can be observed before the serosal cuticle secretion and the beginning of the serous pigmentation (D) (Y stage: yellow eggs, pigmentation appears at the P stage: pinky eggs). These data are represented in Fig. 2.

1.2. Evolution between gastrula and hatching.

This evolution has been observed either in the egg or in the isolated embryo.

Evolution in the egg: regarding the 200x300 hybrid, our first assays showed three ecdysteroid peaks during this phase of the embryogenesis (HIRN et al. 1976). These data concerning the post-diapause embryogenesis are represented in Fig. 3. These three peaks can also be observed during the continuous development of the (ND) generation of C108 (Fig. 4).

Peak 1 takes place before blastokinesis and is relatively unimportant. Peak 2 comes after blastokinesis and the differentiation of the prothoracic gland, this peak being superior to the preceding one. Peak 3 takes place before the embryonic moult and before the larval cuticle deposit, it follows the vitellus ingestion by the pre-larvae.

Evolution in the embryo: peak 2 which follows the blastokinesis and the dorsal closing of the embryo is pointed out, part of the vitellus being already present in the mesenteron, an embryonic cuticle with hairs is being secreted (Fig. 5). Peak 3 can be observed at the end of the embryogenesis, before the first larval cuticle is being secreted, and when no mark of "free" vitellus is left in the egg.

It is noted that the quantity of ecdysteroids of the embryo at the G_4 stage is the same whether the embryogenesis is continuous or interrupted by a diapause: 300pg/embryo for (ND) and 290pg/embryo for (D).

II. EVOLUTION OF THE TOTAL RATE OF ECDYSTEROIDS IN CONNECTION WITH THE INITIATION OF THE DIAPAUSE, AND THE DIAPAUSE

It can be noted on Fig. 2 that a much higher quantity of ecdysteroids is always present in the egg defined as diapausing when peak S appears (preceding the serosal cuticle deposit):

ND: 2pmol-mg⁻¹ of an egg

D: 12pmol-mg⁻¹ of an egg race C108

A study of two strictly monovoltine strains (after RIA: figure 2A, or HPLC followed by a RIA on each of the fractions: figure 2B) revealed:

a very important S peak

a second peak which would be related to the beginning of the diapause at the Gr + 1 day stage (grey pigmentation of the serosa).

The quantity of ecdysteroids then decreased during the diapause to reach 1pmol mg⁻¹ of an egg (data not shown). The preliminary results would show a qualitative difference in the ecdysteroid composition.

CONCLUSION - DISCUSSION

Regarding *Bombyx mori*, four characteristic peaks of the embryogenesis found in *Locusta* (LAGUEUX et al.) have also been observed. The first peak (S) takes place before the serosal cuticle setting. The three others take place during the morphogenesis. Two of them at least (peak 2 and peak 3) can be observed in the isolated

embryo. However, if these peaks take place before the cuticle elaboration (embryonic and first larval cuticle) they follow the incorporation of a part of, or of the whole vitellus in the embryo. If, as it can be observed in *Locusta* (LAGUEUX et al. 1982), the ecdysteroids in a conjugated form are bound to the vitellogenin, the increase in the ecdysteroid levels could be related to these facts.

Finally, we will stress two points:

- the presence of a much higher quantity of ecdysteroids in the diapausing egg when peak S takes place;
- an ecdysteroid peak can be observed at the grey stage + 1 day (Gr.), that is to say at the coming into diapause.

A small peak of 20-OH-ecdysone can be observed in *Pimpla instigator* (CIARET et al. 1978) and in *Ostrinia* (BEAN et al. 1983) (at larval diapause) when coming into diapause. As a conclusion, a much higher quantity of ecdysteroids can be observed in the egg defined as diapausing, which would be connected to diapause.

The OHNISHI et al. researches (1975-1977) tend to point out that a majority of ecdysteroids are to be found in a conjugated form. Our own analyses (TLC, HPLC and RIA, after hydrolysis of high polarity products) confirm these studies. We know that the antibody used for our RIA shows a very different linkage coefficient according to the type of titrated conjugate, the affinity being always much lower than the one observed for the free hormones molecules. So the quantities of ecdysteroids are always underestimated. In other respects, the total of the conjugated ecdysteroid molecules represents:

- on the one hand, maternal ecdysteroids which can be considered as "stock" molecules originally from a free active hormone, at least at the beginning of embryogenesis;

- on the other hand, degradation products during embryogenesis.

Our hypothesis is then as follows:

A high proportion of ecdysteroid molecules of a maternal origin in storage conjugate form is present in the diapausing egg. At the end of the diapause development, these conjugates release free ecdysteroid molecules (in an active form at least) allowing the embryogenesis to start again, which is confirmed by the following observations:

- 1) increase in the ecdysteroid rate at the end of the diapause development at 5°C (BIRN and COULON 1977),

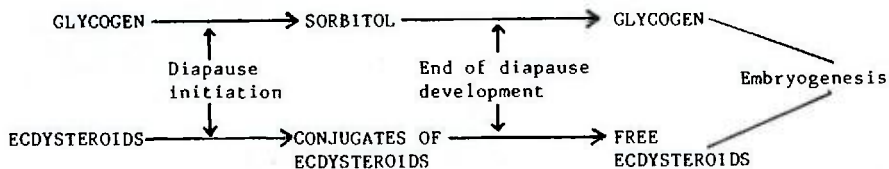
- 2) renewal of the embryogenesis after ecdysone or 20-OH-ecdysone treatment (GHARIB et al. 1980): a proteosynthesis of an embryonic type is being observed (COULON and DOREL 1983),

- 3) increase in the rate of free hormone and renewal of the embryogenesis after HCl treatment (COULON and DOREL 1983, submitted for publication).

It must be reminded that another molecule (glycogen) is found in a much larger quantity in the diapausing defined oocyte (+ 35% in the D oocyte compared to ND):

this glycogen giving a reserve molecule (the sorbitol) at the diapause initiation. Glycogen, a mobilizable molecule for the embryogenesis is released at the end of the diapause development, the whole of these processes being carried out at 5°C. It can be noted that a HCl treatment involves the same modifications of the carbohydrate molecule metabolism (works by HASEGAWA et al. and by YAMASHITA et al.).

Hence the following diagram:



UTILISATION DE LA SOIE TISSEE COMME SUPPORT INSOLUBLE D'ENZYMES

GRASSET L., CORDIER D., VILLE A.

Institut Universitaire de Technologie Lyon 1
Biochimie Appliquée
43 boulevard du 11 Novembre 1918
69621 VILLEURBANNE
France

INTRODUCTION

L'intérêt d'immobiliser une enzyme dans - ou sur - une phase insoluble peut être examiné du point de vue théorique et pratique.

Dans le domaine théorique, une enzyme immobilisée se trouve dans une situation beaucoup plus proche des enzymes "in vivo", la plupart de celles-ci travaillant à l'état lié, que des enzymes travaillant en solution. On pourra donc étudier le comportement enzymatique d'un tel système, soumis aux effets du microenvironnement et simuler des situations existant "in vivo".

Dans le domaine pratique, les enzymes immobilisées permettent un contrôle plus strict des réactions enzymatiques grâce à la possibilité de réguler le temps d'action enzymatique par simple immersion et retrait à volonté du support-enzyme du mélange réactionnel. L'utilisation répétée de la même enzyme est également rendue possible par son immobilisation, ainsi que son emploi en continu dans des réacteurs par exemple.

Choix de la soie tissée comme support :

Les différentes propriétés de la soie tissée qui nous ont conduit à l'utiliser ont été décrites dans une publication antérieure (1). Nous rappellerons succinctement celles-ci. Tout d'abord, la soie décreusée que nous employons est constituée essentiellement d'une seule protéine : la fibroïne, insoluble et facilement disponible. De plus, sa présentation sous forme tissée, permet une manipulation aisée. Parmi ses propriétés physiques spécifiques, rappelons ses bonnes qualités mécaniques, (résistance à la traction et à l'abrasion), sa bonne stabilité thermique ainsi qu'une bonne

résistance aux agents microbiens. Quant à quelques unes de ses propriétés chimiques intéressantes, notons une bonne résistance vis à vis des agents chimiques, ce qui accroît la possibilité d'emploi de réactifs chimiques différents pour son activation. La nature protéique de la fibroïne lui confère une multiplicité de groupements activables. (cf. sa composition dans le tableau 1). L'origine et les caractéristiques techniques de la soie employée ont été décrites antérieurement (1).

Tableau 1. Composition de la fibroïne du cocon de *Bombyx mori* exprimée en moles / 100 moles. (2)

Alanine	29.1
Arginine	0.4
Acide aspartique	1.0
Acide glutamique	0.6
Glycine	46.2
Histidine	0.16
Isoleucine	0.8
Leucine	0.7
Lysine	0.25
Méthionine	0.08
Phénylalanine	0.58
Proline	0.34
Sérine	11.7
Thréonine	0.75
Tryptophane	0.08
Tyrosine	6.3
Valine	2.1

RESULTATS ET DISCUSSION

a) Méthodes d'immobilisation

Elles se résument jusqu'à présent à une méthode d'immobilisation par adsorption et à trois méthodes d'immobilisation par liaison covalente, aux azotures (azide), aux diazoïques et au glutaraldéhyde. (Figure 1). Ces méthodes ont déjà été décrites antérieurement :

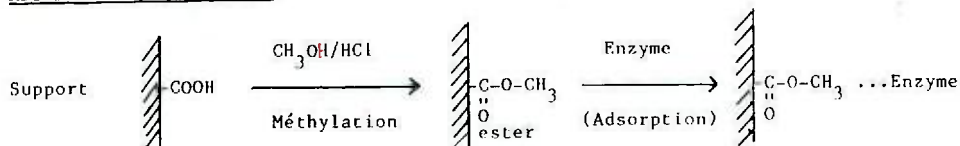
- Immobilisation par adsorption, (3), (4).
- Immobilisation aux diazoïques, (5).
- Immobilisation aux azides, (4).
- Immobilisation au glutaraldéhyde, (6).

Toutes les étapes d'activation de la soie tissée ainsi que les étapes d'immobilisation concernant chaque méthode ont été résumées dans la figure 1.

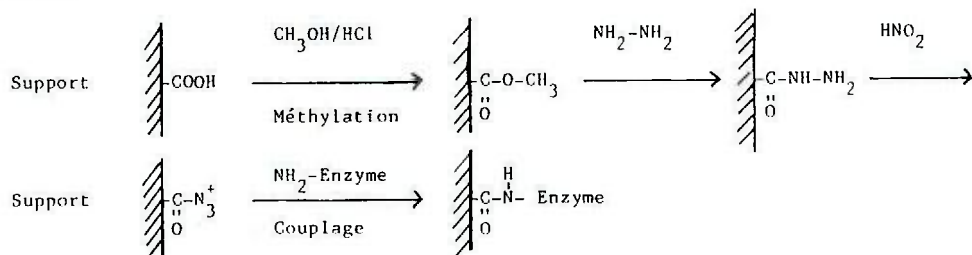
b) Enzymes immobilisées

Jusqu'à présent, nous avons immobilisé l'Aspartate aminotransférase (AAT) (EC 2.6.1.1) de coeur de porc provenant de SIGMA Chemical Co, la Ribonucléase (pancréatique) (EC 3.1.27.5) de pancréas de bovin provenant de Boehringer Mannheim et la Phosphatase alcaline d'intestin de bovin (EC 3.1.3.1) fournie par SIGMA Chemical Co. (Cf tableau 2).

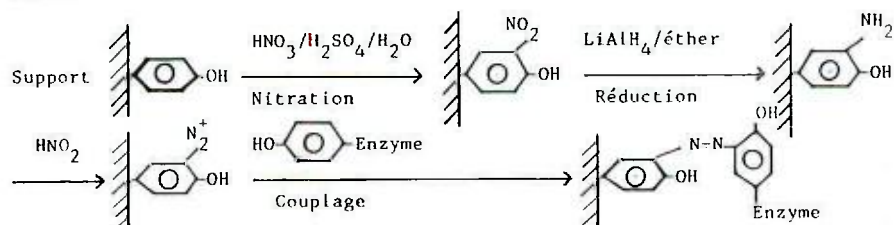
ADSORPTION (METHYLATION)



AZIDE



DIAZOIQUE



GLUTARALDEHYDE

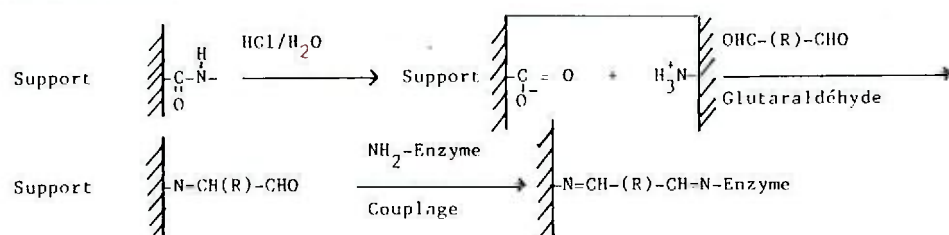


Figure 1. Schéma des différentes méthodes d'immobilisation d'enzymes sur la soie tissée.

Tableau 2. Récapitulation des différentes enzymes immobilisées ainsi que les méthodes utilisées sur la soie tissée.

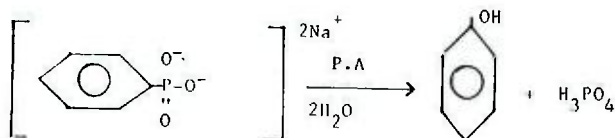
Enzyme	Méthode			
	Adsorption	Azide	Diazoïque	Glutaraldéhyde
Aspartate amino-transférase	+	+	+	
Ribonucléase			+	
Phosphatase alcaline	+	+	+	+

c) Méthodes de mesure d'activité des enzymes immobilisées

- Aspartate aminotransférase : son activité est déterminée par la mesure à 257 nm de la disparition de l'oxaloacétate lors de la réaction suivante : L glutamate + oxaloacétate $\longrightarrow$ α -cétooglutarate + L aspartate (7).

- Ribonucléase : son activité est déterminée par l'hydrolyse de la cytidine 2'3' phosphate cyclique en cytidine 3' phosphate (8), suivie par la mesure en continu de l'augmentation de la densité optique à 285 nm.

- Phosphatase alcaline : son activité est déterminée par l'hydrolyse du phénylphosphate



ce qui permet de suivre spectrophotométriquement l'apparition du phénol à 287 nm (9).

Dans tous les cas, nous avons travaillé en vitesse initiale avec une agitation régulière du mélange réactionnel thermostaté et relié à une cuve à circulation placée à l'intérieur du spectrophomètre. La réaction était déclenchée par l'addition au temps zéro, soit de l'enzyme libre, soit du carré porteur d'activité fixée.

Toutes les méthodes d'immobilisation se réalisent sur des carrés de soie tissée de 2cm de côté; la surface activable est de 10,7 cm² compte tenu du diamètre moyen et de la longueur du fil tissé que nous employons.

I. LES CONSEQUENCES DE L'IMMOBILISATION

Le fait d'immobiliser une enzyme transforme la cinétique homogène de l'enzyme libre en cinétique hétérogène. Nous rappellerons brièvement les effets de cette immobilisation.

L'immobilisation n'est pas identique pour toutes les molécules d'enzyme et modifiera éventuellement l'accessibilité du site actif par le substrat.

L'intervention de charges éventuelles du support dépendantes de sa nature chimique peut créer des interactions électrostatiques entre le support et les ions

présents dans le milieu.

Apparition de phénomènes diffusionnels : il y a en effet un transfert de substrat du milieu réactionnel au support et inversement un transfert du ou des produits de réaction du support au milieu réactionnel. De ce fait, il s'établit des gradients de concentration en substrat et en produit au voisinage de l'enzyme immobilisée, créant des limitations diffusionnelles dont il faudra tenir compte lors de l'estimation des caractéristiques de l'enzyme immobilisée, (10), (11).

1. La structure de la soie

La méthylation acide réalisée pour une adsorption simple ou pour la méthode des azides a tendance, si elle est trop prolongée, à fragiliser le carré de soie. Aussi est-il nécessaire d'établir un compromis entre une durée de méthylation qui conserve le mieux possible les qualités de la soie et qui soit cependant suffisante pour obtenir un bon rendement de fixation. Avec la méthode au glutaraldéhyde et surtout avec celle des diazoïques les qualités de la soie sont bien conservées.

2. Le pH optimum de l'enzyme immobilisée

On ne constate pas de différence entre l'optimum du pH de l'Aspartate amino transférase libre et celui apparent de celle immobilisée par les diazoïques, et seulement 0.05 à 0.1 unité de variation de pH pour la Ribonucléase immobilisée par cette technique. Quant à la phosphatase alcaline immobilisée par cette même technique son pH optimum apparent reste inchangé comme avec l'adsorption et varie d'environ 0.2 unités de pH lorsqu'elle est immobilisée avec le glutaraldéhyde ou par les azides par rapport au pH optimum de l'enzyme libre (6). Il est à noter que dans le cas de la phosphatase alcaline, il y a libération de protons lors de l'hydrolyse du phénylphosphate (cf mesure d'activité enzymatique de celle-ci). Plus l'activité enzymatique retenue sur le carré de soie sera importante, plus le gradient local de protons créé par les phénomènes de diffusion sera important.

3. Caractéristiques cinétiques de l'enzyme immobilisée

En règle générale, la constante K_m apparente augmente lorsque l'enzyme est immobilisée, quelle que soit la méthode utilisée. Les contraintes diffusionnelles sont d'autant plus élevées que la quantité d'enzyme immobilisée active est élevée, et que la concentration en substrat est faible. Nous avons montré que l'augmentation du K_m apparent devait être attribuée à la quantité d'enzyme immobilisée active plutôt qu'à une éventuelle modification chimique due au couplage (6). Des travaux actuellement en cours avec la phosphatase alcaline, tendent à mettre en évidence une relation linéaire entre la quantité d'enzyme immobilisée active et la valeur du K_m apparent, quelle que soit la méthode utilisée.

II QUANTITE D'ENZYME IMMOBILISEE

Une estimation des quantités a été faite dans tous les cas (cf. tableau 3). Certaines valeurs (*) résultent de la comparaison entre l'activité d'un carré de soie et l'activité d'une quantité connue d'enzyme libre. Par cette méthode, il est probable que l'estimation de la quantité immobilisée soit inférieure à la réalité car il n'est pas tenu compte des contraintes diffusionnelles et de l'inhibition par le produit de la réaction enzymatique quand celui-ci est inhibiteur de la réaction. Une méthode rendant mieux compte de la quantité immobilisée sur un carré de soie est de déterminer, quand cela est possible, la vitesse maximale (V_m) d'une quantité connue d'enzyme libre et de déterminer de la même façon la V_m de l'enzyme immobilisée active sur un carré (12). On élimine ainsi les effets de l'ion phosphate qui est un inhi-

biteur compétitif (13), et on peut considérer comme négligeables les contraintes diffusionnelles.

Enzyme	Méthode			
	Adsorption	Azide	Diazoïque	Glutaraldéhyde
Aspartate amino-transférase	(*) 0.33	(*) 0.20	0.77	-
Ribonucléase	-	-	20 (*)	-
Phosphatase alcaline	2.48	36.44	0.38	4.36

Tableau 3. Quantités d'enzyme immobilisées (exprimées en μg d'enzyme par carré de soie tissée de dimension $(2 \times 2 \text{ cm})$. Dans tous les cas la concentration de la solution enzymatique de greffage était de 0.5 mg par cm^2 , sauf pour l'AAT immobilisée par adsorption ou par les azides (20 g par cm^2).

III. PREVISION ET GENERALISATION DE L'EMPLOI DE LA SOIE TISSEE COMME SUPPORT POUR D'AUTRES PROTEINES

Il est difficile d'appréhender les résultats que nous donnera telle méthode d'immobilisation avec telle enzyme. On le voit en examinant le tableau 3 dans lequel, avec la méthode aux diazoïques, il est immobilisé $0.77 \mu\text{g}$ d'Aspartate aminotransférase, $20 \mu\text{g}$ de Ribonucléase et $0.38 \mu\text{g}$ de phosphatase alcaline. On constate également que pour une même enzyme (Phosphatase alcaline), les quantités immobilisées actives ne sont pas constantes et varient en fonction des méthodes utilisées. Cela peut provenir de la nature des acides aminés impliqués dans la liaison entre l'enzyme et le support qui peut varier d'une méthode à l'autre. Le nombre de liaisons avec le support joue aussi certainement un rôle dans la quantité de protéine immobilisée.

La recherche des conditions optimum de l'activation et de l'immobilisation sur le support se fait généralement avec la même enzyme mais les résultats obtenus ne sont que rarement intégralement identiques avec une autre enzyme. C'est pourquoi, bien que les méthodes d'immobilisation apparaissent généralisables à un grand nombre d'enzymes, seule la comparaison des résultats obtenus permettra de retenir de façon préférentielle la méthode adaptée au cas étudié.

Bien que jusqu'à présent, il ne semble pas exister de support type, il s'avère que la soie tissée est un support intéressant en raison de sa structure chimique qui offre un large choix de méthodes d'immobilisation. L'adaptation de la technique devra se faire en fonction de la nature chimique de la molécule devant être immobilisée. Dans le cas d'une enzyme il faudra éviter une immobilisation susceptible de modifier le site actif.

L'utilisation de la soie tissée comme support semble valable pour l'immobilisation d'un grand nombre de molécules biologiques tant pour une étude de type fondamental que pour une utilisation appliquée sous forme de filtres, ou par exemple de réacteurs à multicouches enzymatiques. La faible compaction de la soie rend possible de tels systèmes par l'empilement de filtres de soie sans risque de colmatage tout en disposant d'une surface disponible importante sous un faible volume.

REFERENCES

1. GRASSET L., CORDIER D., VILLE A., *Process Biochem.*, 1979, 14(8), p. 2.
2. KIRIMURA J., *Bull. Seric. Exp. Station*, 1962, 17, p. 515.
3. CORDIER D., Thèse de doctorat de spécialité (Biochimie), 1976, LYON.
4. GRASSET L., CORDIER D., VILLE A., *Biotechnol. Bioeng.*, 1977, 19, p. 611.
5. CORDIER D., COUTURIER R., GRASSET L., VILLE A., *Enzyme Microb.*, 1982, 4, Juillet, p. 249.
6. GRASSET L., CORDIER D., VILLE A., *Biotechnol. Bioeng.*, 1983, 25, p. 1423.
7. COULET P.R., JULLIARD J.H., GAUTHERON D.C., *Biotechnol. Bioeng.*, 1974, 16, p. 1055.
8. CROOK E.M., MATHIAS A.P., RABIN B.R., *Biochem. J.*, 1959, 74, p. 234.
9. MORTON R.K., *Biochemical J.*, 1955, 61, p. 232.
10. MONSAN P., Cinétique enzymatique hétérogène dans les enzymes p. 309. DURAND G. et MONSAN P., Ed. Gauthier-Villars, Bordas, 1982.
11. GOLDSTEIN L., Kinetic behaviour of immobilized enzyme systems. *Methods enzymology* 1976, 44, p. 397, Acad. Press, New-York.
12. GOLDSTEIN L., LEVY M., SHEMER L., *Biotechnol. Bioeng.*, 1983, 25, p. 1485.
13. LAZDUNSKI M., OUELLET I., *Canadian J. of Biochemistry and Physiology*, 1962, 40, p. 1619.

UTILIZATION OF WOVEN SILK AS INSOLUBLE SUPPORT OF ENZYMES

GRASSET L., CORDIER D., VILLE A.

Institut Universitaire de Technologie Lyon 1
Biochimie Appliquée
43 boulevard du 11 Novembre 1918
69621 VILLEURBANNE
France.

INTRODUCTION

The interest of immobilizing an enzyme in - or on - an insoluble phase can be studied from a theoretical and practical point of view.

In theory, an immobilized enzyme is much closer to the enzymes "in vivo", most of these working bound, than to the enzymes working in solution. So, we can study the enzymatic behaviour of such a system when submitted to the microenvironment effects and simulate situations existing "in vivo".

In practice, the immobilized enzymes allow a more severe control of the enzymatic reactions thanks to the possibility of regulating the enzymatic action time by simple immersion and withdrawal at will of the enzyme-support from the reactional mixture. The repeated use of the same enzyme, as well as its use in continuous in reactors for example, is also made possible by its immobilization.

Choice of woven silk as support :

The different properties of the woven silk which have led us to use it, have been described in a previous issue (1). We will make a brief summary of them. In the first place, the degummed silk is essentially composed of a single protein : the fibroin, insoluble and easily available. Furthermore, its woven presentation allows an easier manipulation. Among its specific physical characteristics, its good mechanical qualities (tensile and stress strength), its good thermal stability as well as a good resistance to microbial agents must be reminded. As to some of its interesting chemical characteristics, let us point out a good resistance to chemical agents, which increases the possibility of using different chemicals for its activation. The proteic nature of the fibroin bestows it a multiplicity of activable groups (cf. its composition in table 1). The origin and technical characteristics of the silk used have been previously described (1).

Table 1. Composition of the *Bombyx mori* cocoon fibroin, expressed in moles / 100 moles. (2)

Alanine	29.1
Arginine	0.4
Aspartic acid	1.0
Glutamic acid	0.6
Glycine	46.2
Histidine	0.16
Isoleucine	0.8
Leucine	0.7
Lysine	0.25
Methionine	0.08
Phenylalanine	0.58
Proline	0.34
Serine	11.7
Threonine	0.75
Tryptophane	0.08
Tyrosine	6.3
Valine	2.1

RESULTS AND DISCUSSION

a) Immobilization methods

Until now, they are limited to an adsorption immobilization method and to three covalent linkage immobilization methods, azide, diazoic and glutaraldehyd methods (Figure 1). These methods have been previously described :

- Immobilization by adsorption, (3), (4).
- Immobilization by diazoic, (5).
- Immobilization by azide, (4).
- Immobilization by glutaraldehyd, (6).

All the activation stages of the woven silk, along with the immobilization stages concerning each method are summed up in figure 1.

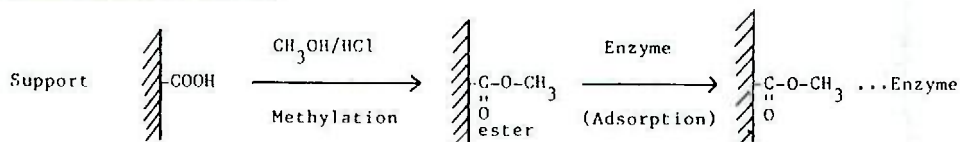
b) Immobilized enzymes

Until now, the Aspartate aminotransferase (AAT) (EC 2.6.1.1.) from pig heart supplied by SIGMA Chemical Co, the Ribonuclease (pancreatic) (EC 3.1.27.5) from bovine pancreas supplied by Boehringer Mannheim and the alkaline phosphatase from bovine gut (EC 3.1.3.1) supplied by SIGMA Chemical Co, have been immobilized (Cf. table 2).

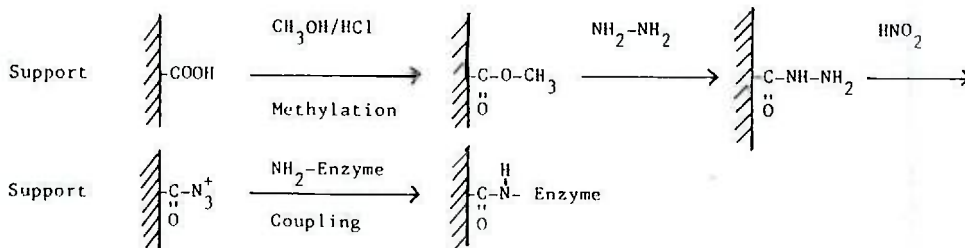
c) Methods for the activity measurement of the immobilized enzymes

Aspartate aminotransferase : its activity is determined by the measurement at 257 nm of the disappearance of the oxaloacetate in the following reaction : L glutamate + oxaloacetate $\longrightarrow$ α -cetoglutarate + L aspartate (7).

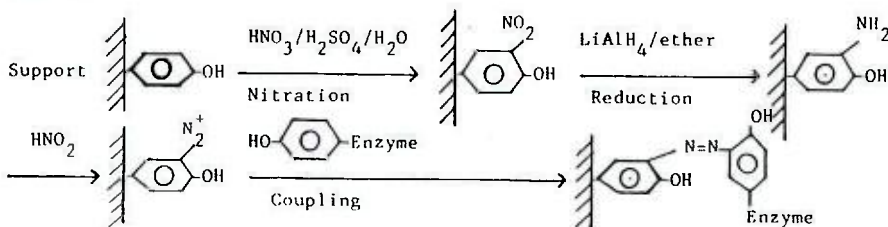
ADSORPTION (METHYLATION)



AZIDE



DIAZOIQUE



GLUTARALDEHYDE

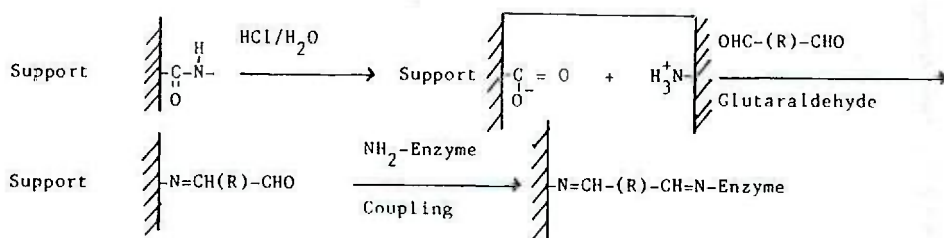


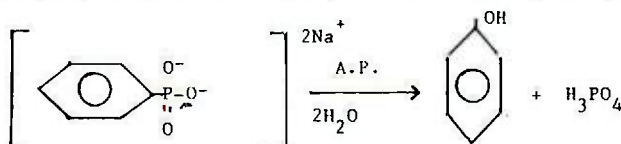
Figure 1. Schematic pathways for enzyme immobilization on woven silk.

Table 2. Summarize of the different immobilized enzymes along with the methods used on woven silk.

Enzyme	Method	Adsorption	Azide	Diazoic	Glutaraldehyd
Aspartate amino-transferase		+	+	+	
Ribonuclease				+	
Alkaline phosphatase		+	+	+	+

- Ribonuclease : its activity is determined by the hydrolysis of the 2'3' cyclic cytidine into cytidine 3' phosphate (8) followed by the continuous measurement of the optical absorption at 285 nm.

- Alkaline phosphatase : its activity is determined by the phenylphosphate hydrolysis



which enables to study spectrophotometrically the appearance of phenol at 287 nm (9).

The measurements have always been made at initial speed, with a regular shaking of the reactional mixture under temperature control with a circulation cell placed in the spectrophotometer. The reaction was started with the addition at zero time of either the free enzyme or the fixed one.

All the immobilization methods are carried out on 2 x 2 cm of woven silk; the activable surface is 10,7 cm² considering the average diameter and the length of woven thread used.

1. THE IMMOBILIZATION CONSEQUENCES

The immobilization transforms the homogeneous kinetic of a free enzyme into heterogeneous kinetic. We shall briefly remind the effects of this immobilization.

Immobilization is not identical for all the enzyme molecules and is liable to modify the accessibility of the active site.

The intervention of possible loads of the support depending on its chemical nature may lead to electrostatic interactions between the support and the ions present in the medium.

Appearance of diffusional phenomena : it actually occurs a substrate transfer from the reactive medium to the support, and reciprocally a transfer of the support

reaction products to the reactive medium. Thereby, concentration gradients of the substrate and of the product appear near the immobilized enzyme, creating thus diffusional limitations which will have to be accounted for when rating the immobilized enzyme characteristics (10), (11).

1. Silk structure

The acid methylation used for a single adsorption or for the azide methods tends, if carried out too long, to make the square of silk too fragile. It is therefore necessary to make a balance between a methylation duration which preserves the silk qualities as well as possible and which is however long enough to obtain a good efficiency. The glutaraldehyd method and particularly the diazo method enable a good preservation of the silk qualities.

2. Optimum pH of the immobilized enzyme

No difference can be noted between the optimum pH for the free Aspartate amino transferase and those of the diazo immobilized and a 0.05 to 0.1 unit variation only can be detected for the ribonuclease immobilized by this technique. As for the alkaline phosphatase immobilized by this same technique, its apparent optimum pH remains unchanged as with adsorption and, when it is immobilized with glutaraldehyd or by acids, it varies of about 0.2 units compared with the optimum pH of the free enzyme (6). We must point out that, in the case of alkaline phosphatase, a protons release occurs when the phenylphosphate hydrolysis is being carried out (cf. the enzymatic activity measurement of the latter). The more important the enzymatic activity bound on the square of silk is, the more important the local proton gradient created by diffusion phenomena will be.

3. Kinetic characteristics of the immobilized enzyme

In general, the apparent K_m increases on an immobilized enzyme, whatever the method used. The diffusional restraints are so much higher that the quantity of active immobilized enzyme is high, and that the substrate concentration is low. We pointed out that the increase in the apparent K_m should be put down to the active immobilized quantity rather than to a possible chemical modification due to coupling (6). Works in progress at present with the alkaline phosphatase tend to point out a linear correlation between the quantity of active immobilized enzyme and the apparent K_m value, whatever the method used.

II. QUANTITY OF IMMOBILIZED ENZYME

A quantitative estimation has been carried out in every case (cf table 3). Some values (*) result from the comparison between the activity of a silk square and the activity of a known quantity of free enzyme. This method is liable to give an under estimation of the immobilized quantity because no consideration is made of the diffusional restraints and the inhibition caused by the enzymatic reaction product when this one is a reaction inhibition. A better method to give an account of the immobilized quantity of a silk square is to determine, when possible, the maximum speed (V_m) of a known quantity of free enzyme and in the same way to determine the V_m of the active immobilized enzyme on a square (12). The effect of the phosphate ion is thus eliminated, this one being a competitive inhibitor and the diffusional restraints can be considered as negligible (13).

Enzyme	Method			
	Adsorption	Azide	Diazoic	Glutaraldehyd
Aspartate amino-transferase	(*) 0.33	(*) 0.20	0.77	-
Ribonuclease	-	-	20 (*)	-
Alkaline phosphatase	2.48	36.44	0.38	4.36

Table 3. Quantities of immobilized enzyme (expressed in μg enzyme per woven silk square ($2 \times 2 \text{ cm}$). The concentration of the grafting enzymatic solution was always of 0.5 mg per cm^3 , except for the AAT immobilized by adsorption by azides ($20 \mu\text{g per cm}^3$).

III. EXPECTATION AND GENERALIZATION OF THE USE OF THE WOVEN SILK AS A SUPPORT FOR OTHER PROTEINS

It is difficult to predict the results which will be given by such an immobilizing method with such an enzyme. It can be seen on table 3 where, with the diazoic method, $0.77 \mu\text{g}$ of Aspartate aminotransferase, $20 \mu\text{g}$ of ribonuclease and $0.38 \mu\text{g}$ of alkaline phosphatase are being immobilized. It can also be noted that for the same enzyme (alkaline phosphatase) the active immobilized quantities are not constant and vary according to the methods used. This may come from the nature of the amino acid involved in the linkage between the enzyme and the support, which may vary from one method to another. The number of linkages with the support can also be of importance in the quantity of immobilized protein.

The search of the optimum conditions of activation and of the immobilisation on the support are generally carried out with the same enzyme, but the results obtained are seldom fully identical with another enzyme. Therefore, although the immobilized methods can apparently be extended to a great number of enzymes, the comparison of methods only, will allow the choice of the best adapted method.

Although no standard support seem to exist up to now, the woven silk has proved to be an interesting support because of its chemical structure which offers a large choice of immobilization methods. The technical choice will have to be done according to the chemical nature of the molecule to be immobilized. An immobilization will have to be avoided as it is liable to modify the active site.

The use of the woven silk as a support seems well adapted to the immobilization of a great number of biological molecules, for a basic study as well as for an applied utilization in filter form, or for example in enzymatic multilayer reactors. The low density of silk makes such systems possible, by piling up silk filters without risking any clogging up, while disposing of an important available surface under a small volume.

DEUTERIUM EXCHANGE - A PROBE TO STUDY THE FINE STRUCTURE,
AND THE EXTENT AND TYPE OF ORDER IN SILK FIBROIN

G.S. NADIGER,

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

M.R. PADHYE and N.V. BHAT

Department of Chemical Technology, University of Bombay,
Matunga, Bombay 400 019,
India.

Structural aspects of silk of principal Indian varieties viz., Mulberry, Tasar, Eri and Muga have been investigated by infrared spectroscopy using deuteration technique. Deuteration was carried out for these control samples and their respective hydrolysates - 'hydrofibroin' obtained by partial acid hydrolysis. It was observed that NH to ND conversion takes place mostly in the amorphous portion which is accessible. The accessibility (%) decreased for hydrolysed sample indicating thereby that the hydrofibroin is highly crystalline and inaccessible to deuterium exchange. However, there is some amount of H-D exchange indicated by the accessibility (%). This may be due to the fact that N-H groups present on the surface of the hydrofibroin-crystallites are susceptible for exchange.

INTRODUCTION

Silk fibroin like any other fibrous polymer may be considered as consisting of two regions viz., a crystalline region and an amorphous region. The latter normally should have varying degree of order and morphologically is rather diffuse. Therefore, in a deuterium exchange reaction, the accessibility for deuterium exchange should vary with respect to different regions. In this process, the protons of the accessible NH groups undergo an exchange reaction of the type



When such a change in the molecular structure of fibroin is monitored by a suitable analytical technique to identify the degree and extent of the reaction, it could help to understand the fine structure on the one hand, and the percentage of crystallinity and other morphological features on the other.

Qualitative as well as quantitative measurements of such a type of exchange has been made in general for proteins and polypeptides (1-7). Since deuterium exchange in silk fibroin involves peptide hydrogen, one is principally interested in spectral changes observed in NH and ND frequencies. These IR bands range from primary amide band and amide I to V (8-17).

Lenormant (8) has observed a decrease in intensity of the amide II band at $1\ 550\text{ cm}^{-1}$ on deuteration. Likewise, Blout *et al* (9) have suggested the use of the ratio of the intensities of amide II ($1\ 550\text{ cm}^{-1}$ band) to amide I ($1\ 630\text{ cm}^{-1}$ band) bands to estimate the extent of exchange. However, the primary amide band has been found to be limited to solid state as interference of OH bands persists (10). Near infrared spectroscopy (11, 12), gravimetry (13) and line broadening in NMR spectra (14) have also been found as alternative techniques for deuterium exchange studies. Jeffries (15) has successively demonstrated qualitatively the application of IR spectroscopy as a probe to deuterium exchange using primary amide band at $3\ 300\text{ cm}^{-1}$ in the case of ten proteins and nylons. The deuterium exchange studies have also been made on films of a number of proteins using IR spectroscopy (16) and a decrease in intensity of the primary amide band at $3\ 300\text{ cm}^{-1}$ was observed due to deuterium exchange. These authors (16) have estimated the approximate extent of exchange in silkworm gut, keratin, gelatin and other proteins from the comparison of relative intensities of $3\ 300\text{ cm}^{-1}$ NH band and $2\ 410\text{ cm}^{-1}$ ND band taking into consideration the width of the bands. However, it has been found to be limited to a comparative study of different amide linked materials in a qualitative way.

The earlier work so far discussed has been found to deal with the changes in the IR spectra qualitatively and in some cases quantitatively by merely intensity measurement of IR bands of deuterated silk fibroin. However, in the recent past, it has been suggested that integrated intensity measurements of the infrared absorption bands should be done to get more meaningful results (18). The suggested procedure for obtaining integrated intensity is to plot $\log I_0/I$ (where I_0 and I represent the incident and transmitted intensity of infrared radiation) versus ν (wave number) and to determine the area under the curve using a planimeter by base line technique. However, the extinction coefficient has to be considered rather than absorption ($10\log I_0/I$).

Therefore, in the present investigation changes in the infrared spectra on deuterium exchange of silk fibroins of the four principal Indian varieties have been studied by integrated intensity measurement of the primary amide band at $3\ 300\text{ cm}^{-1}$ and the corresponding ND band at $2\ 410\text{ cm}^{-1}$. Furthermore, the silk fibroins from different varieties have been partially hydrolysed using hydrochloric acid to obtain the most crystalline region* (19). These hydrolysates have also been studied for deuterium exchange. The results obtained for different silk fibroins and their respective hydrolysates have been discussed in the foregoing paragraphs in the light of fine structure, and the extent and type of order.

* Mulberry silk fibroin was hydrolysed partially using 6N HCl for 48 hr and (48 + 48) hr at 40°C , whereas wild silk fibroins were hydrolysed partially using 8N HCl for the same duration at 40°C .

EXPERIMENTAL

Silk fibres viz., mulberry (*Bombyx mori*), tasar (*Antheraea mylitta*), eri (*Philosamia cynthia ricini*), and muga (*Antheraea assamensis*) were obtained from different sericultural research laboratories in India. These were degummed and freed from sericin as described in an earlier paper (20). Silk fibroins from the different varieties were partially hydrolysed and the details of the treatments are described elsewhere (19).

Control silk samples were cut into fine powder and passed through 300 mesh. However, hydrolysates were in the fine powder form and were used as such for the studies. Moisture free samples were introduced in the glove box which was maintained at slight positive pressure of dry nitrogen. Samples were soaked in 99.8% D₂O (deuterium oxide supplied by BARC) for 24 hr at room temperature 25°C in the dry box and then dried using phosphorous pentoxide (P₂O₅) inside the chamber. KBr pellet was prepared using a special die inside the glove box. Infrared spectra were recorded on Perkin Elmer IR spectrophotometer Model 377. In order to take care of the traces of the adsorbed water present in the potassium bromide (KBr) used for sample preparation, a blank KBr pellet was used in the reference beam. It may be mentioned that deuteration for longer time than 24 hr did not give any further exchange as seen from the IR spectra. IR spectra of deuterated silk fibroin and their hydrolysates were recorded in the region 4 000 cm⁻¹ - 400 cm⁻¹.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Fig. 1 and Fig. 2 show the infrared spectra of deuterated silk fibroin and their hydrolysates of mulberry and muga (a representative of wild silks) respectively. In order to find out the extent of the exchange, the primary amide band (N-H stretching) at 3 300 cm⁻¹ and corresponding N-D band at 2 410 cm⁻¹ were used. Accordingly, the IR transmission spectra in the range 4 000-2 000 cm⁻¹ were replotted in terms of optical density ($A = \log I_0/I$) versus wave number ν ($\nu = \frac{10^4}{\lambda}$, where λ = wave length in cm). Further, the areas under the 3 300 cm⁻¹ and 2 410 cm⁻¹ (which is superposed by 2 375 cm⁻¹) bands were measured using planimeter by base line technique. Finally, the ratio of the area under the band at 2 410 cm⁻¹ to the area under the band at 3 300 cm⁻¹ has been defined as accessibility. The data on accessibility for the different varieties of silk fibroins and their respective hydrolysates are given in Table 1.

It may be noted that the above calculations of integrated intensity have been made with the following two assumptions: 1) all the NH groups in the accessible region are mostly equated to the amount of the amorphous region and 2) it is assumed that the extinction coefficient of the NH groups absorption is constant irrespective of the morphological location of the group.

In order to compare the accessibility values with the degree of crystallinity, the data on IR crystallinity index as reported earlier (19) for undeuterated samples are also given in Table 2.

It may be seen from the Tables 1 and 2 that the inaccessible peptide groups cannot be directly equated to IR crystallinity. In other words, the usual concept of two phase theory viz., a crystalline or inaccessible and amorphous or accessible phase does not give a conclusive and accurate explanation for the observed extent of exchange. It may be recalled that the percentage of accessibility is not always a function of helical content in the case of proteins having helical conformation. But, it has been found that deuterium exchange reaction is rather slow and the extent

of exchange is less in the region of protein having helical conformation when compared to random coil region (9, 21, 22). Furthermore, it is rather difficult to attribute the location of slow exchanging hydrogen atoms to helical conformation (23, 24) as the hydrogen atoms may also be shielded from exchange by their location in the hydrophobic region of protein. Based on similar arguments, the higher values for in-accessibility could be explained for our samples having extended β -type of conformation. According to Zuber (25) and Shaw (26) the fibroin of *B. mori* consists of about 61% highly ordered crystalline region which is formed mainly from sequences of glycine, alanine and serine. Non-crystalline partially ordered phase consists about 30% which in addition to sequence of earlier phase consists of sequences of glycine, alanine, valine and tyrosine. The completely disordered amorphous phase which has all other amino acids amounts for the remaining 9%. But, Suzuki (3), on the basis of IR spectra, has shown that 70% of the material is ascribed to random phase and 30% to crystalline phase. It may be remarked that Suzuki (3) had used a regenerated silk fibroin having altogether different morphological structure and mostly having very low crystallinity. The accessibility values thus obtained on deuteration on the basis of Zuber (25) and Shaw (26) models should be between 9-39% depending upon the availability of phase II for deuteration. Similarly the soluble fraction of the *B. mori* fibroin by treating with chymotrypsin has been found to be 40% (27), which should be more or less equated to the accessibility (%). Therefore, the accessibility value of about 30% for mulberry agrees with the models of Zuber (25) and Shaw (26). However, tasar, eri and muga have slightly lower accessibility. Since similar studies have not been done for wild silks, it is rather difficult to explain the observed phenomenon. Furthermore, these accessibility values for wild silks are not in agreement with IR crystallinity indices (ref. Table 1 and 2).

As expected the accessibility (%) decreased in hydrolysate and the decrease in accessibility is significant for the hydrolysates obtained after 48 hr treatment, when compared to hydrolysate obtained after (48 + 48) hr. However, X-ray diffraction data showed a distinct loss of amorphous material on repeated hydrolysis i.e., (48 + 48) hr (19). Comparison of Table 2 shows that IR crystallinity index did not show a marked increase on 48 hr hydrolysis in the case of mulberry and eri. On the other hand tasar and muga showed significant increase in IR crystallinity index for 48 hr hydrolysis. Further, increase in IR crystallinity index due to increase in duration of hydrolysis was not observed for tasar. However, muga showed sequential increase in IR crystallinity index due to hydrolysis as a function of time. IR crystallinity index increase from 48 hr hydrolysates to (48 + 48) hr hydrolysates for mulberry silk. But eri silk did not show any difference owing to hydrolysis which calls for further investigation. Similarly, accessibility values for hydrolysates of all varieties showed a decreasing trend. However, when the time of hydrolysis was increased to (48 + 48) hr the decrease in the value of accessibility was not that significant. Further, it has been widely studied that fibrous proteins may exist under two distinct crystalline phases involving two different chain conformations (27, 28). The silk fibroin existing in the spun filament possessed β structure and is known as β silk fibroin whereas another crystalline form known as α silk or water soluble silk. The natural as well as regenerated silk fibroins have been studied by Japanese workers by IR spectroscopy (29, 30).

It may be noted that the bands assigned for mulberry silk in β -type structure are I 630, I 530, I 265 and 700 cm^{-1} corresponding to amide I, amide II, amide III and amide V respectively (29). Also the bands at I 660, I 540, I 235 and 650 cm^{-1} are assigned to random coil type structure. Likewise, Magoshi *et al* (30) have classified the bands corresponding to β -type and random coil type structures in the case of regenerated tasar. However, the bands of interest in isotope exchange are those which have the contribution due to N-II groups only.

In the present studies, the fibroins investigated were obtained from cocoons, which are supposed to be a mixture of the α -random coil and β -forms resulting from the silkworm spinning process. Therefore, the amorphous bands involving N-H groups which may be due to contribution from Phase I and II of Zuber (25) and Shaw (26) mostly get weakened after deuteration. Further, Beer *et al* (16) have shown their inability to explain the decrease in intensity of the band at $1\ 240\text{ cm}^{-1}$ together with increase or no change in the intensity of the band at $1\ 265\text{ cm}^{-1}$. This may be due to the fact that there was some ambiguity about the assignment of the IR bands. It has been shown that the band at $1\ 265\text{ cm}^{-1}$ is characteristic of β -form and thus is not likely to be affected by deuteration. Further, the decrease in intensity of $1\ 240\text{ cm}^{-1}$ band is obviously expected as it corresponds to the random coil configuration. The shift of the band at $1\ 540\text{ cm}^{-1}$ is expected on deuteration. However, it is not easily observable as the shift is expected to be in the range of 15 cm^{-1} as reported by previous workers (8). The band at $1\ 440\text{ cm}^{-1}$, described by Beer *et al* (16) as a new band after deuteration, could not be identified in this study as the very band is observed even in the undeuterated sample at that position.

When the fibroin is partially hydrolysed, it is observed from the X-ray diffraction studies (19) that the residues are prominently more crystalline. It has also been observed that the partial hydrolysis process leads to selective dissolution of amorphous portion and also to some extent recrystallization. An apparent increase in the crystallite size has been observed from the studies of X-ray diffraction of silk. Such an increase is either due to the removal of strain on the micro-crystals in the hydrolysis process or due to recrystallization process. However, such a large increase in the size of the crystallite was not observed in the case of mulberry (19).

If our interpretation that the hydrolysates consist of only crystalline region is correct, then these should not be accessible for deuterium exchange. However, it can be noted from Table I that the deuteration does take place, though to a less extent. This small accessibility (%) may be possibly due to the free N-H groups amenable on the surface of the crystallites for deuteration.

Likewise, the data on the chemical and crystalline structure of *B. mori* fibroin as also the model compounds by Lotz and his group (27, 28) gave the supporting evidence to our results with respect to various amino acid linkages as envisaged in the crystalline region of the four varieties of Indian silks (19) on the one hand and deuterium accessibility (%) on the other.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors wish to express their sincere thanks to Dr. M.S. Jolly, Director, C.S.R. & T.L., Mysore, Dr. M.N. Narasimhanna, Director, National Seed Project, Bangalore, and Dr. G. Subba Rao, Joint Director, for supplying the samples. Our thanks are also due to Dr. V. Venkataraman of B.T.R.A. for providing some experimental facilities and to G.S.I.R. for financial assistance. Author (1) expresses his deep sense of gratitude to Prof. A.R. Kasturi Bai, Director, K.S.S.D.L., Bangalore, for carefully going through the manuscript and for the valuable suggestions.

REFERENCES

01. SUTHERLAND G.B.M. (1952) : *Advanc. Protein. Chem.* , 7, p. 291.
02. BAMFORD C.H., ELLIOT A., HANBY W.E. (1956) : "Synthetic Polypeptides", Academic Press New York.
03. SUZUKI E. (1967) : *Spectrochim. Acta*, 23A, p. 2303.
04. LENORMANT H., BLOUT E.R. (1953) : *Nature*, 172, p. 770.
05. HVIDT A., LINDERSTROM-LANG K. (1954) : *Biochim. Biophys. Acta*, 14, p. 574.
06. HVIDT A., NIELSEN S.O. (1966) : *Advanc. Protein. Chem.*, 21, p. 287.
07. PARKER F.S., BHASKER K.R. (1970) : *Appl. Spectro. Rev.* (Ed Brame), 3, p. 91.
08. LENORMANT H. (1956) : *Disc. Faraday Soc.*, 52, p. 549.
09. BLOUT E.R., DELOZE C., ASADOURIM A. (1961) : *J. Am. Chem. Soc.*, 83, p. 1 895.
10. MAGGIS G.H. (1957) : *Biochim. Biophys. Acta*, 23, p. 494.
11. HERMANS J.J. Jr., SCHERAGA H.A. (1960) : *J. Am. Chem. Soc.*, 82, p. 5 156.
12. FRASER R.D., MACRAE T.P. (1958) : *J. Chem. Phys.*, 28, p. 1 120.
13. MORRIS J.L. (1961) : *Biochim. Biophys. Acta*, 47, p. 606.
14. WISHNIA A., SAUNDERS M. (1962) : *J. Am. Chem. Soc.*, 84, p. 4 235.
15. JEFFRIES R. (1964) : *J. Polym. Soc.*, A2, p. 5 161.
16. BEER M., SUTHERLAND G.B.M., TANNER K.N., WOOD D.L. (1958) : *Proc. Roy. Soc.*, (London), A 249, p. 147.
17. WOOD F., KING G. (1963) : *J. Text. Inst.*, 54, T 111.
18. ARTHUR S. WAXLER (1967) : *Appl. Spectro. Rev.*, (Ed. Brame), 1(1), p. 29-98.
19. BHAT N.V., NADIGER G.S. (1980) : *J. Appl. Polym. Sci.*, 25, p. 921.
20. BHAT N.V., NADIGER G.S., PARALIKER K.M., BETRABET S.M. (1980) : *J. Appl. Polym. Sci.*, 25, p. 635.
21. ENGLANDER S.W. : in "Poly-amino acids" G.D. FASMAN, (Ed. Marcel Dekker Inc., New York, 1967, p. 339, chapter 8.
22. BRYAN W.P., NIELSEN S.O. (1960) : *Biochim. Biophys. Acta*, 42, p. 552.
23. BEYCHOK C., BLOUT E.R. (1961) : *J. Mol. Biol.*, 3, p. 769.
24. KENDREW J.C., WATSON H.C., STRANDBERG B.E., DICKERSON R.E., PHILLIPS D.G., SHORE V.C. (1961) : *Nature*, 190, p. 666.
25. ZUBER H. (1961) : *Kolloid Z.*, 179, p. 100.
26. SHAW J.T.B. (1964) : *Biochem. J.*, 93, p. 45 & 54.
27. LOTZ B., CESARI COLONNA (1979) : *Biochimie*, 61, p. 205.
28. LOTZ B., GONTHIER VASSLE A., BRACK A., MAGOSHI J. (1982) : *J. Mol. Biol.*, 156, p. 345.
29. MAGOSHI J., MAGOSHI Y. (1975) : *J. Polym. Sci.*, 13, p. 1 347.
30. MAGOSHI J., MAGOSHI Y., NAKAMURA S. (1977), *J. Appl. Polym. Sci.*, 21, p. 2 405.

Tableau 1. Valeurs du taux de l'échange H-D pour les échantillons témoins, les hydrolysats à 48 h et les hydrolysats à (48 + 48) h de différentes variétés de soie.

Table 1. The values of H-D exchange index for different varieties of silk control, 48 hr hydrolysates and (48 + 48) hr hydrolysates.

Variété/ Variety	Témoïn/ Control	Hydrolysats à 48 h/ 48 hr hydrolysate	Hydrolysats à (48 + 48) h/ (48 + 48) hr hydrolysate
Mûrier/ Mulberry	0,29 0.29	0,13 0.13	0,11 0.11
Tussah/ Tasar	0,21 0.21	0,09 0.09	0,08 0.08
Eri/ Eri	0,21 0.21	0,13 0.13	0,13 0.13
Muga/ Muga	0,27 0.27	0,11 0.11	0,09 0.09

Tableau 2. Taux de cristallinité IR pour les échantillons témoins, les hydrolysats à 48 h et les hydrolysats à (48 + 48) h.

Table 2. IR cristallinity index for control, 48 hr hydrolysates and (48 + 48) hr hydrolysates.

Variété/ Variety	Témoïn/ Control	Hydrolysats à 48 h/ 48 hr hydrolysate	Hydrolysats à (48 + 48) h/ (48 + 48) hr hydrolysate
Mûrier/ Mulberry	0,66 0.66	0,67 0.67	0,74 0.74
Tussah/ Tasar	0,50 0.50	0,65 0.65	0,66 0.66
Eri/ Eri	0,62 0.62	0,62 0.62	0,64 0.64
Muga/ Muga	0,50 0.50	0,76 0.76	0,82 0.82

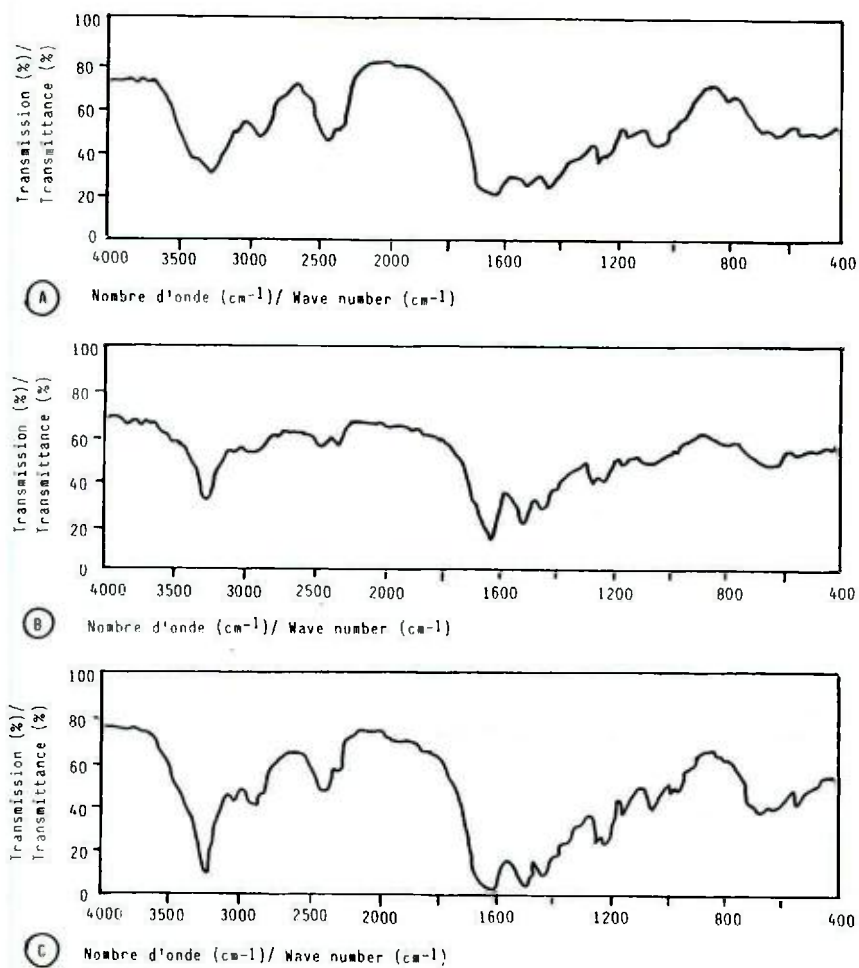


Figure 1. Spectre infrarouge de la soie mûrier deutérée.

Fig. 1. IR spectra of deuterated mulberry silk.

A = Echantillon témoin / Control

B = Hydrolysate à 48 h. / Hydrolysate 48 hr.

C = Hydrolysate à (48 + 48) h. / Hydrolysate (48 + 48) hr.

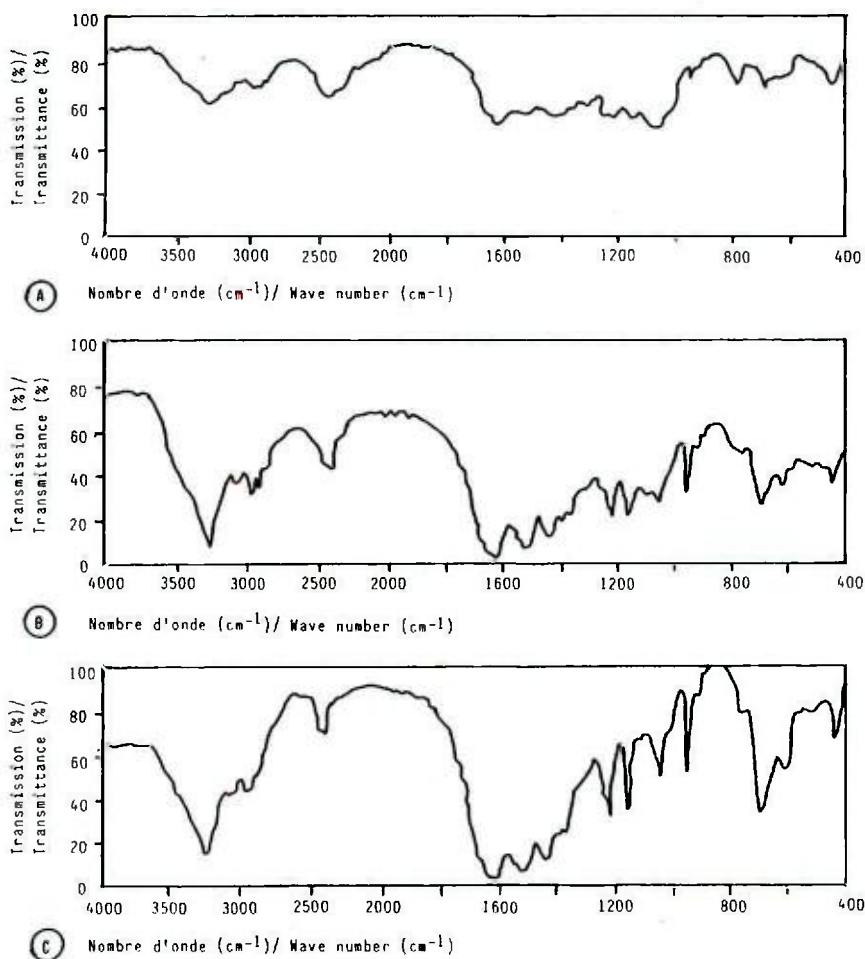


Figure 2. Spectre infrarouge typique des soies sauvages indiennes deutérées.

Fig. 2. Typical IR spectra of deuterated Indian wild silks.

A = Echantillon témoin de soie muga / Muga control

B = Hydrolysate à 48 h. / Hydrolysate 48 hr.

C = Hydrolysate à (48 + 48) h. / Hydrolysate (48 + 48) hr.

ECCHANGE DU DEUTERIUM - UNE SONDE POUR ETUDIER
LA STRUCTURE FINE, L'ETENDUE ET LE TYPE
D'ORDRE DE LA FIBROINE

G.S. NADIGER,

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

M.R. PADHYE et N.V. BHAT

Department of Chemical Technology, University of Bombay,
Matunga, Bombay 400 019,
India.

Les aspects de la structure des principales variétés indiennes de soie : mûrier, tussah, eri et muga, ont été étudiés par spectroscopie à infrarouge au moyen de la technique de deutération. La deutération a été effectuée pour les échantillons témoins et leurs hydrolysats respectifs - "hydrofibroïne" obtenue par hydrolyse acide partielle. On observe que la transformation de NH en ND survient principalement dans la partie amorphe qui est accessible. L'accessibilité (%) diminue pour les échantillons hydrolysés, indiquant ainsi que l'hydrofibroïne est très cristalline et inaccessible à l'échange du deutérium. Cependant, il existe une certaine quantité d'échange H-D. Cela doit être dû au fait que les groupes N-H présents à la surface des cristallites des hydrofibroïnes sont échangeables.

INTRODUCTION

Comme tout polymère fibreux, la fibroïne de soie comprend deux zones, la zone cristalline et la zone amorphe. Cette dernière a normalement un degré d'ordre variable et est assez diffuse morphologiquement. Par conséquent, dans une réaction d'échange du deutérium, l'accessibilité pour l'échange du deutérium devrait varier en fonction des différentes régions. Au cours de ce processus, les protons des

groupes accessibles NH subissent une réaction d'échange de type



Lorsqu'un tel changement dans la structure moléculaire de la fibroïne est contrôlé par une technique analytique appropriée pour identifier le degré et l'ampleur de la réaction, il est possible de comprendre la structure fine, la cristallinité et d'autres caractères morphologiques.

Des mesures qualitatives et quantitatives d'un tel type d'échange ont été effectuées pour les protéines et les polypeptides (1-7). Comme l'échange de deutérium dans la fibroïne implique la participation d'hydrogène peptidique, on s'intéresse principalement aux changements du spectre observés dans les fréquences de NH et ND. Ces bandes infrarouges s'étalent de la bande amide primaire et amide I à V (8-17).

Lenormant (8) a observé une diminution de l'intensité de la bande amide II à $1\ 550\text{ cm}^{-1}$ sous deutération. De même, Blout *et al* (9) ont suggéré l'utilisation du taux d'intensité des bandes amides II ($1\ 550\text{ cm}^{-1}$) par rapport aux bandes amide I pour évaluer l'importance de l'échange. Cependant, on a découvert que la bande amide primaire est limitée à l'état solide comme l'interférence de la bande OH persiste (10). La spectroscopie à infrarouge (11, 12), la gravimétrie (13) et l'élargissement de ligne dans le spectre de résonance magnétique nucléaire (14) sont des techniques alternatives pour l'étude de l'échange du deutérium. Jeffries (15) a ensuite démontré de manière qualitative l'application de la spectroscopie à infrarouge comme test de l'échange du deutérium en utilisant la bande amide primaire à $3\ 300\text{ cm}^{-1}$ dans le cas de dix protéines et nylons. Des études de l'échange du deutérium ont aussi été faites sur des films d'un certain nombre de protéines en utilisant la spectroscopie IR (16) et ont permis d'observer une baisse de l'intensité de la bande primaire à $3\ 300\text{ cm}^{-1}$ due à l'échange du deutérium. Ces auteurs (16) évaluent l'importance de l'échange chez l'intestin du ver à soie, la kératine, la gélatine et d'autres protéines en comparant les intensités relatives de la bande NH à $3\ 300\text{ cm}^{-1}$ et de la bande ND à $2\ 410\text{ cm}^{-1}$, et en tenant compte de la largeur des bandes. Ces études sont cependant limitées à la comparaison qualitative des différents matériaux liés à l'amide.

Les travaux mentionnés ci-dessus se rapportent à l'analyse qualitative des changements intervenant dans les spectres IR, et quantitative dans certains cas par la mesure de l'intensité des bandes IR de la fibroïne deutérée. Récemment, on a émis l'hypothèse que des mesures de l'intensité intégrée des bandes d'absorption infrarouge amèneraient des résultats plus probants (18). La méthode conseillée pour obtenir l'intensité intégrée est de faire le graphique du $\log$ de I_0/I (où I_0 et I représentent l'intensité incidente et l'intensité transmise de la radiation infrarouge) en fonction de ν (longueur d'onde) et de déterminer la surface située sous la courbe en utilisant un planimètre par la technique de la ligne de base. On doit cependant prendre en compte le coefficient d'extinction plutôt que le taux d'absorption ($10\text{ g } I_0/I$).

Dans la présente recherche, les changements intervenant dans les spectres infrarouges sous échange de deutérium de la fibroïne des quatre principales variétés de soie indienne, sont étudiés en mesurant l'intensité intégrée de la bande amide primaire à $3\ 300\text{ cm}^{-1}$ et de la bande ND correspondante à $2\ 410\text{ cm}^{-1}$. De plus, les fibroïnes des différentes variétés de soie sont partiellement hydrolysées au moyen d'acide chlorhydrique pour obtenir une région très cristalline* (19). Ces hydrolysats

* La fibroïne de *Bombyx* est hydrolysée partiellement en utilisant de l'HCl 6N pendant 48 h et (48 + 48) h à 40°C . Les fibroïnes de soies sauvages sont hydrolysées en utilisant de l'HCl 8N pendant la même durée à 40°C .

sont également étudiés sous l'angle de l'échange du deutérium. Les résultats obtenus pour les différentes fibroïnes et leurs hydrolysats respectifs sont discutés ci-après pour ce qui concerne la structure fine, l'importance et le type d'ordre.

MATERIEL ET METHODES

Les fibres de soie du mûrier (*Bombyx mori*), tussah (*Antheraea mylitta*), eri (*Philosamia cynthia ricini*) et muga (*Antheraea assamensis*) proviennent de différents laboratoires de recherches séricicoles indiens. Ces soies sont décreusées et débarrassées de leur sérécine (20). Les fibroïnes des différentes variétés sont partiellement hydrolysées. Le détail des traitements employés est donné dans un autre article (19). Les échantillons de soie témoins sont réduits en poudre fine et passés à travers un tamis de 300 mesh. Les hydrolysats sont sous forme de poudre fine et utilisés tels quels. Les échantillons secs sont introduits dans la boîte à gants qui est maintenue sous pression légère d'azote gazeux. Les échantillons sont trempés dans un bain de 99,8 % de D₂O (oxyde de deutérium fourni par BARC) pendant 24 h à température ambiante (25° C) dans la boîte sèche et séchés en utilisant du pentaoxyde de phosphore (P₂O₅) dans la chambre. Le granulé de KBr est préparé dans la boîte avec un moule spécial. Les spectres infrarouges sont enregistrés sur un spectrophotomètre à infrarouges Perkin Elmer, modèle 377. Une boulette de KBr est utilisée comme "blanc" sur la balance afin de tenir compte de l'eau adsorbée présente dans le bromure de potassium employé dans la préparation des échantillons. On peut indiquer que la deutération prolongée après 24 h n'entraîne pas d'échange supplémentaire comme le montrent les spectres IR. Les spectres IR de la fibroïne deutérée et des hydrolysats sont enregistrés dans la région 4 000 cm⁻¹ à 400 cm⁻¹.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les figures 1 et 2 montrent les spectres infrarouges de la fibroïne deutérée de la soie "mûrier", de la soie muga (représentative des soies sauvages) et de leurs hydrolysats. Pour apprécier l'importance de l'échange, on a utilisé la bande amide primaire (s'étirant de N à H) à 3 300 cm⁻¹ et la bande correspondante N-D à 2 410 cm⁻¹. De même, les spectres de transmission IR dans le rayon de 4 000 à 2 000 cm⁻¹ sont retracés en termes de densité optique ($A = \log I_0/I$) par rapport au nombre d'ondes ν ($\nu = 10^4$ quand λ = longueur d'onde en cm). De plus, les régions sous les bandes de 3 300 cm⁻¹ et 2 410 cm⁻¹ (qui est superposée à 2 375 cm⁻¹) sont mesurées au moyen d'un planimètre. Le rapport entre la région située sous la bande à 2 410 cm⁻¹ et la région située sous la bande à 3 300 cm⁻¹ est défini comme le taux d'accessibilité. Le tableau 1 présente les taux d'accessibilité des différentes variétés de fibroïnes et de leurs hydrolysats respectifs.

On peut noter que les calculs ci-dessus de l'intensité intégrée ont été faits en partant des deux postulats suivants : 1) tous les groupements NH de la région accessible sont pratiquement égaux à ceux de la région amorphe, et 2) le coefficient d'absorption des groupements NH est constant et ne dépend pas de la localisation morphologique du groupement.

Afin de comparer les valeurs de l'accessibilité avec le degré de cristallinité, les taux de cristallinité IR sont fournis par le tableau 2, ainsi qu'il avait été fait précédemment (19) pour les échantillons non-deutérés.

On peut voir à partir des tableaux 1 et 2 que les groupements peptidiques inaccessibles ne peuvent pas être directement mis en relation avec la cristallinité IR. En d'autres termes, le concept habituel d'une théorie à deux phases, à savoir :

une phase cristalline ou inaccessible et une phase amorphe ou accessible, n'apporte pas d'explication concluante et précise sur l'importance de l'échange observé. On peut rappeler que le pourcentage d'accessibilité n'est pas toujours fonction du contenu hélicoïdal pour les protéines à conformation hélicoïdale. Mais on a découvert que la réaction d'échange du deutérium est assez lente et moins importante dans la région d'une protéine à conformation hélicoïdale que dans la région de la pelote statistique (9, 21, 22). Il est en outre assez difficile d'attribuer la localisation d'atomes d'hydrogène à échange lent à la conformation hélicoïdale (23, 24) étant donné que les atomes d'hydrogène peuvent aussi être soustraits à l'échange par leur localisation dans la région hydrophobe de la protéine. La même argumentation peut expliquer les valeurs élevées de non-accessibilité des échantillons à conformation de type β . Selon Zuber (25) et Shaw (26), la fibroïne de *B. mori* se compose pour environ 61 % d'une région cristalline à ordre élevé, qui est principalement formée à partir de séquences de glycine, alanine et sérine. La région non-cristalline à ordre partiel représente environ 30 % et se compose de séquences de glycine, alanine, valine et tyrosine, en plus des séquences de la région précédente. La région amorphe complètement désordonnée qui contient tous les autres acides aminés compose les 9 % restants. Mais Suzuki (3) a démontré, sur la base des spectres IR, que 70 % de la matière sont imputables à la phase aléatoire et 30 % à la phase cristalline. Il faut remarquer que Suzuki (3) a utilisé une fibroïne régénérée ayant une structure morphologique différente et une cristallinité très faible. Les valeurs d'accessibilité obtenues en deutération suivant le modèle de Zuber (25) et de Shaw (26) devraient être de l'ordre de 9 à 39 % selon la disponibilité de la phase II pour la deutération. De même, la fraction soluble de la fibroïne de *B. mori* est de 40 % (27) avec le traitement à la chymotrypsine, ce qui devrait être sensiblement égal à l'accessibilité (%). Le taux d'accessibilité de la fibroïne de soie "mûrier" qui atteint 30 % concorde donc avec les modèles de Zuber (25) et Shaw (26). Les fibroïnes de tussah, eri et muga ont cependant une accessibilité un peu plus faible. Comme aucune étude semblable n'a été faite sur les soies sauvages, il est assez difficile d'expliquer ce phénomène. De plus, ces valeurs de l'accessibilité pour les soies sauvages sont en contradiction avec les indices IR de cristallinité (cf. tableaux 1 et 2).

Comme prévu, le pourcentage d'accessibilité diminue pour les hydrolysats, cette baisse étant significative dans les hydrolysats obtenus après 48 h de traitement par rapport aux hydrolysats soumis à (48 + 48) h de traitement. Cependant, les chiffres de diffraction aux rayons X indiquent une perte sensible de la matière amorphe lors de l'hydrolyse répétée (48 + 48 h) (19). Le tableau 2 montre que le taux IR de cristallinité n'augmente pas de façon marquée lors de l'hydrolyse de 48 h pour les fibroïnes de soie mûrier et eri, contrairement aux fibroïnes de soie tussah et muga. De plus, on n'observe pas pour la soie tussah d'augmentation du taux IR de cristallinité lorsque la durée de l'hydrolyse est prolongée. La soie muga montre cependant une augmentation séquentielle du taux IR de cristallinité en fonction de la durée de l'hydrolyse. Pour la soie mûrier, il y a augmentation du taux IR de cristallinité dans les hydrolysats de (48 + 48) h par rapport aux hydrolysats de 48 h. Mais aucune différence relative à l'hydrolyse n'apparaît chez la soie eri, et ceci appelle une recherche plus poussée. De même, les taux d'accessibilité des hydrolysats de toutes les variétés de soie ont tendance à diminuer. Cependant, quand la durée de l'hydrolyse est augmentée à 48 + 48 heures, il n'apparaît pas de diminution significative du taux d'accessibilité. De plus, des études approfondies ont montré que les protéines fibreuses peuvent exister sous deux formes cristallines distinctes impliquant deux conformations de chaîne différentes (27, 28). La fibroïne du filament filé (la bave) possède une structure β et est appelée fibroïne β mais une autre forme cristalline est connue sous le nom de soie α ou soie soluble. Les fibroïnes naturelles et les fibroïnes régénérées ont été étudiées par des chercheurs japonais au moyen de la spectroscopie IR (29, 30).

On peut noter que les bandes attribuées à la soie mûrier de structure β et correspondant à l'amide I, l'amide II, l'amide III et l'amide V sont respectivement de 1 630, 1 530, 1 265 et 700 cm^{-1} (29). Egalement, les bandes à 1 660, 1 540, 1 235 et 650 cm^{-1} sont attribuées à la structure de type pelote statistique. Magoshi *et al* (30) ont également classifié les bandes correspondant aux structures du type β et du type pelote statistique pour la fibroïne régénérée de tussah. Cependant, les bandes intéressantes du point de vue de l'échange isotope sont celles qui ont leur contribution due uniquement aux groupes N-H.

Dans la présente étude, les fibroïnes utilisées proviennent de cocons et sont un mélange des formes β et α résultant du filage par le ver à soie. Les bandes amorphes impliquant les groupements N-H qui semblent dues à la contribution des phases I et II définies par Zuber (25) et Shaw (26) sont donc affaiblies après la deutération. Beer *et al* (16) n'ont pu expliquer pourquoi l'intensité de la bande diminue à 1 240 cm^{-1} alors qu'elle augmente ou ne change pas à 1 265 cm^{-1} . Ceci est peut-être dû à l'ambiguïté qui existe pour la répartition des bandes IR. On a montré que la bande à 1 265 cm^{-1} est caractéristique du type β et ne doit donc pas être affectée par la deutération. On s'attend évidemment à une diminution de l'intensité de la bande à 1 240 cm^{-1} , car celle-ci correspond à la configuration de pelote statistique. On prévoit un décalage de la bande à 1 540 cm^{-1} lors de la deutération. Ce décalage est difficilement observable car il se produit sur une marge de 15 cm^{-1} ainsi que des chercheurs l'ont décrit antérieurement (8). La bande à 1 440 cm^{-1} décrite par Beer *et al* (16) comme une nouvelle bande après la deutération, n'a pu être identifiée au cours de cette étude car on observe une bande dans cette position même dans l'échantillon non-deuté.

Quand la fibroïne est partiellement hydrolysée, les études par diffraction aux rayons X (19) montrent que les résidus sont principalement de nature cristalline. On observe également que l'hydrolyse partielle entraîne une dissolution sélective de la région amorphe, et, dans une certaine mesure, une recristallisation. On observe lors de l'étude par diffraction aux rayons X que la taille des cristallites augmente. Une telle augmentation est due soit à la suppression d'une tension sur les microcristaux dans le processus d'hydrolyse, soit à la recristallisation. On n'a cependant pas observé une augmentation aussi importante de la taille des cristallites dans le cas de la soie mûrier (19).

Si notre interprétation selon laquelle les hydrolysats se composent uniquement d'une région cristalline, est correcte, alors ceux-ci ne devraient pas être accessibles à l'échange du deutérium. Cependant, on peut voir dans le tableau I que la deutération a effectivement lieu, bien qu'elle soit moins importante. Ce faible pourcentage d'accessibilité peut être dû à des groupements N-H libres situés à la surface des cristallites et sujets à deutération.

De même, les données obtenues sur la structure chimique et cristalline de la fibroïne de *B. mori* et les modèles proposés par Lotz et son équipe (27, 28) confortent nos résultats si l'on tient compte d'une part des différentes liaisons d'acides aminés telles qu'elles sont apparentes dans la région cristalline des quatre variétés de soies indiennes (19), et d'autre part du taux d'accessibilité du deutérium.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient sincèrement le Dr M.S. Jolly, Directeur du C.S.R. & T.I., Mysore, le Dr M.N. NARASIMHANNA, Directeur du National Seed Project, Bangalore, et le Dr G. Subba Rao, Co-Directeur, pour leur avoir fourni les échantillons. Nous remercions aussi le Dr V. Venkataraman de B.T.R.A. pour nous avoir permis de mener à bien nos expériences, et le C.S.I.R. pour son aide financière. L'auteur (1) exprime sa gratitude au Professeur A.R. Kasturi Bai pour ses conseils et suggestions sur le manuscrit.

REVUE SIGNALÉTIQUE

DESCRIPTIVE REVIEWS

LIST OF LANGUAGE SYMBOLS USED

(Bg) Bulgare
Bulgarian

(C) Chinois
Chinese

(D) Allemand
German

(E) Anglais
English

(F) Français
French

(J) Japonais
Japanese

(K) Coréen
Korean

(Pl) Polonais
Polish

(Pt) Portugais
Portuguese

(R) Russe
Russian

(Ro) Roumain
Rumanian

(S) Espagnol
Spanish

The corresponding small letters are used for indicating the language of the summary.

LISTE DES INDICATIFS DE LANGUES UTILISÉS

Les lettres minuscules correspondantes sont utilisées pour indiquer la langue du résumé.

MURIER / MULBERRY

ALTEV M.D.

Use of DEMS in combination with hybridization in selection of heteroploid forms of mulberry. (Utilisation des DEMS en combinaison avec l'hybridation dans la sélection des formes hétéropléïdes du mûrier).

Dokl. Akad. Nauk. A2 S.S.R., 39(3), p. 63-67. (R)

BURMAN T.K., NAGGHAUDHURI A.K., PAL S.P.

Anti inflammatory and antipyretic activities of *Morus indica*. (Activités anti-inflammatoires et antipyrétiques du *Morus indica*).

Planta Medica, 1983.

HANO Y., NOMURA T.

Constituents of the Chinese crude drug "Sang Bai Pi" (*Morus* root barks). 4) Structure of four new flavonoids sanggenon H, I, J and K. (Composition de la drogue brute chinoise "Sang Bai Pi" (écorce de racine de mûrier). 4) structure de quatre nouveaux flavonoïdes, Sanggenon H, I, J, et K.)

Heterocycles, 1983, 20, p. 1071-1076. (E)

ISHIZAKA T.*, WATANABE H., HOSODA S., SEKIGAWA T., YOKOYAMA T.

Fluorescent antibody study on the dwarf-diseased mulberry leaf and the viruliferous vector leaf hopper, *Hishimonus sellatus* Uhler. (Etude par anticorps fluorescent de la feuille de mûrier atteinte de nanisme et du vecteur virulent, la sauterelle *Hishimonus sellatus* Uhler.)

J. Seric. Sci. Jpn., 1983, 52(5), p. 378-382. (J,j,e)

The distribution of mycoplasma-like organisms in the tissues of dwarf-diseased mulberry leaf and the imago of the vector leaf hopper which had sucked the sap of infected mulberry tree were investigated by fluorescent antibody technique. An indirect fluorescent antibody method was carried out using the anti-dwarf mulberry leaf specific serum as a primary antibody and rabbit IgG conj. FITC as a secondary antibody. Specific fluorescence was observed in the phloem and thick walled parenchyma of infected mulberry leaf. The same specific fluorescence was also observed in the salivary gland and the fat body in abdomen of viruliferous vector leaf hopper. These results indicate that it is possible to diagnose a viruliferous leaf hopper by fluorescent antibody technique.

La distribution des organismes du genre mycoplasme dans les tissus de la feuille de mûrier atteinte de nanisme et l'imago de la sauterelle vecteur qui a sucé la sève du mûrier infecté sont étudiés par la technique des anticorps fluorescents. Une méthode par double-anticorps fluorescent est appliquée en utilisant le sérum anti-nanisme spécifique à la feuille de mûrier comme premier anticorps et le FITC conj. IgG de lapin comme deuxième anticorps. La fluorescence spécifique est observée dans le libé et les parenchymes à parois épaisses de la feuille infectée. La même fluorescence spécifique est observée également dans la glande salivaire et le corps gras de l'abdomen de la sauterelle vecteur du virus. Ces résultats montrent qu'il est possible de diagnostiquer une sauterelle grâce à la méthode des anticorps fluorescents.

* Nagano-ken Sericultural Experiment Station, Ueda 386, Japan.

KOBAYASHI Y., MATSUO R., YOSHIHARA K., OHKAWA A.

Characterization of physical properties of enzymic pulp paper from paper mulberry (kozo). (Caractérisation des propriétés physiques du papier de pulpe enzymatique préparé à partir de papier de mûrier (kozo).)

Kami Pa Gikyoshi, 1983, 37(8), p. 737-744. (J)

OKABE T.

The year of onset of flowering and fruit-bearing about mulberry seedlings. (L'année du début de floraison et de formation des fruits chez les jeunes plants de mûrier.)

J. Seric. Sci. Jpn., 1983, 52(5), p. 432-437. (J,j,e)

To examine how many years are required for the mulberry seedling to start flowering after sowing, the flowering of 1-year-old seedlings growing in the nursery and that of 2 to 4-years-old seedlings growing in the field were examined. In the year after they had been sown, none of the seedlings in the nursery in the field flowered, but some seedlings grown by the automatic irrigation hydroponic in the nursery did. The average percentage of flowering plants was 16% for 2-years-old seedlings, 36-38% for 3-years-old seedlings and 39-45% for 4-years-old seedlings. The average number of inflorescence in the flowering plants was 42 in the 2-years-old seedlings, and it increased with increase of age to 70-146 in 4-years-old seedlings. It was assumed that the average percentage of flowering plants would become to about 50% and the number of inflorescences of the flowering plants would become large enough for hybridization breeding 5 years after sowing, and this year could be designated as the year of flowering and fruit-bearing.

Afin de savoir combien il faut d'années pour qu'un jeune plant de mûrier commence à fleurir, après avoir été semé, on a observé la floraison de plants d'un an poussant en pépinière et celle de plants de 2 à 4 ans poussant en plein champ. L'année après le semis, aucun des mûriers n'a fleuri, ni en pépinière, ni en plein champ, mais certains plants cultivés en irrigation automatique en pépinière ont fleuri. Le pourcentage moyen de plants fleuris est 16 % pour les plants âgés de 2 ans, de 36 à 38 % pour les plants de 3 ans et de 39 à 45 % pour les plants de 4 ans. Le nombre moyen d'inflorescences est de 42 chez les plants de 2 ans, et augmente avec l'âge jusqu'à 76 à 146 chez les plants de 4 ans. On présume que le pourcentage moyen de plants fleuris sera d'environ 50 % et que le nombre d'inflorescences deviendra suffisamment important pour effectuer l'hybridation cinq ans après le semis, et cette année pourra donc être considérée comme année de floraison et de formation des fruits.

OKABE T.

Relationship between method of cultivation in the year of sowing and flowering about mulberry seedlings. (Relation entre la méthode de culture pendant l'année des semis et la floraison des jeunes plants de mûrier.)

J. Seric. Sci. Jpn., 1983, 52(5), p. 438-442. (J,j,e)

Two kinds of hybrid seeds of mulberry were sown in April, and their seedlings were cultivated in the greenhouse from May to autumn by water culture, or by sand or soil culture irrigated with culture solution. The growth of the seedlings, and the percentage of carbohydrates and nitrogen contained in the shoots were measured in August, September and October. Furthermore, the seedlings were placed in the hot greenhouse the following February to promote sprouting, and the number of inflorescences in the developing bud was counted. The seedlings grew well by all culture methods. The growth of the main shoot was slightly better in the seedlings grown by

sand or soil culture than by water culture. The percentage of carbohydrates and the C/N value in the shoots of the seedlings were higher in the seedlings grown by water culture than in those grown by sand or soil culture and 67% of the seedlings grown by water culture flowered, none of those grown by sand or soil culture did. These results show that water culture of the seedlings in the year they are sown increases the carbohydrate content and C/N value in the shoot, thus promoting flowering of the mulberry seedlings.

Deux sortes de graines hybrides de mûrier sont semées en avril, les semis sont cultivés sous serre de mai à l'automne, en culture hors-sol, ou en culture sur sable ou terre irriguée avec une solution de culture. La croissance des plants, et les pourcentages d'hydrates de carbone et d'azote contenus dans les plants sont mesurés en août, septembre et octobre. Les plants sont ensuite placés sous serre chaude au mois de février suivant pour activer le bourgeonnement, et le nombre d'inflorescences par bourgeon est compté. Les plants poussent bien avec toutes les méthodes culturales. La croissance de la tige principale est légèrement meilleure chez les plants cultivés dans le sable ou la terre que chez ceux cultivés hors-sol. Le pourcentage d'hydrates de carbone et le rapport C/N dans les tiges des plants sont plus élevés chez les plants cultivés hors-sol que chez ceux cultivés dans le sable ou la terre. Ces résultats montrent que la culture hors-sol des plants pendant l'année du semis provoque une augmentation du contenu en hydrates de carbone et du rapport C/N dans la tige, et donc favorise la floraison.

Sericultural Experiment Station, Yatabe, Ibaraki 305, Japan.

RAMARAO A.V., DESHPANDE V.H., SMASTRI R.K., TAVALE S.S., DHANESHWAR N.N.

Structure of albanols A & B, two novel phenols from *Morus alba* bark. (Structure des albanols A et B, deux nouveaux phénols provenant de l'écorce de *Morus alba*).

Tetrahedron letters, 1983, 24, p. 3013.

SHIKATA M., HOSHINO M., SHINJO T.

Implantation of the mulberry races of Southeast Asia in Research Institute of Tropical Agriculture, University of the Ryukus, and characteristics of these mulberry races. (Implantation de races de mûrier de l'Asie du Sud-Est à l'Institut de Recherches d'Agriculture Tropicale, Université de Ryukus, et caractéristiques de ces races)

Bull. Fac. Text. Sci., 1983, 10(2), p. 163-175. (J,e)

SHIOMI F., GOTO A., MURAKAMI Y., NAGI T., IMANISHI M., ATMARA A.

An increase in productivity of mulberry garden soils derived from volcanic ashes. 2) Differences in ameliorative measures and their improvement effects on soil. (Accroissement de la productivité des sols de jardin d'origine volcanique pour le mûrier 2) Différentes mesures d'amélioration et leurs effets sur le sol).

Sanshi Kenkyu, 1983, 124, p. 44-57.

SHIRATA A., TAKAHASHI K.

Detection of antifungal substances in root epidermis of mulberry *Morus alba*. (Détection de substances antifongiques chez l'épiderme de la racine du mûrier *Morus alba*).

Sanshi Shikenjo Hokoku, 1983, 28(6), p. 771-779. (J)

Mulberry

SHIRATA A., TAKAHASHI K., TAKASUGI M., NAGO S., ISHIKAWA S., UENO S., MUNOZ L., MASAMUNE T.

Antimicrobial spectra of the compounds from mulberry. (Spectres antimicrobiens des composants du mûrier).

Sanshi Shikenjo Hokoku, 1983, 28(6), p. 793-806. (J)

SUZUKI T., KOHNO K.

Nitrogen levels and free amino acids in mulberry stems during bud break. (Contenu en azote et acides aminés libres chez la tige de mûrier pendant le débourrement).

J. Seric. Sci. Japan, 1983, 52(5), p. 457-458. (J) short report

YASHIKI T.

Weed control by Kusagard in mulberry plantings. (Désherbage par Kusagard dans les plantations de mûrier).

Noyaku Jidai, 1983, 149, p. 5-10. (J)

ZAKARASHVILI I.N., PANCHENKO L.P., SKRIPAL I.G.

Genome size of the mycoplasma which induces Texas mulberry dwarf. (Taille du génome du mycoplasme qui provoque le nanisme du mûrier du Texas).

Mikrobiol. Zh., Kiev, 1983, 45(3), p. 49-52. (R)

BOMBYX ELEVAGE / BOMBYX REARING

DESCOURS J., KREMKY J., SZUBA M.

Results of comparative rearing experiments of Polish and foreign silkworm hybrids in 1978-1979. (Résultats de l'élevage comparatif des hybrides polonais et étrangers du ver à soie en 1978-1979.)

Prace Instytutu Krajowych Włókien Naturalnych, 1983, 28, p. 149-156. (Pl,pl,e,f,r)

In 1978 and 1979 comparative experimental rearings of silkworm hybrids produced at the Silk Research Station at Zolwin and at the Zootechnical Institute at Cracow as well as those from the Sericultural Institute in Bursa (Turkey), Sericultural Experiment Stations at Vratza and Harmanli (Bulgaria) have been made. The Japanese hybrid Shungetsu x Hosho has been reared as control.

The analyse deals with biological characters (hatchability, survival rate, length of larval period, cocoon weight, cocoon shell weight, silk richness, fresh cocoon crop per 1 gram of eggs, silk yield per 1 gram of eggs) and technological ones (filament length and its size, silk yield, recovery of silk).

In 1978 silk richness of the polyhybrids from Zolwin (23.4%) was equal to the Japanese (23.2%) but there was a difference in silk recovery: 2.22 kgs and 2.6 kgs respectively.

In 1979, cocoon crop per 1 gram of eggs of polyhybrids from Zolwin was higher (3.02 kgs) than of the control polyhybrid (2.72 kgs). The Japanese polyhybrid had a high silk richness (23.8%) and a lower silk recovery (1.99 kgs).

The Turkish polyhybrids were outstanding among others by their high biological and technological values.

En 1978 et 1979 on a effectué des élevages comparatifs des hybrides polonais produits à la Station de Recherches de la Soie de Zolwin et à l'Institut de Zootechnie de Cracovie, ainsi que des hybrides de l'Institut Séricicole de Bursa (Turquie) et des Stations Séricicoles de Vratza et Harmanli (Bulgarie). L'hybride japonais Shungetsu x Hosho fut élevé comme contrôle.

On a analysé les caractères biologiques (pourcentage d'éclosion, de survie des vers, durée de la période larvaire, poids du cocon et de la coque soyeuse, richesse soyeuse, récolte de cocons frais par gramme de graines, productivité de la soie par gramme de graine) et les caractères technologiques (longueur et titre du filament, rendement en soie, rentrée à la bassine).

En 1978, la richesse soyeuse chez les hybrides de Zolwin (23,4 %) était presque égale à celle de l'hybride japonais (23,2 %), mais il y avait une différence dans la rentrée à la bassine, qui était respectivement de 2,22 kg et 2,6 kg.

En 1979, la récolte fut plus élevée avec les polyhybrides de Zolwin (3,02 kgs) qu'avec le polyhybride témoin (2,72 kgs). Le polyhybride japonais se distingue par une richesse soyeuse élevée (23,8 %) et une plus faible rentrée à la bassine (1,99 kgs).

Les hybrides provenant de la Turquie se sont distingués des autres par leurs qualités biologiques et technologiques.

EKEGAMI T., EBIHARA T.

Control of infectious flacherie with sodium fumarate of Acridine orange. (Contrôle de la flacherie infectieuse au moyen du fumurate de sodium de l'Acridine orange).

Ibaraki-ken Sangyo, Shikenjo Hokoku, 1983, 37, p. 41-45. (J)

GAMO T.

Biochemical genetics and its application to the breeding of the silkworm. (Génétique biochimique et ses applications à la sélection du ver à soie).

J.A.R.Q., 1983, 16(4), p. 264-272. (E)

INAMORI Y., KATO Y., BABA K., MATSUYAMA Y., SAKAI M., KOZAWA M.

Mechanisms of insecticidal action of deoxypodophyllotoxin (Anthricin). 1) Distribution of deoxypodophyllotoxin in tissues of the 5th instar larvae of silkworm. (Mécanismes de l'action insecticide de la déoxypodophyllotoxine (Anthricine) 1) Distribution de la déoxypodophyllotoxine dans les tissus des larves de ver à soie au 5ème âge).

Chem. Pharm. Bull., 1983, 31, p. 4464.

KREMKY J.

Effect of heterosis in Polish single- and double-cross silkworm hybrids (*Bombyx mori* L.). (Effet de l'hétérosis chez les hybrides polonais de croisement simple ou double (*Bombyx mori* L.).)

Genetica Polonica, 1983, 24(1), p. 73-93. (E,e,pl,r)

Results of long-term experiments (1967-1978) dealing with breeding of mulberry silkworm hybrids in the Silk Research Station, Zolwin, and with their testing in other sericultural stations in Poland and abroad, are presented. The results have been analysed in view of manifestation of inbreeding depression in biotypes and effect of heterosis in main quantitative characters in silkworm hybrids. Inbreeding depression gives evidence for an advanced homozygosity of mulberry silkworm biotypes, obtained as a result of a long-term inbreeding. Sometimes the effect of heterosis appears as a result of mating of related subbiotypes within the biotype, and a slight effectiveness of selection in biotypes can be seen. Homozygosity was however incomplete. As the inbreeding advanced in the biotypes selected for crossing, no increase in inbreeding depression was revealed. A high level of hybrid traits was found. It was a result of a high general combining ability in the biotypes and of remarkable value of characters in some hybrids due to the specific combining ability. It was pointed out that the effect of heterosis was negligible, when both parents from different biotypes and their hybrids were reared under favourable environmental conditions, and it was more evident under unfavourable conditions. The level of traits in both Polish and Japanese silkworm hybrids was similar when they were reared in various geographic regions.

Nous donnons ici les résultats d'expériences à long terme (1967-1978) effectuées sur l'élevage d'hybrides du ver à soie du mûrier, à la Station de Recherches de la Soie de Zolwin, ainsi que dans d'autres stations séricicoles polonaises et étrangères. Ces résultats ont été analysés pour montrer l'abaissement de la consanguinité chez les biotypes et l'effet de l'hétérosis sur les principaux caractères quantitatifs chez les hybrides du ver à soie. L'abaissement de la consanguinité met en évidence une homozygotie développée des biotypes du ver à soie du mûrier obtenus par croisement à long terme. Parfois, l'effet de l'hétérosis semble être le résultat de l'accouplement de deux sous-biotypes d'un même biotype, et l'on peut voir une faible efficacité de la sélection chez les biotypes. L'homozygotie est cependant incomplète. Lorsque la consanguinité s'accroît chez les biotypes sélectionnés pour le croisement, on n'observe pas un plus fort abaissement de la consanguinité. On trouve de nombreuses caractéristiques hybrides : c'est le résultat d'une grande capacité de combinaison générale chez les biotypes et de la valeur remarquable des caractères chez certains hybrides grâce à la capacité de combinaison spécifique. On remarque que l'effet de l'hétérosis est négligeable lorsque les parents de différents biotypes et

leurs hybrides sont élevés dans un environnement favorable, et qu'il est plus apparent dans un environnement défavorable. La constante des caractères chez les hybrides de ver à soie japonais et les hybrides polonais est semblable et ne dépend pas de la région d'élevage.

Institute of Native Natural Fibers, Silk Research Station, Zolwin, 05 807 PODKOWA LESNA, Poland.

KREMKY J., SZUBA M.

Effect of biotype breeding on the value of mulberry silkworm hybrids in 1969-1979. (Effet de l'élevage des biotypes sur la valeur des hybrides du ver à soie du mûrier en 1969-1979.)

Prace Instytutu Krajowych Włókien Naturalnych, 1983, 28, p. 157-164. (Pl, pl, e, f, r)

The results of rearing Polish silkworm biotypes, simple hybrids and polyhybrids in succeeding cycles is presented. To reduce the deviations caused by seasonal influence and to estimate the genetic value of tested silkworms, a comparison of mean values in 5-years' overlapping periods has been made. The Japanese hybrid Hoshio x Shungetsu has been taken as standard.

A stabilisation of hatchability, survival rate, cocoon crop per 1 gram of eggs in Polish polyhybrids has been stated on a level approaching the Japanese standard. The cocoon weight and cocoon shell weight, that are factors of individual selection of biotypes, are also stabilized in polyhybrids on a high level in spite of inbreeding depression in biotypes. Silk richness increased along with filament length and silk yield, and caused a decrease of cocoon consumption in silk reeling.

A decrease of cocoon crop and cocoon quality in industrial rearings of both Polish and Japanese polyhybrids, has been observed as a result of a general lowering of rearing culture, caused by a lack of qualified silkworm rearers.

It has been decided to elaborate a model family rearing, suitable to actual economic conditions of the country.

On présente la comparaison des résultats des élevages des biotypes, des hybrides simples et des polyhybrides polonais du ver à soie en cycles successifs. Pour réduire les variations dues à l'influence des saisons et estimer la valeur génétique des vers à soie observés, on a employé la méthode de comparaison des valeurs moyennes pour des périodes quinquennales se chevauchant. L'hybride japonais Hoshio x Shungetsu a été pris comme standard.

On a constaté que les polyhybrides polonais se sont stabilisés au point de vue pourcentage d'éclosion, taux de survie, récolte de cocons par gramme de graines, et qu'ils se rapprochent de l'hybride japonais. Le poids du cocon et de la coque soyeuse, qui sont des critères pour la sélection individuelle des biotypes, sont aussi stabilisés à un haut niveau chez les hybrides, malgré la baisse de la consanguinité chez les biotypes. La richesse soyeuse augmente en rapport avec la longueur du filament et le rendement en soie, ce qui entraîne une baisse de la rentrée à la bassine.

Mais la récolte des cocons et leur qualité dans les élevages industriels des hybrides polonais, ainsi que de l'hybride japonais, diminuent à cause de la baisse de qualité dans les élevages, ceci étant dû au manque de qualification des sériciculteurs.

On a constaté la nécessité d'élaborer un modèle d'élevage familial adapté aux conditions économiques actuelles du pays.

KURISU K., YAMAMOTO H., NAKAO T.

Studies on the pebrine inspection of the mother moths in the silkworm, *Bombyx mori*, for the commercial eggs. 1) Computer-simulation by Monte-Carlo method. (Etude sur la détection de la pébrine chez les papillons femelles du ver à soie *Bombyx mori* pour la commercialisation des oeufs. 1) Simulation sur ordinateur par la méthode de Monte-Carlo).

Bull. Fac. Text. Sci., Kyoto, 1983, 10(2), p. 151-162. (J,e)

KUWAHARA Y., ADACHI S., TSUCHIDA N.

Bombykol content in female silkworm moth *Bombyx mori*: effect of age mating and body weight. (Contenu en bombykol chez le papillon femelle du ver à soie *Bombyx mori*: conséquence de l'âge au moment de l'accouplement et du poids corporel).

Appl. Entomol. Zool., 1983, 18, p. 182-190. (E)

MASUI H.*, MATSUBARA F.**

Influence of cobalt and nickel in diet on larval development of the silkworm *Bombyx mori*, under aseptic conditions. (Influence du cobalt et du nickel dans l'alimentation sur le développement des larves du ver à soie *Bombyx mori* élevées en milieu aseptique.)

J. Seric. Sci. Jpn., 1983, 52(5), p. 425-431. (J,j,e)

The larvae of the silkworm of the 1st, 3rd, or 5th instar were allowed to be fed aseptically with artificial diets containing various doses of cobalt (Co) or nickel (Ni) for 10 days, and the permissive concentration (without any growth inhibition) and 100% lethal concentration of these metals were determined. The permissive concentration of Co was below 50 ppm in the 1st instar, below 100 ppm in the 3rd instar, and below 4,000 ppm in the 5th instar. The 100% lethal concentration of Co was over 400 ppm in the 1st instar, over 1,000 ppm in the 3rd instar and over 6,000 ppm in the 5th instar. The permissive concentration of Ni was below 200 ppm in the 1st instar, below 300 ppm in the 3rd instar, and below 8,000 ppm in the 5th instar. The 100% lethal concentration of Ni was over 2,000 ppm in the 1st instar, over 3,000 ppm in the 3rd instar and over 10,000 ppm in the 5th instar. All of the larvae died by feeding Co or Ni exhibited the chronic intoxication.

Les larves des 1er, 3ème ou 5ème âge sont nourries sur aliment artificiel contenant différentes doses de cobalt (Co) ou de nickel (Ni), en milieu aseptique pendant 10 jours et on détermine la concentration tolérée (sans ralentissement de croissance) et la concentration de ces métaux qui est létale à 100 %. La concentration tolérée de Co est en-dessous de 50 ppm au 1er âge, en-dessous de 100 ppm au 3ème âge et en-dessous de 4 000 ppm au 5ème âge. La concentration de Co létale à 100 % est au-dessus de 400 ppm au 1er âge, au-dessus de 1 000 ppm au 3ème âge et au-dessus de 6 000 ppm au 5ème âge. La concentration tolérée de Ni est en-dessous de 200 ppm au 1er âge, au-dessous de 300 ppm au 3ème âge et au-dessous de 8 000 ppm au 5ème âge. La concentration de Ni létale à 100 % est au-dessus de 2 000 ppm au 1er âge, au-dessus de 3 000 ppm au 3ème âge et au-dessus de 10 000 au 5ème âge. Toutes les larves mortes par ingestion de Co ou Ni montrent une intoxication chronique.

* Kyoto Municipal Hiyoshigaoka High School, Higashiyamaku, Kyoto 605, Japan.

** Faculty of Textile Science, Kyoto University of Industrial Arts and Textile Fibers, Matsugasaki, Kyoto 606, Japan.

MATSUBARA F., GO Y., MORI H., OGASHIRA H.

Difference in the susceptibility of germfree silkworms at larval stages to the oral infection with nuclear polyhedrosis virus. (Différence dans la sensibilité à l'infection par le virus de la polyédrose nucléaire introduit par voie orale chez des vers à soie dépourvus de germes, selon le stade larvaire.)

J. Seric. Sci. Jpn., 1983, 52(5), p. 419-424. (J,j,e)

When the silkworms were administered orally with nuclear polyhedra, the susceptibility to nuclear polyhedrosis virus (NPV) varied at different stages, and the susceptibility increased with larval development. However, when administered orally with grassy juice (hemolymph of jaundice larva), the susceptibility of the silkworms to NPV decreased with growth from the 1st to the 3rd instars, but increased from the 4th to the 5th instars. No difference in the susceptibility to NPV was recognized between larvae reared under aseptic and non-aseptic conditions.

Lorsqu'on administre des polyédres nucléaires à des vers à soie, la sensibilité au virus (VPN) varie selon les stades et augmente avec le développement larvaire. Cependant, lorsqu'on administre par voie orale du liquide infecté de grasserie (hémo-lymphe de larves jaunies), la sensibilité des vers à soie au virus de la polyédrose nucléaire diminue avec la croissance du 1er au 3ème âge, mais augmente à partir du 4ème âge jusqu'au 5ème âge. On n'a pas trouvé de différence de sensibilité au VPN entre les larves élevées en milieu aseptique et celles élevées en milieu non-aseptique.

Faculty of Textile Science, Kyoto University of Industrial Arts & Textile Fibers, Matsugasaki, Kyoto 606, Japan.

MATSUMOTO T., NAGASAKA N.

Evaluation of presumptive and confirmative medium for estimation of intestinal streptococci in *Bombyx* larvae. (Essais d'un milieu présomptif et confirmatif pour l'évaluation des streptocoques intestinaux chez la larve de *Bombyx*.)

Bull. Fac. Text. Sci., Kyoto, 1983, 10(2), p. 197-203. (J,e)

MIYAJIMA S.*, WASHIDA S.*, KAWASE S.**

Inhibitory effect of guanidine on the incidence of infectious flacherie in the silkworm, *Bombyx mori*, reared on artificial diet. (Effet inhibiteur de la guanidine sur l'apparition de la flacherie infectieuse chez le ver à soie *Bombyx mori* élevé sur aliment artificiel.)

J. Seric. Sci. Jpn., 52(5), p. 390-393. (J,j,e)

It was reported in an earlier paper that the progression of the flacherie caused by infectious flacherie virus (IFV) inoculation was inhibited markedly when the silkworm larvae were fed with aqueous solution of 0.01% guanidine hydrochloride (GH), but the inhibitory effect of GH disappeared when IFV inoculated larvae were reared on an artificial diet. In order to clarify the reason, several different artificial diets from which was removed one component of the basal composition, were used. When an artificial diet without gallic acid was used, the inhibitory effect of GH was recovered. In the case where a diet including GH and without gallic acid was applied to the IFV-inoculated larvae, the incidence of flacherie was inhibited markedly. From these results, it was suggested that gallic acid was a main factor participating in the disappearance of the inhibitory effect of GH on the incidence of flacherie of the silkworm.

On a rapporté dans un article antérieur que la progression de la flacherie cau-

sée par inoculation du virus de la flacherie infectieuse (VFI) est fortement inhibée quand on administre aux larves une solution aqueuse de 0,01 % de chlorhydrate de guanidine (GH), mais que l'effet inhibiteur du GH disparaît lorsque les larves inoculées avec le VFI sont élevées sur aliment artificiel. Pour en trouver la raison, on a utilisé plusieurs régimes alimentaires différents dans lesquels on a enlevé un composant du mélange initial. Quand on utilise un aliment artificiel sans acide gallique, l'effet inhibiteur du GH réapparaît. Lorsqu'on utilise un aliment contenant du GH et sans acide gallique, l'apparition de la flacherie est fortement inhibée. Ces résultats indiquent que l'acide gallique est un facteur principal de la disparition de l'effet inhibiteur du GH sur l'apparition de la flacherie du ver à soie.

* *Aichi-ken Agricultural Research Center, Nagakute, Aichi 480 11, Japan.*

** *Faculty of Agriculture, Nagoya University, Nagoya 464, Japan.*

PETKOV N., YOLOV A.

Evaluation of biological and technological characters of some Polish silkworm polyhybrids (*Bombyx mori* L.) reared in Bulgaria. (Evaluation des caractères biologiques et technologiques des hybrides polonais du ver à soie (*Bombyx mori* L.) élevés en Bulgarie.)

Prace Instytutu Krajowich Wlokiem Naturalnych, 1983, 28, p. 165-170. (Pl,p1,e,f,r)

Continuing sericultural cooperation, comparative rearing experiments with Polish silkworm polyhybrids M-202, M-203, M-204 and M-205 have been made in 1978 and 1979 at the Sericultural Experiment Station at Vratza (Bulgaria). The Japanese hybrid J-124 x G-122 and Bulgarian hybrid Super-1 x Super-2 have been reared as control.

Polish polyhybrids revealed a comparatively high hatchability (96.88-97.75%) and survival rate (90.17-90.35%). Cocoon crop per 1 gram of eggs amounted 3.041-3.070 kgs while it was 3.083 kgs for the Bulgarian hybrid Super-1 x Super-2 and 3.373 kgs for the Japanese hybrid J-124 x G-122. Silk richness was high (52.03-53.31%), silk yield 41.72-44.22% and filament length 1318-1347 m. Quality of raw silk reeled from Polish cocoons has been nearly the same as control.

Dans le cadre d'une coopération séricicole, on a effectué à la Station Séricicole Expérimentale de Vratza (Bulgarie) en 1978 et 1979, des élevages comparatifs des hybrides polonais du ver à soie M-202, M-203, M-204 and M-205 avec l'hybride japonais J-124 x G-122 et l'hybride bulgare Super-1 x Super-2 comme contrôle.

Les polyhybrides polonais se sont distingués par un haut pourcentage d'éclosion (96,88-97,75 %) et de survie des vers (90,17-90,35 %). La récolte de cocons par gramme de graines est de 3,041 à 3,070 kg, tandis qu'elle est de 3,083 kg chez l'hybride bulgare et de 3,373 kg chez l'hybride japonais. La richesse soyeuse est élevée (52,03-53,31 %), le rendement en soie est de 41,72-44,22 % et la longueur du filament, de 1 318 à 1 347 m. La qualité de la soie grège ne diffère pas de celle du témoin.

Sericultural Experiment Station, Karl Marx 24, Vratza, Bulgaria.

SATO Y., SUGIYAMA H.

Toxicity of Prothiophos to silkworm larvae and its residue on mulberry leaves. (Toxicité du Prothiophos envers les larves de ver à soie et son résidu sur les feuilles de mûrier.)

J. Seric. Sci. Jpn., 1983, 52(5), p. 383-389. (J,j,e)

Toxicity of an organic phosphorous insecticide, Prothiophos (Tokuthion B, O-2, 4-dichlorophenyl O-ethyl S-propyl phosphorodithioate) to silkworm larvae was studied

by the topical administration. The LD_{50} values ($\mu\text{g/g}$ of body weight) were 133 to 182 in the 3rd or 4th instar, and 27 to 46 in the 5th instar larvae, respectively, showing that 5th instar larvae were more sensitive to Prothiophos. Besides, a lot of hours were required till the toxic symptom by the chemical appeared. When the larvae were fed with the mulberry leaves collected at 15 or 19 days after the treatment with the diluted solution of the emulsifiable concentrate (45%) or the dust (2%) of the chemical, they grew normally and made a cocoon of good quality. And also, the residue of the chemical on the mulberry leaves was detectable at the concentration of 0.69 (15 days, emulsifiable concentrate) or 0.89 ppm (19 days, dust). On the other hand, when the dust (3%) of the chemical was treated to the pot soil, it was almost not absorbed by the mulberry even at 6 to 24 days after the treatment. Therefore, the silkworm grew healthy when reared with the mulberry leaves treated. Two decomposed products from Prothiophos were observed in most of the leaves treated with the chemical.

La toxicité d'un insecticide organique phosphorique, le Prothiophos (Tokuthion O , O-2, 4-dichlorophényl O-éthyl S-propyl phosphorodithioate) sur les larves de ver à soie est étudiée par administration locale. Les valeurs LD_{50} ($\mu\text{g/g}$ de poids corporel) sont de 133 à 182 aux 3ème et 4ème âges, et de 27 à 46 au 5ème âge, et montrent que les larves du 5ème âge sont plus sensibles au Prothiophos. D'autre part, un temps très long est requis pour que le symptôme de toxicité apparaisse. Quand les larves sont nourries avec les feuilles de mûrier cueillies 15 ou 19 jours après avoir été traitées avec une solution diluée du concentré (45 %) ou de la poudre (2 %), elles se développent normalement et font un cocon de bonne qualité. Le résidu du composant chimique sur les feuilles de mûrier est détectable à la concentration de 0,69 (15 jours, concentré émulsifiable) ou 0,89 ppm (19 jours, poudre). D'un autre côté, lorsque la poudre (3 %) est appliquée à la terre du pot, elle n'est pratiquement pas absorbée par le mûrier, même 6 à 24 jours après le traitement. Les vers à soie se développent donc normalement lorsqu'ils sont élevés avec des feuilles de mûrier traitées. Deux produits de décomposition du Prothiophos sont observés dans la plupart des feuilles traitées avec ce produit chimique.

Sericultural Experiment Station, Yatabe, Tsukuba-gun, Ibaraki 305, Japan.

SEKI H.*, IWASHITA Y.**

Histopathological features and pathogenicity of a densovirus of the silkworm *Bombyx mori*, isolated from sericultural farms in Yamanashi prefecture. (Aspects histopathologiques et pathogénicité d'un virus de la denso-nucléose du ver à soie *Bombyx mori*, provenant de magnaneries de la préfecture de Yamanashi.)

J. Seric. Sci. Jpn., 1983, 52(5), p. 400-405. (J,j,e)

A virus isolated from diseased silkworm larvae collected at sericultural farms in Yamanashi prefecture caused a high larval mortality in two hybrids of silkworm strains employed. Electron and light microscopic observations of the midgut epithelium of the diseased larvae showed the aggregation of a great number of spherical virions, 20 nm in diameter, in the infected nuclei of columnar cells, replacing completely the whole nuclear materials. In addition, the infected nuclei became hyper-trophied and showed strongly Feulgen positive reaction and methyl green staining. The present observations suggest that the newly isolated virus belongs to the group of densovirus, and this was designated as "Yamanashi isolate".

Un virus isolé à partir de larves de ver à soie malades collectées dans des magnaneries de la préfecture de Yamanashi a causé une mortalité élevée chez des larves de deux souches hybrides utilisées. L'observation en microscopie électronique et optique de l'épithélium de l'intestin moyen des larves atteintes montre l'aggrégation

tion d'un grand nombre de virions sphériques, de 20 nm de diamètre, dans les noyaux infectés des cellules en colonne, qui ont pris la place de toute la matière nucléaire. De plus, les noyaux infectés deviennent hypertrophiés et montrent une forte réaction positive par coloration au Feulgen et au vert de méthyl. Ces observations suggèrent que le virus nouvellement isolé appartient au groupe des virus de la densonucléose, et celui-ci a été appelé "isolat de Yamanashi".

* *Yamanashi-Ken Sericultural Experimental Station, Futaba, Yamanashi 407 01, Japan.*

** *Faculty of Agriculture, Utsunomiya University, Utsunomiya 321, Japan.*

YAMADA M., NAKAMURA K., INOKUCHI T.

Effects of diets on the content of free amino acids and urea in the cocoon shell of the silkworm *Bombyx mori*. (Conséquences du régime alimentaire sur la teneur en acides aminés libres et en urée de la coque soyeuse chez le ver à soie *Bombyx mori*).

Nippon Oyo Dobutsu Konchu Gakkaishi, 1983, 27(1), p. 46-51. (J)

BOMBYX BIOLOGY / BOMBYX BIOLOGY

AGALYKOV N., KULLYEV P., GAUZEJ G.G.

Virus-specific DNA level in the course of the infection of *Bombyx mori* caterpillars by nuclear polyhedrosis virus. (Niveau du DNA viral spécifique au cours de l'infection des chenilles de *Bombyx mori* par le virus de la polyédrose nucléaire).

Dokl. Akad. Nauk. SSSR, 1983, 269(5), p. 1226-1228. (R)

BOCK S.G., TIEMEIER D.C., MESTER K., GOLDSMITH M.R.

Differential patterns in the temporal expression of *Bombyx mori* chorion genes. (Profils différentiels dans l'expression temporelle des gènes du chorion de *Bombyx mori*).

W Roux's Arch. Dev. Biol., 1983, 192, p. 222. (E)

COUBLE P., MOINE A., GAREL A., PRUDHOMME J.C.

Developmental variations of a non-fibroin mRNA of *Bombyx mori* silk gland, encoding for a low molecular weight silk protein. (Variations au cours du développement d'un mRNA non-fibroïne de la glande séricigène de *Bombyx mori*, codant pour une protéine soyeuse de faible poids moléculaire).

Dev. Biol., 1983, 97, p. 398. (E)

CHARIB B., DE REGGY M.

Changes in ecdysteroid and juvenile hormone levels in developing eggs of *Bombyx mori*. (Variations des quantités d'ecdystéroïdes et d'hormone juvénile chez les oeufs en développement de *Bombyx mori*.)

J. Insect Physiol., 1983, 29(12), p. 871-876. (E,e)

It is well known that insect eggs can contain very high concentrations of ecdysteroids, which undergo drastic changes during embryogenesis. We found that this is equally valid for juvenile hormones. Three juvenile hormone-immunoreactive compounds were observed in developing *Bombyx mori* eggs. They were assumed to be juvenile hormones 1, 2 and 3 according to their retention time in HPLC. These hormones underwent drastic and sudden changes. In the space of one day their concentration was seen to rise rapidly from an undetectable level up to as high as 4×10^{-6} micromoles per mg of eggs. Their presence was detected as early as the first day of embryonic development, as well as during the blastokinesis period (day 5 to day 9) and in late embryos (day 12 to day 14). Their relative concentrations varied greatly. On two occasions, day 1 and day 8, all three hormones were simultaneously present. Moreover, juvenile hormone 3 was present during the blastokinesis period, either alone or in combination with hormone 2. The latter was the only hormone present in late embryos, before hatching. Thus, with regard to both ecdysteroids (ecdysone and 20-hydroxyecdysone) and juvenile hormones, each day of embryonic development displayed a different hormonal pattern. These patterns undoubtedly constitute a "hormonal code" of embryogenesis control. While 20-hydroxyecdysone can be assumed to trigger cuticulogenesis in embryos as it does in larvae, the effects of the other hormones as well as their possible interactions are questionable.

Il est bien connu que les oeufs des insectes peuvent contenir des concentrations très élevées d'ecdystéroïdes qui subissent d'importants changements au cours de l'embryogenèse. Nous avons découvert que c'est également le cas pour les hormones juv-

niles. Trois composés d'hormone juvénile immunoréactifs ont été observés chez les oeufs de *Bombyx mori* au cours du développement. Leur temps de rétention en HPLC nous permet de supposer qu'il s'agit des hormones juvéniles 1, 2 et 3. Ces hormones subissent des changements brutaux et importants. En l'espace d'une journée, leur concentration passe rapidement d'un niveau indécidable à 4×10^{-6} micromoles par mg d'oeuf. Leur présence est décelable le 1er jour du développement embryonnaire, pendant la blastocinèse (du 5ème au 9ème jour) et également chez les embryons à un stade plus avancé (du 12ème au 14ème jour). Leur concentration relative varie considérablement. En deux occasions, le 1er et le 8ème jour, les trois hormones sont présentes simultanément. De plus l'hormone juvénile 3 est présente pendant la blastocinèse, soit seule, soit avec l'hormone 2. Cette dernière est la seule présente avant l'éclosion chez les embryons avancés. Ainsi, pour ce qui est des ecdystéroïdes (ecdysone et 20-hydroxyecdysone) et des hormones juvéniles, à chaque jour du développement embryonnaire correspond un schéma hormonal différent. Ces schémas constituent sans aucun doute un "code hormonal" pour le contrôle de l'embryogenèse. Alors que l'on suppose que la 20-hydroxyecdysone déclenche la cuticulogenèse, chez les embryons comme chez les larves, la question reste posée en ce qui concerne les effets des autres hormones et leurs interactions.

Centre d'Immunologie INSERM-CNRS de Marseille-Luminy, case 906, 13288 Marseille cedex 9, France.

GHARIB B.*, DE REGGY M.*, CONNAT J.-L.***, CHAIX J.-C.***

Ecdysteroid and juvenile hormone changes in *Bombyx mori* eggs, related to the initiation of diapause. (Variations en ecdystéroïde et en hormone juvénile liées à l'initiation de la diapause chez les oeufs de *Bombyx mori*.)

FEBS Letters, 1983, 160(1-2), p. 119-123. (E,e)

We describe a method for the routine determination of changes in juvenile hormone levels in insect eggs. The hormones are first converted into their diol derivatives, then they are purified from other lipids and separated by high-performance liquid chromatography (HPLC). The radioimmunoassay of the fractions was then determined. The method permits the simultaneous assay of ecdysteroids, and it was used for determining the hormonal changes in *Bombyx* eggs during the pre-diapause development. Our major finding is that the hormonal content of eggs dramatically increased prior to the initiation of diapause. This hormonal rise included ecdysone, 20-OH-ecdysone and 3 juvenile hormones. The HPLC retention time of the latter corresponded to JH₁, JH₂ and JH₃. Subsequently, the embryos entered diapause and the hormonal content of eggs was reduced to traces of ecdysteroids. These dramatic changes in juvenile hormone levels during early embryogenesis raise a number of issues which are developed in the discussion.

Nous avons décrit une méthode pour déterminer les variations de niveaux d'hormone juvénile dans les oeufs des insectes. Les hormones sont d'abord converties en dérivés de diol, elles sont ensuite purifiées des autres lipides puis séparées par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Le dosage radioimmunologique des fractions est ensuite effectué. La méthode permet de faire le dosage simultané des ecdystéroïdes, et a été utilisée pour déterminer les changements hormonaux intervenus dans les oeufs de *Bombyx* pendant le développement pré-diapause. Notre principale découverte montre que la quantité d'hormone contenue dans les oeufs augmente fortement avant le début de la diapause. Cette montée hormonale comprend l'ecdysone, la 20-OH-ecdysone et 3 hormones juvéniles. Le temps de rétention en HPLC de ces derniers correspond à JH₁, JH₂ et JH₃. De ce fait, les embryons sont entrés en diapause et la quantité d'hormone contenue dans les oeufs s'est réduite à des traces d'ecdystéroïdes. Ces changements importants dans la quantité d'hormone juvénile au début de

l'embryogenèse soulèvent un certain nombre de questions qui sont développées dans la partie discussion.

* Centre d'Immunologie, Case 906, 13288 Marseille Cedex 9, France.

** Laboratoire de Zoologie, Boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France.

*** Laboratoire de Zoologie Marine, Faculté des Sciences, St Jérôme, 13397 Marseille Cedex 9, France.

GNATZY W., MOHREN W., STEINBRECHT R.A.

Pheromone receptors in *B. mori* and *A. pernyi*. 2) morphogenetic analysis. (Récepteurs de la phéromone chez *B. mori* et *A. pernyi*. 2) analyse morphogénétique.)

Cell & Tissue Res., 1984, 235, p. 35-42.

GOTO R., MORISAKI M., IKEKAWA N.

Biological properties of 20-isocholesterol. (Propriétés biologiques du 20 isocholestérol).

Chem. Pharm. Bull., 1983, 31, p. 3528-3533. (E)

GOWDA S., SRIDHARA S.

Monoclonal antibody to RNA polymerase I of the silkworm. (Anticorps monoclonal de l'ARN polymérase I du ver à soie.)

J. Biol. Chem., 1983, 258(23), p. 14532-14538. (E,e)

RNA polymerase I has been purified from the silk glands of the silkworm and antibodies obtained from immunized BALB/C mice. Hybridomas were obtained by fusing spleen cells from the same mice with SP-2/O cells. One of the cloned hybridomas was injected into mice to produce ascitic fluid. Both polyclonal and monoclonal antibodies were characterized for their reactivity with polymerase I by double immunodiffusion, enzyme-linked immunosorbent assay, and enzyme inhibition. The monoclonal antibody is active even at 1:100,000 dilution, is specific for the second largest subunit of RNA polymerase I, and does show some cross-reactivity with polymerases II and III. The monoclonal antibody when coupled to Sepharose binds polymerase I from crude extracts, and the bound polymerase I can be eluted. This antibody has been employed to localize RNA polymerase to the nuclei of *Chironomus* salivary glands. This and other monoclonal antibodies will be of considerable help as probes for the study of structure and function of RNA polymerases during active transcription.

L'ARN polymérase a été purifié à partir des glandes séricigènes du ver à soie et des anticorps ont été obtenus à partir de souris immunisées BALB/C. Des hybridomes sont obtenus en fusionnant des cellules de la rate de ces mêmes souris avec des cellules SP-2/O. L'un des hybridomes clonés est injecté aux souris pour produire du liquide ascitique. Les anticorps polyclonaux et les anticorps monoclonaux sont caractérisés par leur réactivité à la polymérase I en double immunodiffusion, par dosage ELISA et par inhibition des enzymes. L'anticorps monoclonal est encore actif à la dilution de 1/100 000, est spécifique de la deuxième sous-unité de l'ARN polymérase I et ne montre pas de réactivité croisée avec les polymérases II et III. L'anticorps monoclonal, lorsqu'il est couplé au Sepharose, fixe la polymérase I à partir des extraits bruts, et la polymérase I liée peut être éluée. Cet anticorps a été employé pour localiser l'ARN polymérase dans les noyaux des glandes salivaires de *Chironomus*. Celui-ci ainsi que d'autres anticorps monoclonaux seront très utiles, employés comme

sondes pour l'étude de la structure et la fonction des ARN polymérases pendant la phase active de la transcription.

Department of Biochemistry, Texas Tech Health Sciences Center, Lubbock, Texas 79430, U.S.A.

HAMADA N., KOGA K., HAYASHI K.

Effects of a large dose of ecdysteroid on development of ovary in *Bombyx* pupae. (Effets d'une forte dose d'ecdystéroïde sur le développement de l'ovaire chez les chrysalides du *Bombyx*).

J. Fac. Agric. Kyushu Univ., 1983, 28(1), p. 23-30. (E)

HAMODRAKAS S.J., PAULSON J.R., RODAKIS G.C.

X-ray diffraction studies of a silkworm chorion. (Etude par diffraction aux rayons-X du chorion de ver à soie).

Int. J. Biological Macro molecules, 1983, 5, p. 149.

HAYASHIYA K., NISHIDA J., UCHIDA Y.

Comparative experiments with the silkworm larvae reared on mulberry leaves and artificial diets. III) the biosynthesis of anti-viral red fluorescent protein in vitro and in vivo. (Expériences comparatives utilisant les larves de ver à soie élevées avec des feuilles de mûrier ou avec aliment artificiel. III) biosynthèse de la protéine fluorescente rouge anti-virale in vitro et in vivo).

Bull. Fac. Text. Sci., Kyoto, 1983, 10(2), p. 177-196. (J,e)

HE S., YI Y.

Absorption and excretion of the tritium labelled insect juvenile hormone analog 738 in the silkworm *Bombyx mori*. (Absorption et excrétion de l'analogue 738 d'hormone juvénile marqué au tritium chez le ver à soie *Bombyx mori*).

Kunchong Xuebao, 1983, 26, p. 121-129. (C)

INOKUCHI T., YAMADA M.

Effect of diet on the excretion and degradation of urea in the silkworm *Bombyx mori*. (Effet du régime alimentaire sur l'excrétion et la dégradation de l'urée chez le ver à soie *Bombyx mori*).

Nippon Oyo Dobutsu Konchu Gakkaishi, 1983, 27(3), p. 171-175. (J)

ISHIZAKI H., SUZUKI A., MORIYA I., MIZOGUCHI A., FUJISHITA M., OOKA H., KATAOKA H., ISOGAI A., NAGASAWA H., SUZUKI A.

Prothoracicotropic hormone bioassay : pupal-adult *Bombyx* assay. (Dosage biologique de l'hormone prothoracicotrope : dosage par préimago de *Bombyx*).

Dev. Growth Diff., 1983, 25, p. 585.

ISHIZAKI H., MIZOGUCHI A., FUJISHITA M., SUZUKI A., MORIYA I., OOKA H., KATAOKA H., ISOGAI A., NAGASAWA H., TAMURA S., SUZUKI A.

Species specificity of the insect prothoracicotropic hormone (PTTH) : the presence of *Bombyx* and *Samia* specific PTTH in the brain of *Bombyx mori*. (Spécificité liée à

l'espèce de l'hormone prothoracicotrope des insectes (PTTH) : présence de PTTH spécifique du *Bombyx* et de *Samia* chez le cerveau de *Bombyx mori*.

Dev. Growth Diff., 1983, 25, p. 593.

KAFATOS F.C.

Structure, evolution and developmental expression of the chorion multigene families in silkworm and drosophila. (Structure, évolution et expression au cours du développement des familles multigéniques du chorion chez les vers à soie et la drosophile).

Gene structure and regulation in development, 1983, Ed. S. Subtelny., p. 33-64.

KIGUCHI K., FUJIMAKI T.

Effect of juvenile hormone on the expression of characters in the silkworm, especially on the interrelation among various characters. (Effet de l'hormone juvénile sur l'expression des caractères chez le ver à soie, en particulier sur l'interrelation entre les différents caractères).

Sanshi Kenkyu, 1983, 124, p. 88-98. (J)

KIM J.H., PARK K.H., KIM Z.V.

A study on the lipid components of silkworm pupae. (Etude des composants lipidiques des chrysalides de ver à soie).

Hanguk Nonghwa Hakhoe Chi, 1983, 26(2), p. 90-96. (K)

KRAPIVINSKII G.B., MASLOV A.A.

Phosphorylatable proteins in the olfactory sensilla of the silkworm. (Protéines phosphorylables chez les sensilles olfactives du ver à soie).

Fiz. Khim. Osn. Funkst. Kletok, ed. by Gaziev (A.I.), Akad. Nauk. SSR, 1983, p. 102-111.

LIN S., NJAA L.R., EGGUM B.O., SHEN H.

Chemical and biological evaluation of silkworm chrysalid protein. (Evaluation biologique et chimique de la protéine de chrysalide du ver à soie).

J. Sci. Food Agric., 1983, 34, p. 896-900. (E)

MINE E., IZUMI S., KATSUKI M., TOMINO S.

Developmental and sex dependent regulation of storage protein synthesis in the silkworm *Bombyx mori*. (Régulation liée au développement et liée au sexe de la synthèse des protéines de réserve chez le ver à soie *Bombyx mori*).

Dev. Biol., 1983, 97, p. 329.

NAGASAWA H., KATAOKA H., HORI Y., ISOGAI A., TAMURA S., SUZUKI A., GUO F., ZHONG X., MIZOGUCHI A., FUJISHITA M., TAKAHASHI S.Y., ONISHI E., ISHIZAKI H.

Isolation and some characterization of the prothoracicotropic hormone from *B. mori*. (Isolement et caractérisation partielle de l'hormone prn thoracicotrope de *B. mori*).

General & Comp. Endocrinology, 1984, 53, p. 143.

NIKONOV A.A., KRAPIVINSKII G.B.

Olfactory receptors of the male silkworm moth. Electrophysiological aspects. (Récepteurs olfactifs du papillon mâle du ver à soie. Aspects électrophysiologiques).

Fiz. Khim. Osn. Funkst. Kletok (ed. by Gaziev (A.I.)), Akad. Nauk. SSR, 1983, p. 99-102. (R)

NISHITSUTSUJI-UWO J., NISHIMURA M.S.

Partial purification and properties of prothoracicotropic hormone (PTTH) from developing adult brains of the silkworm *Bombyx mori*. (Purification partielle et propriétés de l'hormone prothoracicotrope (PTTH) du cerveau du ver à soie *Bombyx mori* en cours de développement.)

Insect Biochem., 1984, 14(2), p. 127-133. (E,e)

The extraction and purification of prothoracicotropic hormone (PTTH) from brains of the developing adults of *Bombyx mori* are described. One brain contained about 40 *Samia* units of PTTH. Sixty-five thousand brains were processed through a nine-step procedure that included heat treatment, phenol extraction, repeated gel filtration and ion-exchange chromatography to produce a highly active preparation in 56% yield, which initiated adult development of a debrained *Samia* pupa at a dose of 4 ng. Although the purification was achieved only by 683-fold at the step 9, the purity of the PTTH preparation seemed to correspond to a 43,000-fold purification of the PTTH preparation when started from the whole adult head.

The mol. wt of the PTTH was estimated to be 5000 or less and the isoelectric point was approx. pH 4.4. The PTTH-preparation was inactivated by the treatment of proteases such as Nagarse, pepsin and thermolysin, indicating its peptidal nature.

Nous avons décrit l'extraction et la purification de l'hormone prothoracicotrope (PTTH) du cerveau du ver à soie *Bombyx mori* en cours de développement. Un cerveau contient environ 40 unités *Samia* de PTTH. Soixante cinq mille cerveaux ont été utilisés à travers 9 étapes telles que traitement par la chaleur, extraction du phénol, filtration répétée sur gel et chromatographie par échange d'ion afin de produire une préparation très active d'un rendement de 56 %, qui déclenche le développement adulte d'une chrysalide décérébrée de *Samia* à la dose de 4 ng. Bien que la purification soit de 683 fois à l'étape 9, la pureté de la préparation de PTTH semble correspondre à une purification de PTTH de 43 000 fois lorsqu'elle démarre à partir de la tête entière de l'adulte.

Le poids moléculaire de la PTTH est estimé à 5000 maximum et le point isoélectrique à un pH approximatif de 4,4. La préparation de PTTH est désactivée par le traitement aux protéases telles que Nagarse, la pepsine et la thermolysine, ce qui indique sa nature peptidique.

Shionogi Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd., Fukushima-ku, Osaka, 533 Japan.

OSANAI M.

Lifespan and protein synthesis in several *Bombyx mori* mutants with genetic abnormalities in amino acid and protein metabolism. (Espérance de vie et synthèse des protéines chez plusieurs mutants de *Bombyx mori* présentant des anomalies dans le métabolisme des protéines et des acides aminés).

Experimental Gerontology, 1983, 18, p. 383.

SAKURAI S.

Temporal organization of endocrine events underlying larval-larval ecdysis in the silkworm *Bombyx mori*. (Organisation temporelle des événements endocriniens sous-jacents à l'ecdysis larvo-larvaire).

J.I.P., 1983, 29, p. 919.

SEHNAL F.

Juvenile hormone analogs. (Analogues de l'hormone juvénile).

Endocrinology of Insects, 1983, p. 657-672. (E)

SHINBO H.

Utilization and metabolism of sulfur containing amino acids in the silkworm. (Utilisation et métabolisme des acides aminés contenant du soufre chez le ver à soie).

Kagaku to Seibutsu, 1983, 21, p. 290-291. (J)

STEINBRECHT R.A., GNATZY W.

Pheromone receptors in *Bombyx mori* and *Antheraea pernyi*. 1) reconstruction of the cellular organization of the *sensilla trichodea*. (Récepteurs de la phéromone chez *Bombyx mori* et *Antheraea pernyi*. 1) reconstruction de l'organisation cellulaire des *sensilla trichodea*.

Cell & Tissue Research, 1984, 235, p. 25-34.

TAKAHASHI S.-Y.

Ovarian protein kinases and endogenous substrates from the silkworm, *Bombyx mori*. (Protéines kinases ovariennes et substrats endogènes chez le ver à soie *Bombyx mori*.)

Insect Biochem., 1984, 14(2), p. 219-229. (E,e)

The phosphorylating activity of ovarian proteins was identified and partially purified from ovaries of *Bombyx mori* after extraction with a high concentration of salt. At least three species of protein kinase activities were detected in the ovary, which were designated kinases A, B₁ and B₂ in the present experiments. Both kinases A and B₂ were activated by low concentrations of cAMP and converted to small catalytic units in the presence of cAMP. The results indicated that the kinases were cAMP-dependent enzymes. Another minor protein kinase activity (kinase B₁) has not been characterized because of its weak activity and instability. Kinases A and B₂ have properties which resembled type-11 cAMP-dependent protein kinases, but slight differences from each other existed, such as the apparent K_m for cAMP, elution points from DEAE-cellulose column and substrate specificity.

Incubation of ovarian extract of silkworm with [γ -³²P]-ATP and Mg²⁺ led to the formation of three major ³²P-labelled proteins with molecular weights of 40,000, 80,000 and about 200,000, estimated by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of SDS. They corresponded to the subunits of vitellin and another unidentified protein of molecular weight 80,000.

The results suggest that vitellin may be a principal endogenous substrate of ovarian protein kinases.

L'activité phosphorylante des protéines ovariennes a été identifiée et partiellement purifiée par extraction à de fortes concentrations salines. Au moins trois types d'activité protéine kinase, désignées A, B₁ et B₂, ont été décelées dans

l'ovaire. Les kinases A et B₂ sont activées par de faibles concentrations de AMP cyclique et se convertissent en petites unités catalytiques en présence de AMP cyclique. Les résultats indiquent que les kinases sont des enzymes dépendant de l'AMP cyclique. Une autre activité mineure de la kinase (kinase B₁) n'a pas été étudiée à cause de sa faible importance et de son instabilité. Les kinases A et B₂ ont des propriétés qui ressemblent à celles de la protéine-kinase dépendant de l'AMP cyclique de type II, mais de légères différences existent entre elles, comme le K_a apparent pour l'AMP cyclique, les points d'élu-tion sur la colonne de DEAE-cellulose et la spécificité du substrat.

L'incubation de l'extrait d'ovaire du ver à soie avec [γ -³²P]-ATP et Mg²⁺ conduit à la formation de trois protéines majeures marquées au ³²P ayant des poids moléculaires de 40 000, 80 000 et environ 200 000 estimés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. Elles correspondent aux sous-unités de la vitelline et à une autre protéine non-identifiée d'un poids moléculaire de 80 000.

Ces résultats suggèrent que la vitelline peut être un substrat endogène principal des protéines kinases ovariennes.

Biological Institute, Faculty of Science, Nagoya University, Nagoya 464, Japan.

TAKESUE S.*, ONITAKE K., KEINO H., TAKESUE Y.

Immunocytochemical location of vitellin in the egg of the silkworm, *Bombyx mori*, during early developmental stages. (Localisation immunocytochimique de la vitelline chez l'oeuf du ver à soie *Bombyx mori*, aux premiers stades du développement.)

Roux's Arch. Dev. Biol., 1983, 192, p. 113-119. (F,e)

Vitellin was purified from eggs of the silkworm, *Bombyx mori*, by a new method in which vitellin was extracted from isolated yolk granules. The purified vitellin had a molecular weight of 540,000. An antibody against purified vitellin was prepared in rabbits. It reacted with the hemolymph vitellogenin as well as with purified vitellin, but not with other proteins in the hemolymph or in the extract from yolk granules. The anti-vitellin IgG was used to immunocytochemically locate vitellin in the *Bombyx* non-diapause egg during early developmental stages. In the egg, just after oviposition, vitellin was located in internal yolk granules and in small yolk granules of the periplasm. During the early developmental stages studied, vitellin was not metabolized uniformly throughout the egg. The vitellin of the internal yolk granules located at the posterior-dorsal part and of the small peripheral yolk granules was utilized in 16 h and 2 days, respectively, after oviposition. A thin, very vitellin-poor layer was located between the periplasm and the vitellin-rich interior in the newly laid egg. It was always in close contact with the periphery where blastoderm and germ-band cells developed.

La vitelline a été purifiée à partir des oeufs du ver à soie *Bombyx mori* grâce à une nouvelle méthode, la vitelline étant extraite à partir de granules de vitellus isolés. La vitelline purifiée a un poids moléculaire de 540 000. Un anticorps contre la vitelline purifiée a été préparé chez des lapins. Cet anticorps réagit aussi bien à la vitellogénine de l'hémolymphe qu'à la vitelline purifiée, mais ne réagit pas aux autres protéines de l'hémolymphe, ni à l'extrait des granules du vitellus. L'IgG anti-vitelline a été utilisé pour localiser la vitelline de façon immunocytochimique chez les oeufs non-diapausants de *Bombyx*, au début de leur développement. Dans l'oeuf nouvellement pondu, la vitelline se trouve dans les granules internes du vitellus et dans les petits granules de vitellus du périplasma. Au cours des premiers stades du développement, la vitelline n'est pas métabolisée de manière uniforme dans l'oeuf. La vitelline des granules internes du vitellus situées dans la partie postérieure dorsale et la vitelline des petits granules périphériques du vitellus sont utilisées respectivement dans les 16 heures et les 2 jours qui suivent la ponte. Une couche

mince, très pauvre en vitelline est localisée entre le périplasma et l'intérieur riche en vitelline de l'oeuf nouvellement pondu. Cette couche reste toujours en contact étroit avec la périphérie où se développent les cellules du blastoderme et de la bande germinative.

* *Biological Institute, Faculty of Sciences, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya 464, Japan.*

TAMURA T.

Deficiency of xanthine dehydrogenase activity in the oq mutant of the silkworm. (Déficiency de l'activité de la xanthine déhydrogénase chez le mutant oq du ver à soie). *Jap. J. Genetics*, 1983, 58, p. 165.

TSITILIOU S.G., RODAKIS G.C., ALEXOPOULOU M., KAFATOS F.C., ITO K., IATROU K.
Structural features of B family chorion sequences in the silkworm *B. mori* by their evolutionary implications. (Eléments structurels des séquences du chorion de la famille B chez le ver à soie *B. mori* : leurs implications dans l'évolution). *EMBOJ J.*, 1983, 2, p. 1845.

TSUDA M., SUZUKI Y.

Fibroin genes. Control of their transcription. (Genes de la fibroïne. Contrôle de leur transcription). *Saibo Kogaku*, 1983, 2(2), p. 498-508. (J)

WAGO H.

Cellular recognition of foreign materials by *Bombyx mori* phagocytes. 2) Role of haemolymph and phagocyte filopodia in the cellular reactions. (Reconnaissance cellulaire des corps étrangers par les phagocytes de *B. mori*. 2) Rôle de l'hémolymphe et des filopodes dans les réactions cellulaires). *Dev. & Comparative immunology*, 1983, 7, p. 199.

YAMAOKA R., HONZAWA S., WATANABE C., HAYASHIYA K.

Further study on the pheromone gland components of the silkworm moth using capillary GC-MS (occurrence of (Z)-11-hexadecenol). (Etude complémentaire sur les composants de la glande à phéromone chez le papillon du ver à soie par l'emploi de GC-MS capillaire (présence de (Z)-11-hexadécénol).

Nippon Oyo Dobutsu Konchu Gakkaishi, 1983, 27(2), p. 77-83. (J)

SILK / SOIE

AMIN S.A., LABIB H., SHAKRA S.

Some chemical and dyeing properties of eri-silk fibers. (Quelques propriétés tinctoriales et chimiques des fibres de soie eri.)

Kolor Ert., 1983, 23(4), p. 152-156. (E)

ASAKURA T., SUZUKI H., WATANABE Y.

Conformational characterization of silk fibroin in intact *Bombyx mori* and *Philosamia cynthia ricini* silkworms by carbon 13 NMR spectroscopy. (Caractérisation de la conformation de la fibroïne chez les vers à soie intacts de *Bombyx mori* et *Philosamia cynthia ricini* par spectroscopie RMN au carbone 13.)

Macromolecules, 1983, 16, p. 1024-1026. (E)

HAMAZAKI M.

Study of industry of boiling off raw silk fabrics in Kyoto. (Etude de l'industrie de décreusage des tissus de soie grège à Kyoto.)

Bull. Fac. Text. Sci., Kyoto, 1983, 10(2), p. 251-259. (J,e)

ISHIKAWA H., NAGURA M.

Structure and physical properties of silk fibroin. (Structure et propriétés physiques de la fibroïne.)

Sen'i Gakkaishi, 1983, 39(10), p. 353-363. (J)

KAKO T., OHTA K.

On the sensory evaluation of handling and the mechanical properties for methylmethacrylate grafted silk fabrics. (De l'évaluation sensorielle du toucher et des propriétés mécaniques des tissus de soie traitée au méthylméthacrylate.)

J. Seric. Sci. Jpn., 1983, 52(5), p. 371-377. (J,j,e)

KATAOKA K.

X-ray diffraction pattern of the fiber of Nd-s silkworm. (Spectre de diffraction aux rayons X de la fibre de ver à soie Nd-s.)

Sen'i Gakkaishi, 1983, 39(6), T 269-T 170. (J)

MITSUISHI M., ISHIWATARI T., MARUYAMA H., AKIYAMA T.

Rates of acid dyeing in the presence of sodium alkylsulfates. (Vitesse de teinture acide en présence de sulfates de sodium alkylés.)

J. Seric. Sci. Jpn., 52(5), p. 406-412. (J,j,e)

The time-adsorption curves were obtained for the dyeing of nylon film (as a reasonable model for silk) with Orange 11, sodium 1-amino-4-n-propylaminoanthraquinone-2-sulfonate (B-III), and Roccelline in the presence of sodium n-alkylsulfates (SAS), such as octyl, decyl, dodecyl, tetradecyl, and hexadecyl-sulfates at pH 3 and 90°C.

The curves obtained in the dyeing of Orange II, B-III, and Roccelline in the absence and presence of SAS's (except STS and/or SHS) were found to be represented approximately by $M_t = M_\infty (1 - e^{-kt})$, where M_t and M_∞ refer to the amounts of the dye taken up by nylon at time t and at equilibrium, respectively, and k refers to the rate constant. The values of M_∞ 's and M_t 's decreased with an increase in the affinities of SAS's in the bath with dyes. Generally, k values of Orange II and B-III dyeings in the presence of SAS's were found to be larger than those obtained in the absence of SAS. The diffusion coefficients in the presence of SAS's were also larger than those in the absence of SAS.

Les cinétiques d'adsorption sont obtenues pour la teinture d'un film de nylon (en tant que modèle pour la soie) avec de l'Orange II, du 1-amino-4-n-propylamino-anthraquinone-2-sulfonate de sodium (B-III), et de la Roccelline en présence de n-alkylsulfates de sodium (SAS) tels que l'octyl-, le décyl-, le dodécyl-, le tétradécyl- et l'hexadécyl-sulfate à pH 3 et à 90° C. Les courbes obtenues avec l'Orange II, le B-III et la Roccelline en l'absence et en présence des SAS (à l'exception de STS et/ou de SHS) sont représentées approximativement par $M_t = M_\infty (1 - e^{-kt})$, où M_t et M_∞ représentent respectivement les quantités de colorant absorbées par le nylon au moment t et au point d'équilibre, et où k représente la constante de vitesse. Les valeurs de M_∞ et M_t diminuent avec l'augmentation de l'affinité des SAS pour les colorants dans le bain. Généralement, les valeurs k de l'Orange II et du B-III en présence des SAS sont plus élevées que celles obtenues en l'absence des SAS. Les coefficients de diffusion sont aussi plus importants en présence des SAS qu'en leur absence.

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Ueda, Nagano 386, Japan.

MORIMOTO H., YANO M.

On the yellowness measurements by microscopic colorimetrics for the spectral light irradiated raw silk. (De l'évaluation de la couleur jaune par colorimétrie microscopique pour la soie grège irradiée à la lumière spectrale.)

J. Seric. Sci. Jpn., 1983, 52(5), p. 413-418. (J, J, E)

NAGURA M., ISHIKAWA H.

Molecular motion in poly(aminoacid)s. 7) molecular motion in the β -form crystal of silk fibres. (Mouvement moléculaire chez les poly(aminoacide)s. 7) mouvement moléculaire chez la forme cristalline β des fibres de soie.)

Polymer, 1983, 24(7), p. 820-822. (E)

NAKAMURA K., OKAKAWA I., YAMAZAKI M.

Studies of continuous silk degumming processes. (Etude des procédés de décreusage continu de la soie.)

Sen'i Gakkaishi, 1983, 35(5), p. 206-211. (J)

SETUA D.K., DE S.K.

Short silk fiber reinforced natural rubber composites. (Fibres de soie courtes renforcées de composés de caoutchouc naturel.)

Rubber Chem. Technol., 1983, 56, p. 808-826. (E)

SHIMAZAKI A., YAMAZAKI M., TABUCHI S., TAKEUCHI S.

On the probability distribution of the number of remarkable cocoon filaments in a fixed size raw silk thread. (Répartition statistique du nombre de filaments de cocon remarquables dans un fil de soie de titre déterminé.)

J. Seric. Sci. Jpn, 1983, 52(5), p. 394-399. (J,j)

SHIMIZU F., KATAOKA H., TAKIZAWA Y.

Influence of metallic salts on color and color fastness of tanned silk. (Influence des sels métalliques sur la coloration et la solidité des couleurs de la soie chargée.)

J. Seric. Sci. Jpn., 1983, 52(5), p. 451-455. (J,j,e)

The tanned silk habutae was treated with several metallic salts, then the influence of each metallic ion was investigated on the color changes and color fastnesses to light, washing and hot water. The magnitude of color change by metallic ion was found to be in the following order: $\text{Fe(II)} > \text{Cr(VI)} > \text{Cu(II)} > \text{Cr(III)} > \text{Co(II)}$. In order to obtain the black shade due to tannin-iron compound, the amounts of Fe(II) uptaken by post-treatment must be more than 4.5 times those of the tannic acid in molecular ratio. Although the color fastness to washing and hot water of the tanned silk habutae was satisfactory, the light fastness was of the lowest grade. The light fastness could be increased by post-treatment with the metallic salts. The alteration by washing test of the tanned silk habutae was recognized when treated with Cr-alum, Iron(II) sulfate, and Cobalt(II) nitrate, but not by Iron(II) sulfate treatment. The alteration by hot water test was smaller. The staining to undyed cloths (silk and cotton) during washing and hot water tests was hardly recognized.

Le taffetas de soie chargée est traité avec plusieurs sels métalliques ; on recherche ensuite l'influence de chacun d'entre eux sur les changements dans la couleur et la résistance de la couleur à la lumière, au lavage et à l'eau chaude. L'amplitude de variation de la couleur due aux ions métalliques se produit dans cet ordre : $\text{Fe(II)} > \text{Cr(VI)} > \text{Cu(II)} > \text{Cr(III)} > \text{Co(II)}$. Afin d'obtenir la teinte noire due au composé fer-tannin, la quantité de Fe(II) saisie par le post-traitement doit être 4,5 fois plus importante que celle de l'acide tannique en proportion moléculaire. Bien que la résistance de la couleur au lavage et à l'eau chaude de l'habutae de soie chargée soit satisfaisante, la résistance à la lumière est moins grande. Cette résistance peut être augmentée par un traitement ultérieur aux sels métalliques. On observe une altération de l'habutae de soie chargée au test de lavage lorsqu'il est traité avec de l'alun de Cr, du sulfate de fer(II) et du nitrate de cobalt(II), mais pas avec le traitement au sulfate de fer(II). L'altération est plus faible à l'eau chaude. On n'observe pratiquement pas de taches sur les tissus non-teints (soie et coton) lors des tests de lavage et en eau chaude.

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Ueda 386, Japan.

TSUKADA M., HIRABAYASHI K.

Molecular conformation of *Bombyx mori* silk fibroin. (Conformation moléculaire de la fibroïne de *Bombyx mori*.)

Sen'i Gakkaishi, 1983, 39(6), T 265-T 268.

TSUKADA M., KOMOTO T., HIRABAYASHI K.

Synthesis and structural analysis of model compound related to silk sericin. (Synthèse et analyse structurale du composé modèle lié à la séricine.)

Sen'i Gakkaishi, 1983, 39(6), T 227-T 232. (J)

TSUKADA M., NAGURA M., ISHIKAWA H.

Structural analysis of poly-O-benzyl-L-serine and poly-L-serine. (Analyse structurale de la poly-O-benzyl-L-sérine et de la poly-L-sérine.)

Sen'i Gakkaishi, 1983, 39(7), T 278-T 282. (J)

TSUKADA M., UEMATSU I., HIRABAYASHI K.

Conformational change observed in the course of flow-induced crystallization of *B. mori* silk fibroin. (Changement de conformation observé au cours de la cristallisation de la fibroïne de *B. mori* induite par flux.)

Sen'i Gakkaishi, 1983, 39, T 307-T 309. (J)

NON-MULBERRY SILKWORMS / SERICIGENES NON-MURIER

CAI G., XU T.

Purification and characterization of a *L. asparaginae* from the silk gland of *Philosamia cynthia ricini*. (Purification et caractérisation d'une *L. asparaginase* provenant de la glande séricigène de *Philosamia cynthia ricini*.)

Kunchong Xuebao, 1983, 26(3), p. 235-242. (C)

LI W., CAO G., QI G., WANG D.

Complete sequence of glycine tRNA from the posterior silk gland of silkworm *Philosamia cynthia ricini*. (Séquence complète du tRNA glycine provenant de la glande séricigène postérieure du ver à soie *Philosamia cynthia ricini*.)

Shengwu Huaxue Yu, Shengwu Wuli Xuebao, 1983, 15(2), p. 167-175. (C)

OZYHAR A.*, WISNIEWSKI J.R., SEHNAL F., KOCHMAN M.

Age dependent changes in the binding and hydrolysis of juvenile hormone in the haemolymph of last instar larvae of *Galleria mellonella*. (Changements liés à l'âge dans la liaison et l'hydrolyse de l'hormone juvénile dans l'hémolymphe de *Galleria mellonella* au dernier âge larvaire.)

Insect Biochem., 1983, 13(4), p. 435-441. (E,e)

Binding and hydrolysis of juvenile hormone I (JH) and cleavage of four 1-naphthyl esters were determined in the haemolymph of *Galleria mellonella* throughout the last larval instar. JH binding per ml haemolymph parallels changes in the protein content with a maximum at the onset of spinning at 120 hr (152 mg protein/ml; binding of 20 n-mole JH/ml) and a drop at the pupal ecdysis. Activity of JH esterase(s) exhibits two maxima: first between cessation of feeding and the start of spinning at 96-120 hr (hydrolysis of 65 n-mole JH/ml/min) and second just before pupal ecdysis at 168 hr (52 n-mole JH/ml/min). Correlations between these changes and available data on the JH content in caterpillars indicate that JH binding protein and JH esterase(s) may play a role in clearing JH from its target tissues rather than in regulating its amounts. Fluctuations in the hydrolysis of 1-naphthyl esters of acetate (max. 4.5 μ -mole/ml/min), butyrate (max. 21 μ -mole/ml/min), palmitate (max. 0.5 μ -mole/ml/min), and laurate (max. 0.4 μ -mole/ml/min) reflect primarily the feeding activity of caterpillars and follow a very different course than changes in the potential to hydrolyze JH.

La fixation et l'hydrolyse de l'hormone juvénile I (JH) et le clivage des quatre esters 1-naphthyl sont déterminés dans l'hémolymphe de *Galleria mellonella* pendant le dernier âge larvaire. La fixation de JH par ml d'hémolymphe est parallèle à la variation du contenu en protéines, avec un maximum au début du filage à 120 h (152 mg de protéines/ml; fixation de 20 n-mol de JH/ml) et une chute au moment de l'ecdysis de la chrysalide. L'activité de la ou des estérases de JH montre deux pics: le premier entre la fin de l'alimentation et le démarrage du filage à 96-120 h (hydrolyse de 65 n-mol de JH/ml/min) et le second juste avant l'ecdysis de la chrysalide à 168 h (52 n-mol de JH/ml/min). Les corrélations intervenant entre ces deux changements et les données disponibles sur le contenu en JH chez les chenilles, indiquent que la protéine fixant l'hormone juvénile et la(les) estérase(s) de JH peuvent jouer un rôle plutôt pour éliminer l'hormone juvénile de ses tissus cibles que dans la régulation de ses quantités. Des fluctuations intervenant dans l'hydrolyse des esters 1-naphthyl d'acétate (max. 4,5 μ -mol/ml/min), de butyrate (max. 21 μ -mol/ml/min),

de palmitate (max. 0,5 μ -mol/ml/min) et de laurate (max. 0,4 μ -mol/ml/min) reflètent d'abord l'activité d'alimentation des chenilles et suivent un cours très différent des variations intervenant dans le potentiel d'hydrolyse de l'hormone juvénile.

* Division of Biochemistry, Institute of Organic and Physical Chemistry, Technical University of Wrocław, Wybrse Wyspińskiego 27, 50 370 Wrocław, Poland.

SAITO T., AOKI J.

Toxicity of free fatty acids on the larval surfaces of two lepidopterous insects towards *Beoveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. (Toxicité des acides gras libres disposés à la surface des larves de deux lépidoptères envers *Beoveria bassiana* et *Paecilomyces fumosoroseus*.)

Appl. Entomol. Zool., 1983, 18, p. 225-233. (E)

SEHNAL F.*, JANDA V.***, NEMEC V.

Composition, synthetic and cytolytic activities of *Galleria mellonella* silk glands during the last-larval instar under the action of juvenile hormone. (Composition, activités synthétiques et cytolytiques des glandes séricigènes de *Galleria mellonella* pendant le dernier âge larvaire, sous l'action de l'hormone juvénile.)

J. Insect Physiol., 1983, 29(3), p. 237-248. (E,e)

Within the first 48 hr of the last-larval instar of *Galleria mellonella* the silk glands grow but silk production is restrained. This 'preparatory phase' of the glands is probably maintained by juvenile hormone. Silk production and accumulation are stimulated in the 'accumulation phase' between 60 and 132 hr by unknown factors in the absence of juvenile hormone. The rate of RNA synthesis culminates at 84 hr but the RNA content increases until the end of cocoon spinning at 144 hr. In the following 'regression phase' (144-160 hr), when the glands exhibit high activities of acid and alkaline DN-ases and of acid phosphatase, the RNA and protein contents rapidly decrease, but that of DNA remains high. This phase is typical of moulting insects, is independent of juvenile hormone, and seems to be caused either by an increase in ecdysteroids or by lack of nutrients. The following 'degeneration phase' occurs when the surge of ecdysteroids terminates the larval-pupal transformation. Disintegration of silk glands by autolysis and phagocytosis is completed after pupal ecdysis (180 hr). Treatment of larvae with a juvenoid (ZR 512) at 48 or 132 hr in the last instar dramatically alter the composition, synthetic and cytolytic activities of silk glands. At the next ecdysis the glands attain a state very similar to that of the preparatory phase. They are capable of intensive silk production and completion of developmental cycle when the supernumerary larvae prepare for pupation. The results indicate that juvenile hormone can reverse the development of the silk glands.

Pendant les premières 48 heures du dernier âge larvaire de *Galleria mellonella*, les glandes séricigènes se développent mais la production de soie est réduite. Cette "phase préparatoire" de la glande est certainement maintenue par l'hormone juvénile. La production et l'accumulation de soie sont stimulées, en l'absence d'hormone juvénile, par des facteurs inconnus pendant la "phase d'accumulation" entre la 60ème et la 132ème heure. Le taux de synthèse d'ARN culmine au bout de 84 h mais le taux d'ARN augmente jusqu'à ce que le cocon soit filé, c'est-à-dire jusqu'à la 144ème heure. Dans la "phase de régression" qui suit (144-160ème h), lorsque les DNA-ases acides et alcalines et la phosphatase acide sont très actives dans les glandes, la teneur en ARN et en protéine diminue rapidement, mais la teneur en DNA reste élevée. Cette phase qui est caractéristique des insectes en mue est indépendante de l'hormone juvénile et semble être provoquée soit par une augmentation d'ecdystéroïdes, soit par

un manque de composants nutritifs. La "phase de dégénérescence" suivante intervient lors de la poussée d'ecdystéroïdes qui achève la transformation de la larve en nymphe. La désintégration des glandes séricigènes par autolyse et phagocytose s'achève après l'ecdysis de la nymphe (180 h). Le traitement des larves au dernier âge avec un juvénoïde (ZR 512) à la 48ème ou à la 132ème heure, altère fortement la composition et les activités synthétiques et cytolitiques des glandes séricigènes. À l'ecdysis suivante les glandes atteignent un stade très semblable à celui de la phase préparatoire. Elles peuvent produire de la soie d'une manière intensive et terminer leur cycle de développement alors que les larves surnuméraires se préparent pour la nymphose. Les résultats indiquent que l'hormone juvénile peut inverser le développement des glandes séricigènes.

* Institute of Entomology, Czechoslovak Academy of Sciences, Na Folimance 5, 120 00 Praha 2, Czechoslovakia.

** Department of General Zoology and Animal Physiology, Purkyne University, Kotlarska 2, 611 37 Brno, Czechoslovakia.

SHIMIZU S.

Morphology of the formation of blastospores in *Paecilomyces fumosoroseus*. (Morphologie de la formation des blastospores chez *Paecilomyces fumosoroseus*.)

J. Seric. Sci. Jpn., 1983, 52(5), p. 443-450. (J,j,e)

Morphology of the formation of blastospores of *P. fumosoroseus* was investigated and following results were obtained. L-broth was found to be a suitable medium for the production of blastospores of *P. fumosoroseus* and the maintenance of their form. The medium composition of L-broth is sucrose, 2%; pepton, 1%; NaCl, 0.5%; yeast extract, 0.3% (pH 6.8-7.0). In L-broth, blastospores were formed as buds on elongated hyphae subsequently on short hyphae at the logarithmic phase of the fungal growth. Blastospores were oval in shape, 2.5-7.5 μ in length and 2.0-3.5 μ in width. *P. fumosoroseus* multiplied in the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*, by budding of blastospores.

On a étudié la morphologie de la formation de blastospores de *P. fumosoroseus* et les résultats suivants ont été obtenus : Le milieu "L-broth" convient à la production et au maintien des blastospores de *P. fumosoroseus*. La composition du milieu "L-broth" est de 2 % en sucrose, 1 % en peptone, 0,5 % en NaCl et de 0,3 % en extrait de levure (pH 6,8-7,0). Dans le milieu "L-broth", les blastospores se forment comme des bourgeons sur les hyphes allongées, puis sur les hyphes courtes pendant la phase logarithmique de croissance. Les blastospores sont de forme ovale, de 2,5 à 7,5 μ de longueur et de 2,0 à 3,5 μ de large. *P. fumosoroseus* se multiplie dans l'hémolymphe du ver à soie *Bombyx mori* par bourgeonnement des blastospores.

Fukushima-Ken Sericultural Experiment Station, Yanagawa-machi, Dategun, Fukushima 960 07, Japan.

Directeur Gérant : Dr H. BOUVIER

Dépôt Légal : 2ème trimestre 1984