

sericologia

Journal of the Silkworms

Revue des Vers à Soie

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

Managing Director

H. BOUVIER

Directeur Gérant

Chief Editor

G. CHAVANCY

Rédacteur en Chef

Deputy Editor

A. FOURNIER

Rédacteur adjoint

COMITE DE REDACTION

EDITORIAL BOARD

J. BEAULATON (France)
G. BOSQUET (France)
P. COUBLE (France)
R.K. DATTA (Inde/India)
H. DOIRA (Japon/Japan)
J. FOURCHE (France)
T. FUKUDA (Japon/Japan)
M. GOLDSMITH (USA)
K. IATROU (Canada)
M.S. JOLLY (Inde/India)
M. KOBAYASHI (Japon/Japan)
S. KRISHNASWAMY (Inde/India)

J.M. LEGAY (France)
S.X. LIU (Chine/China)
Y. MANO (Japon/Japan)
M.N. NARASIMHANNA (Inde/India)
E. OHNISHI (Japon/Japan)
J.C. PRUDHOMME (France)
G. REALI (Italie/Italy)
K. SHIMURA (Japon/Japan)
T.N. SONWALKER (Inde/India)
R. TAKAHASHI (Brésil/Brazil)
Y. TAZIMA (Japon/Japan)
C. VAGO (France)

Secrétariat et documentation

Mrs. C. PERCEVEAUX
Mrs. N. LORiot

EDITORIAL

Comme cela avait été décidé à la suite des demandes de nombreux lecteurs, nous avons changé le mode de reliure de *Sericologia* afin qu'il soit plus solide.

Cette amélioration s'accompagne désormais d'une nouvelle présentation typographique et d'un format un peu plus important, ces deux facteurs devant faciliter la lecture.

Enfin, le comité de rédaction a été enrichi de nombreux spécialistes dont la compétence dans les divers domaines couverts par *Sericologia* ne fait aucun doute.

Ce numéro 28(1) devrait ainsi marquer un nouveau départ pour notre revue. Les lecteurs devraient en être satisfaits. Nous comptons d'autre part sur les auteurs pour proposer le plus souvent possible des synthèses dans les différents domaines et pour respecter, encore plus strictement que par le passé les recommandations pour la présentation des manuscrits. J'espère que ce premier numéro de l'année 1988 donnera satisfaction et je compte sur les lecteurs pour nous faire part de leurs remarques et de leurs suggestions.

Gérard CHAVANCY

EDITORIAL

According to what had been decided after many of our readers requests, the type of binding has been modified so as to make it stronger.

From now onwards, this enhancement is accompanied of a new typographical presentation and a slightly larger size, these two factors should make it easier to read.

Finally, the Editorial Board has been enlarged of many specialists whose proficiency in the different fields covered by *Sericologia* is quite unquestionable.

This present issue 28(1) should then be a new start for our journal. Our readers should be satisfied with it. Besides, we rely on authors to propose synthesis works in different fields more and more often and to comply, even more closely with our instructions, as far as the presentation of papers is concerned. I hope that this first issue will satisfy our readers and I rely on them to let us know their remarks and suggestions.

Gérard CHAVANCY

INFORMATIONS - ANNOUNCEMENTS

Le prochain Comité exécutif de la Commission Séricicole Internationale se tiendra au siège, à La Mulatière, le mardi 4 octobre 1988.

The forthcoming Executive Committee of the International Sericultural Commission will be held at its headquarters, in La Mulatière, on tuesday 4th October, 1988.

Le congrès de l'Association Internationale de la Soie se déroulera à Krefeld (République Fédérale d'Allemagne) du 25 au 29 septembre 1988. Informations et inscriptions à l'A.I.S., 12, rue Joseph Serlin, 69001 LYON.

The International Silk Association congress is to be held in Krefeld (Germany), 25th-29th September 1988. Information and enrolment: I.S.A., 12 rue Joseph Serlin, 69001 LYON.

L'atelier sur la Biologie moléculaire et la Génétique moléculaire chez les Lépidoptères se tiendra à Kolymbari, Crète, Grèce du 5 au 10 septembre 1988.

Le programme comprendra : génétique du développement et structure des chromosomes ; structure des gènes et des protéines et évolution ; hormones péptidiques, peptides du cerveau et neurobiologie moléculaire; expression des gènes et réponses physiologiques; régulation de la transcription; expression transgénique et virus . Tous les participants doivent faire une présentation de leurs travaux.

Pour information, écrire à M.R. GOLDSMITH, Department of Zoology, University of Rhode Island, Kingston, RI 02881-0816, USA

Workshop on the Molecular Biology and Molecular Genetics of Lepidoptera is to be held in Kolymbari, Crete, Greece, September 5-10, 1988.

Sessions will include: developmental genetics and chromosome structure; protein and gene structure and evolution; peptide hormones, neural peptides, and molecular neurobiology; gene expression and physiological responses; regulation of transcription; transgenic expression and viruses. All participants are invited to make a presentation.

For information, write: M.R. GOLDSMITH, Department of Zoology, University of Rhode Island, Kingston, RI 02881-0816, USA. Include address, phone number, and session for presentation.

LE GENE DE SERICINE 1 CODE POUR PLUSIEURS TYPES DE MOTIFS RICHES EN CODONS SERINE

J.J. MICHAILLE, A. GAREL et J.C. PRUDHOMME Laboratoire de Biologie Générale et Appliquée, CNRS UA92, Université Claude Bernard-Lyon I, 43, boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cédex, France.

Un gène de sérine (Ser1) avait été en partie cloné et séquencé (Okamoto et coll., 1982 ; Michaille et coll., 1986). Ce gène donne 4 ARN messagers par épissage différentiel (2 800, 4 000, 9 000 et 10 500 nt). Or, on sait que les sérines possèdent une composition voisine en acides aminés (Gamo et coll., 1977 ; Komatsu, 1979). On s'attend donc à ce que tous les exons de Ser1 possèdent une composition typique des sérines. Ce résultat, déjà établi pour les exons 3, 4, 5 et 7, est confirmé ici par le séquençage de l'exon 8. Ainsi, bien que porteurs de séquences nucléotidiques différentes, les exons 3 à 8 codent pour des motifs polypeptidiques de composition similaire, ce qui résulte probablement d'un phénomène de convergence. Cependant, les 30 derniers acides aminés de l'exon 8 constituent un motif polypeptidique atypique, dont la présence dans les quatre polypeptides codés par Ser1 suggère qu'il doit jouer un rôle fondamental dans l'interaction des sérines avec les autres protéines de la soie.

INTRODUCTION

La soie est constituée de deux fractions protéiques majeures, remarquables par leur composition très déséquilibrée en acides aminés.

La fibroïne est caractérisée par une grande richesse en résidus glycine, alanine et sérine (Gamo et coll., 1977 ; Komatsu, 1979). Cette composition résulte de la présence dans la protéine d'un motif répété qui lui confère une structure cristalline (Strydom et coll., 1977).

Les sérines, qui constituent entre 20 et 30 % du poids du cocon, sont représentées par au moins 5 polypeptides majeurs (Gamo et coll., 1977) de composition voisine, caractérisée par une grande richesse en sérine (16,4 à 38,1 %) en glycine (11,4 à 18,0 %) et en aspartate plus asparagine (11,6 à 13,9 %). La masse moléculaire apparente de ces protéines s'échelonne de 65 000 à 400 000 daltons (Gamo et coll., 1977 ; Prudhomme et coll., 1985). Certaines des sérines sont glycosylées (Gamo et coll., 1977 ; Sinohara, 1979).

La partie 5' du gène de sérine 1 (Ser1) a été clonée et partiellement séquencée (Okamoto et coll., 1982). Nous avons cloné et étudié la partie 3' de ce même gène (Michaille et coll., 1986). Il s'étend sur environ 23 600 pb ; sa structure générale, dans l'état actuel de nos connaissances, est représentée sur la figure 1. Il possède une unique extrémité 5' (Okamoto et coll., 1982) et 3' (Michaille et coll., 1986 ; Couble et coll., 1987). Ce gène donne 4 ARN messagers (de 10 500, 9 000, 4 000 et 2 800 nt) par épissage différentiel du transcrit primaire (Michaille et coll., 1986), l'exon 3 étant conservé (ARNm de 10 500 et 4 000 nt) ou éliminé (ARNm de 9 000 et 2 800 nt) dans son entier (Michaille et coll., 1986 ; Hamada et coll., 1987). C'est très vraisemblablement aussi le cas de l'exon 5 (Michaille, 1987). Nous avons montré que Ser1 ne s'exprime pas dans la partie tout à fait antérieure du réservoir et que l'épissage différentiel du transcrit primaire varie au cours du 5ème stade larvaire

dans la région centrale du réservoir, où l'ARNm de 4 000 nt est remplacé successivement par celui de 10 500 puis de 9 000 nt, alors que l'ARNm de 2 800 nt est constamment présent dans la partie postérieure (Couble et coll., 1987).

En dépit de cet épissage différentiel, qui affecte une partie notable de la séquence codante du gène (64,4 % pour l'ARNm de 4 000 nt, 76,3 % pour l'ARNm de 2 800 nt), les sérécines produites ont une composition globale voisine (Gamo et coll., 1977 ; Komatsu, 1979), et cela bien que, dans ces deux ARNm en particulier, les séquences excisées (exons 3 et 5) possèdent justement la composition typique des sérécines. Cela suggère que l'ensemble des exons sont responsables de la composition remarquable des sérécines, et pas seulement la séquence répétée qui constitue les exons 5 et 7 (Okamoto et coll., 1982 ; Michaille et coll., 1986). Afin de le vérifier, nous avons séquencé l'exon 8, dont la séquence est présente dans les quatre ARNm issus du gène Ser1. L'ensemble des données disponibles montre alors que Ser1 comporte plusieurs types de motifs possédant une séquence différente mais une composition en codons comparable ; ces motifs sont répartis tout au long du gène Ser1, à l'exception de l'extrémité 3'.

MATERIEL ET METHODES

La structure des divers clones et les techniques utilisées ont été précédemment décrites (Michaille et coll., 1986).

La carte de restriction de la région 3' du gène Ser1, présentée sur la figure 2 A, a été établie à partir du sous-clone pBm SJ 5013, issu du clone λ Bm SJ 5, isolé à partir de la banque génomique EcoR I (souche européenne 703) construite par Eickbush et Kafatos (1982).

Après sous-clonage dans les vecteurs M13 mp 10 et mp 11 (Messing et Viera, 1982), le séquençage de l'exon 8 a été effectué selon la technique des terminateurs de chaîne de Sanger et coll. (1977).

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Structure de l'extrémité 3' de Ser1 :

Par digestion à la nucléase S1 et par prolongation d'amorces hybridées à des ADNc de réservoir, nous avons précédemment montré que le gène Ser1 possède une seule extrémité 3', portée par l'exon 8 (Michaille et coll., 1986).

Nous avons cartographié la partie du gène située en aval du site de restriction E8 (EcoR I) à partir du sous-clone pBm SJ 5013 (Michaille et coll., 1986). Cette région de 1124 nt, qui contient le huitième et dernier exon (fig. 2A), a été séquencée (fig. 2B). En accord avec les résultats de la cartographie à la nucléase S1 (Michaille et coll., 1986), l'extrémité 5' de l'exon 8 serait située à 29 pb en aval du site B8 (BamH I), au niveau d'un motif CAG, consensus majeur des jonctions 3-intron-5-exon (Mount, 1982). En position 646 de la séquence, on trouve une séquence AATAAA (unique parmi les 1124 nucléotides séquencés) identique à celle que Birnstiel et coll. (1985) ont retrouvée entre 10 et 30 nt en amont du site de polyadénylation dans de nombreux gènes d'eucaryotes supérieurs, et on trouve 14 nt plus loin un motif CAAAGTGTGTGGTTT du même type que le motif présent entre 11 et 20 nt en aval du site AATAAA de plusieurs gènes d'eucaryotes (Mc Laughlin et coll., 1985). La présence de ces deux éléments suggère de situer le site de polyadénylation sur le C en position 660 (c'est à dire le C du motif CAAAGTGTGTGGTTT). La longueur du dernier exon (exon 8) peut donc être estimée à 460 nt, ce qui est en bon accord avec l'estimation de 450 nt réalisée antérieurement par cartographie à la nucléase S1 (Michaille et coll., 1986).

Cet exon contient une phase de lecture ouverte sur 270 nt (soit 90 A.A.), jusqu'au codon stop TAA en position 471. Le choix de cette phase laisse environ 190 nt pour la séquence transcrite mais non traduite jusqu'à l'extrémité 3'.

La richesse de cette phase en codons sérine (30 %), thréonine (14,4 %), glycine (8,9 %) et aspartate plus asparagine (8,9 %) correspond bien à la composition attendue pour une sérécine (Tableau I, colonne E8). Cependant, on remarque que le polypeptide déduit de cette phase n'est pas homogène. En effet, les deux premiers tiers contiennent tous les résidus sérine et seulement 5 A.A.

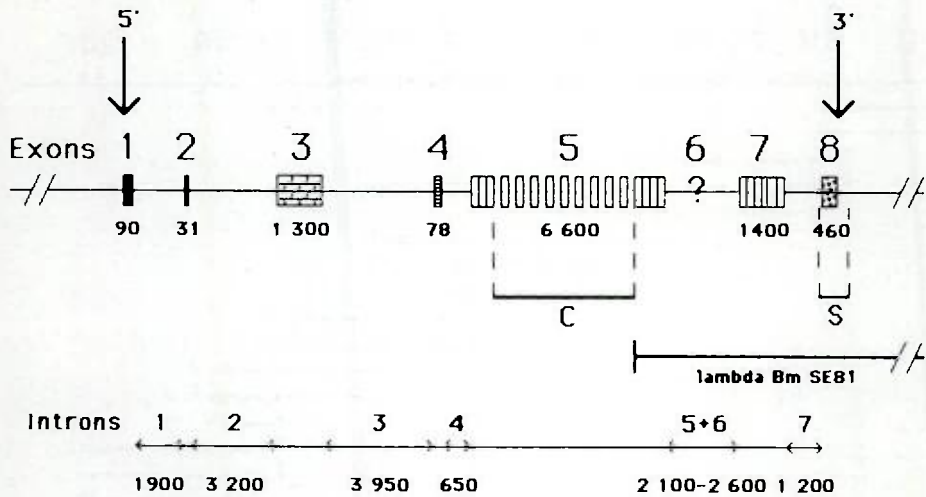


Figure 1. Structure générale du gène Ser1 (23 600 pb).

Figure 1. General structure of the gene Ser1 (23 600 pb).

Ce schéma donne la structure probable du gène Ser1, telle que l'on peut la déduire des travaux de Okamoto et coll. (1982) et de Michaille et coll. (1986). Tailles en paires de bases (pb)/ This graph shows the present knowledge of the structure of the gene Ser1, as it has been deduced from the studies of Okamoto et al. (1982) and Michaille et al. (1986). Size in base pairs (bp).

C Région centrale non clonée (4 500 pb)/ Central region not cloned (4 500 pb).

S Région séquencée autour de l'extrémité 3' du gène (1 224 pb, Fig. 2)/ Region which has been sequenced around the 3' end of the gene (1 224 bp, Fig. 2).

? La position et la séquence de l'exon 6 ne sont pas déterminées/ The location and sequence of the exon 6 were not determined.

Exons codant pour le signal peptidique/ Exons encoding the peptide signal.

Exons contenant le motif répété BamH I/BamH I de 114 pb/ Exons containing the repeated motif BamH I/BamH I of 114 bp.

Autres exons/ Other exons.

λ Bm SE81 : Clone génomique à partir duquel ont été séquencés les motifs répétés BamH I/BamH I de 114 pb/ Genomic clone from which the repeated motifs BamH I/BamH I of 114 bp have been sequenced.

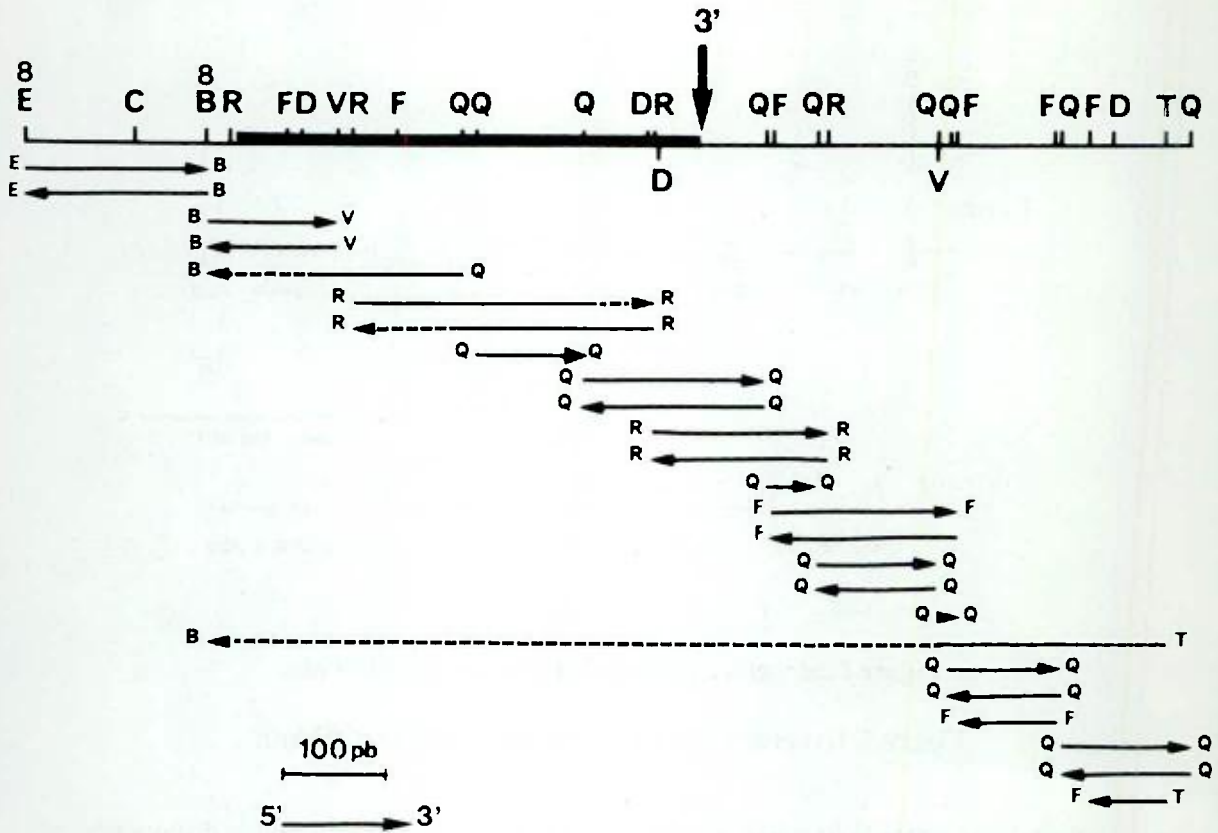


Figure 2. Structure de l'extrémité 3' du gène Ser1. Figure 2. Structure of the 3' end of the gene Ser1.

Fig.2A : Stratégie de séquençage de la région 3' de Ser1. Fig.2A : Strategy of sequencing of the 3' region of Ser1.

La carte de restriction de la région située en aval du site E8 (EcoR I) a été dressée à partir du sous-clone pBm SJ 5013 (cf. Michaille et coll., 1986). Le trait gras indique la position de l'exon 8, la flèche l'extrémité 3' du gène./ The restriction map of the region located downstream the E8 (EcoR I) site has been drawn from the sub-clone pBm SJ 5013 (see Michaille et al., 1986). The thick line represents the location of the exon 8, the arrow the 3' end of the gene.

Les sous-clones utilisés pour le séquençage selon la technique de Sanger et coll. (1977) sont présentés sous la carte. La partie lisible sur le gel de séquences est indiquée en trait plein./ The sub-clones used for sequencing according to the method of Sanger et al. (1977) are shown below the map. The readable part on the sequence gels is indicated by a continuous line.

Enzymes de restriction/ Restriction enzymes : B = BamH I ; C = Hinc II ; D = Hpa II ; E = EcoR I ; F = Hinf I ; Q = Taq I ; R = Rsa I ; T = Sst I ; V = Ava I.

E8 1U 20 30 40 50 60
 GAATCATAT TCAATAAGCA GCAATTGAAA TCACGTGAA TTAGATAGT CAAATCGAT
 70 80 90 100 120
 ACGTCTTTGA AAACGATATA TGTGTTGGT TATATATTA CAGGCTCAAC CGGCAAAAGC
 130 140 150 160 170 **B8** 180
 GACGCGCGCT CATCTGAAGA CGGTTTCTGG TGGTGGATA GAAGCAAACT AGCATCCGTC
 190 200 210 220 230 240
 ACAAAGCGC TACCGTACAG SerSerThr ThrAspLysThr SerThrAsp SerAlaSer
 TCATCCACA ACGATAAGAGC AGCACCAGC AGTGGCAGC
 250 260 270 280 290 300
 SerThrAspSer ThrSerSer ThrSerGlyAla SerThrThr ThrSerGly SerSerSer
 AGCAGCATTCG ACCTCAAGC AGGTCCGGGCA AGCACAACC ACTTCAGGC AGTTTCTCT
 310 320 330 340 350 360
 ThrSerGlyLys SerSerThr SerAspAlaSer SerThrSer SerSerVal SerArgSer
 ACCTGCGGGCTT TCAAGTACA TGGGAGCTTTC TCCACTTCC TCTAGTGT TCCAGGAGT
 370 380 390 400 410 420
 HisHisSerGly ValAsnArg LeuLeuHisLys ProGlyGln GlyLysLys CysLeuGly
 CATCTTCAGGC GTGACAGA CTCTTACACAAG CTGTGTCAA GGAATAATA TCGTTTGC
 430 440 450 460 470 480
 PheGluAsnIle PheAspIle ProLysHisLeu ArgLysAla IleGlyVal
 TTGAAAACATA TTGCATATT CTTTACCATCTC CTTAAGCAT ATCGGTCTT TAATAACAAT
 490 500 510 520 530 540
 AAACACGACT TGGATATTC CTGTAGTGT TTAAGATTTT AAATCTTACT TAATGACTTC
 550 560 570 580 590 600
 GAACGATTTT AACGATAACT TTCTCTTGT TTAACITTA TCAAGTACA TAAAAGGCC
 610 620 630 640 650 660
 CGGTTTGTGA CGCAACAAA AAAATGTAA TTGTCTTGGC TATATAATA ACGTATATC
 670 680 690 700 710 720
 AAAGTGTGT GTTTTCTCTT ACCAAGACC CCTTAAGAT CGGTAAATGC CCTTAAGTGC
 730 740 750 760 770 780
 AGTCTTTCG CATCTTTAA ATACACATGT ATTACACTGA TACGTGCAAT GTACACTTTT
 790 800 810 820 830 840
 AATAGATATC CTCCACTAAA AATATTTTAA TTATTTTAA TTGTTCACC AAAATCTATA
 850 860 870 880 890 900
 AATTCACGAA ATGATGAGCT AGTTAGCGGC TGAATGATGC CTGACGGTC GTGGGTTCGA
 910 920 930 940 950 960
 TTCCACGTC GGGCAAAACAT TCTGTAATGA ACAGGTTTGC TCTTCGCTCG GGTGATTTAT
 970 980 990 1000 1010 1020
 ATTATATAT ATATATATAA ATGTATATAA GAATCTTGA CAGTTTTCG TATACATAAA
 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 AAAGCAATC ATAAATTCGC GATGACCTC CGGTGACGC TGGTCTCTTA CTATTTTAT
 1090 1100 1110 1120 1124
 TCCACATGA CAGACGAGCT CACAGCCGT TCAGGTCTGA TCGA

Fig.2B : Séquence de la région 3' de Ser 1. Fig.2B : Sequence of the 3' region of Ser1.

- Séquences consensus de polyadénylation./ *Consensus sequences of polyadenylation.*
- ▼ Extrémité 3' présomptive du gène Ser1./ *Presumed 3' end of the gene Ser1.*
- ➡ Limite 5' présomptive du dernier exon./ *Presumed 5' end of the last exon.*
- ↪ Limite entre la région riche en codons sérine (EB8/60 sur le Tableau I) et la région terminale plus hydrophobe./ *Limit between the region rich in serine codons (E8/60 in Table I) and the more hydrophobic region.*

La séquence des sites de restriction E8 (EcoRI) et B8 (BamHI) est soulignée./ *The sequences of the restriction sites E8 (EcoRI) and B8 (BamHI) is underlined*

		5	10	15	20	25	30	35	38
200x300	K	-- <u>RK</u> --	<u>D</u> ---S	<u>HED</u> --	K---E	N--T-	-----	-----	S-V
	J	-----	-----	-----	SH-G-	-----	-----	-----	--V
	I	-----	-----	-----	---E	-----	-----	-----	--V
	H	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---
	G	GSSTS	GG SST	YGYSS	NS <u>R</u> DG	SVSST	GSSSN	TDSNS	NSA
GxS	F	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---
	E	-----	-- <u>RR</u> --	-----	-----	-----	-----	-----	---
	B	-----	-- <u>RR</u> --	-----	-----	N-----	-----	-----	SN-
	C	-----	-----	-----	-----	---T-	-----	-----	--V
	D	-- <u>RK</u> --	---S	<u>HED</u> --	K---E	N--T-	-----	-----	---

Figure 3. Comparaison des séquences d'acides aminés de motifs répétés BamH I/BamH I issus des hybrides 200 x 300 et Gunpo x Shugyoku.

Figure 3. Comparison between amino acid sequences of the repeated motifs BamH I/BamH I from 200 x 300 and Gunpo x Shugyoku hybrids.

- en caractères gras : acides aminés apolaires,
 - soulignés : acides aminés chargés,
 - G,H,I,J et K : motifs répétés BamH I/BamH I de 114 pb clonés au hasard à partir du clone λ Bm SE81 (cf. la figure 1) issu de l'hybride 200 x 300,
 - B,C,D,E et F : motifs répétés BamH I/BamH I de 114 pb situés dans cet ordre au début de l'exon 5 du gène Ser1, séquencés à partir de l'hybride Gunpo x Shugyoku par Okamoto et coll. (1982)./

- thick letters : apolar amino acids,
 - underlined letters: charged amino acids,
 - G,H,I,J and K : repeated motifs BamH I/BamH I of 114 bp randomly cloned from the clone λ Bm SE 81 (see fig. 1) from 200 x 300 hybrid,
 - B,C,D,E and F : repeated motifs BamH I/BamH I of 114 bp located in this order at the beginning of the exon 5 of gene Ser1, sequenced from Gunpo x Shugyoku hybrid by Okamoto et al. (1982)

...apolaires, dont 3 résidus alanine et 2 résidus valine, alors que les 30 derniers A.A. constituent une phase beaucoup moins polaire, qui présente la particularité de contenir (en positions 411 et 417 de la séquence nucléotidique) les deux seuls résidus cystéine détectés jusque là dans la séquence codante du gène Ser1 en dehors du signal peptidique. La composition de la première partie du polypeptide, et en particulier sa richesse en résidus polaires (Tableau I, colonne E8/60), est très proche de celle des autres fragments exoniques de Ser1 (cf. le Tableau I).

Ces résultats confirment que l'exon 8, bien que différent des autres exons, avec lesquels ne se manifeste pas d'hybridation croisée, contient un type original de motif riche en codons sérine.

La conservation des 30 derniers A.A. codés par l'exon 8 dans chaque polypeptide codé par Ser1, alors même que leur composition est totalement atypique par rapport à celle de l'ensemble des exons connus de Ser1, suggère que la partie carboxy-terminale de chaque polypeptide assure une fonction indispensable à la manifestation des propriétés physico-chimiques des sérines.

2. Comparaison des séquences exoniques de Ser1 :

a) Les exons de la région 5' du gène :

Ils ont été séquencés par Okamoto et coll (1982). Les exons 1 et 2, codant respectivement pour 12 et 10 AA, correspondent au signal peptidique. l'exon 3 (colonne E3 du tableau I), dont seuls les 72 premiers et les 17 derniers AA sont connus, serait moins riche en codons sérine et glycine (21,6 %), mais plus riche en codons d'acides aminés acides et basiques que les autres exons séquencés de Ser1. Cet exon contient donc un second type de séquence riche en codons sérine. Quant au petit exon 4, il code pour 26 amino-acides, dont 17 résidus sérine, mais aucun résidu glycine, aspartate et asparagine.

b) Les exons contenant les répétitions de 114 pb :

On sait que le gène Ser1 contient environ 70 motifs répétés BamHI/BamHI de 114 pb (Michaille et coll., 1986), répartis entre l'exon 5 (58 motifs) et l'exon 7 (12 motifs). Nous avons séquencé au hasard cinq motifs répétés, désignés respectivement par les lettres G,H,I,J et K, à partir du clone λ Bm SE81 issu de l'hybride 200 x 300 (figure 1). Ces motifs peuvent donc provenir, soit de la partie 3' de l'exon 5, soit de l'exon 7. De leur côté, Okamoto et coll. (1982) ont séquencé, à partir de clones issus de la banque génomique Gunpo x Shugyoku, les cinq premiers fragments répétés de l'exon 5, que nous désignerons respectivement ici par les lettres B,C,D,E et F selon l'ordre dans lequel ils se suivent sur le gène.

Le tableau I donne les compositions en acides aminés des fragments issus de l'hybride 200 x 300 : G,H,I et J pris globalement (colonne GHJ), puisqu'ils sont presque identiques (cf. ci-dessous), et K. Tous se caractérisent par leur richesse en résidus sérine. Cependant, le fragment K est remarquable par son abondance supérieure en résidus acides et basiques, compensée par une moindre richesse en résidus hydroxylés. Ces motifs répétés ne donnent lieu à aucune hybridation croisée avec les autres exons, et constituent donc un autre type de séquence riche en codons sérine.

Les comparaisons des séquences nucléotidiques avaient mis en évidence l'existence de fortes similitudes entre ces dix motifs répétés, quoique l'on n'en trouve pas deux identiques (Michaille et coll., 1986). La comparaison des polypeptides codés par les dix motifs répétés séquencés (figure 3) montre que leur ressemblance ne dépend, ni de la souche d'origine, ni de la région du gène dont ils proviennent. Ainsi, les fragments F et G, d'une part, et H, d'autre part, sont identiques bien que provenant respectivement de la partie 3' (hybride 200 x 300) et de la partie 5' (hybride Gunpo x Shugyoku) du gène. Il en est de même pour les fragments K et D, qui sont très voisins, mais différent clairement des 8 autres, notamment par leur richesse en acides aminés chargés. Compte tenu que les fragments G,H,I,J et K, ont été clonés au hasard, ces observations suggèrent l'existence d'un motif de base plus long, incluant plusieurs motifs répétés de 114 pb, et qui serait présent tout au long des exons 5 et 7 de Ser1.

On note qu'il n'existe aucune substitution dans les 10 motifs entre les positions 25 et 35. De même, il est remarquable que, dans les fragments K et D, tous les résidus chargés supplémentaires

par rapport aux autres motifs sont situés dans la moitié amino-terminale du motif répété, ce qui introduit une forte dissymétrie de la répartition des charges.

A.A.	Séricines			Fragments du gène Ser 1				
	s1	s3	s4	E3	GHIJ	K	E8	E8/60
Ser	29,1	38,1	32,5	21,6	44,7	42,1	30,0	45,0
Thr	8,5	4,1	11,1	4,6	10,5	7,9	14,4	21,7
Tyr	3,3	2,1	2,8	4,6	5,3	0,0	1,1	0,0
Gly	18,0	14,2	11,4	8,0	15,8	7,9	8,9	8,3
Glu+Gln	5,4	10,7	6,1	10,2	0,7	5,3	2,2	0,0
Asp+Asn	13,0	12,6	11,6	15,9	14,5	18,4	8,9	8,3
Lys	2,2	5,3	2,2	10,2	0,0	5,3	4,4	1,1
Arg	4,0	3,0	3,6	4,6	2,6	5,3	3,3	3,3
His	1,6	0,8	1,9	1,1	0,7	2,6	4,4	3,3
Ala	6,2	6,2	4,2	6,8	1,3	0,0	3,3	5,0
Val	3,7	1,0	3,8	5,7	4,0	5,3	3,3	3,3
Leu	2,1	0,6	2,8	1,1	0,0	0,0	4,4	0,0
Ile	1,6	0,4	1,8	3,4	0,0	0,0	4,4	0,0
Phe	1,5	0,4	3,4	0,0	0,0	0,0	2,2	0,0
pol.	84,9	91,4	84,0	80,7	94,7	94,7	80,0	94,4

Tableau I. Composition en acides aminés (donnée en pourcentage des résidus totaux) de séquences exoniques du gène Ser1. Comparaison avec celle de diverses séricines.

Table I. Amino acid composition (in percentage of total residues) of exonic sequences of the gene Ser1. Comparison with various other sericins.

- pol. : acides aminés polaires/ *polar amino acids*,
- E3 : troisième exon (Okamoto et coll., 1982)/ *third exon (Okamoto et al., 1982)*,
- G,H,I,J,K : fragments répétés de 38 A.A. (114 pb) issus des exons 5 et 7/ *repeated fragments of 38 amino acids (114 bp) from exons 5 and 7*,
- GHIJ : fragments G,H,I et J/ *G,H,I and J fragments*,
- E8 : dernier exon (exon 8)/ *last exon (exon 8)*,
- E8/60 : 60 premiers A.A. de l'exon 8/ *first 60 A.A. of the exon 8*,
- s1, s3, s4: polypeptides isolés par Gamo et coll. (1977) à partir de la lumière de la glande séricigène/ *polypeptides isolated by Gamo et al. (1977) from the lumen of the silk gland*.

Si l'on tient compte que, dans l'ensemble, ces motifs contiennent peu d'acides aminés stabilisateurs de l'hélice α (de 6 à 9 sur 38) on peut postuler qu'ils contribuent de manière importante à la structure en feuillet β décrite chez les sérécines (Tsukada et Bertholon, 1981). La connaissance de la séquence complète du gène permettrait de mieux cerner les contraintes de structure dont les remarques précédentes suggèrent l'existence, et donc de progresser dans l'analyse des relations entre la structure et la fonction, encore mal comprise, de ces protéines, encore que les algorithmes disponibles actuellement ne permettent pas de prédire la structure des protéines contenant des motifs très répétés.

Par ailleurs, il est à noter (Michaïlle et coll., 1986) que les fragments répétés possédant des sites de restriction EcoR I, survenus par mutation silencieuses dans les codons 33 et 34, sont tous localisés dans l'exon 5. Cela doit signifier qu'aucune recombinaison n'a eu lieu récemment entre les exons 5 et 7 dans les souches étudiées.

3. Contribution des différents exons à la structure des peptides codés par Ser1 :

Parmi les 5 sérécines dont la composition en acides aminés a été analysée par Gamo et coll (1977), deux (s2 et s5) sont produites par la partie tout à fait antérieure du réservoir, région dans laquelle le gène Ser1 ne s'exprime pas au cinquième stade larvaire (Couble et coll., 1987). La composition des trois autres sérécines est donnée dans le tableau I. Deux d'entre elles, s1 (309 000 daltons) et s3 (145 000 daltons) sont sécrétées dans la partie centrale du réservoir, dont les cellules produisent successivement les ARNm de 4 000, 10 500 et 9 000 nt par épissage différentiel des transcrits de Ser1, alors que s4 (80000 daltons) est présente dans la région située au contact du sécréteur, seule partie du réservoir où l'on trouve l'ARNm de 2 800 nt (Couble et coll., 1987).

Sérécines			Fragments du gène Ser1					
s1	s3	s4	E3	GHIJ	K	E8	EB/60	
1,00	0,92	0,91	0,79	0,87	0,79	0,51	0,80	s1
	1,00	0,81	0,91	0,72	0,77	0,43	0,69	s3
		1,00	0,68	0,80	0,77	0,42	0,74	s4
			1,00	0,58	0,73	0,35	0,54	E3
				1,00	0,74	0,46	0,80	GHIJ
					1,00	0,68	0,79	K
						1,00	0,74	E8
							1,00	EB/60

Tableau II. Corrélations entre les compositions en A.A. des fragments connus du gène Ser1 et des sérécines analysées par Gamo et coll. (1982).

Table II. Correlations between amino acid compositions of known fragments of the gene Ser1 and of sericins analysed by Gamo et al. (1982).

Les coefficients de corrélation de rangs de Spearman ont été calculés à partir des compositions en A.A. données dans le tableau I./ The Spearman's ranking correlation coefficients have been computed from the amino acid compositions given in Table I.

La nature des différents motifs considérés est indiquée dans la légende du tableau I./ The nature of the different motifs of interest is given in Table I legend.

Outre l'abondance particulière des ARNm de Ser1 parmi les ARN messagers majeurs spécifiques du réservoir (Michaille et coll., 1986), les masses moléculaires de s1, s3 et s4 et les parties du réservoir où elles sont sécrétées sont compatibles avec l'hypothèse qu'elles pourraient être synthétisées respectivement à partir des ARNm de 9 000, 4 000 et 2 800 nt de Ser1, le polypeptide codé par l'ARNm de 10 500 nt correspondant alors probablement à la fraction de grande masse moléculaire [environ 40 000 daltons (Prudhomme et coll., 1985)] exclue des gels d'électrophorèse de Gamo et coll. (1977)

Cette hypothèse peut être testée en examinant la corrélation entre les compositions en acides aminés des exons de grande taille, entre eux et avec les sérícines s1, s3 et s4 (tableau II), et leur contribution respective à la structure des polypeptides codés par les ARNm de Ser1 (Tableau III). On note que s1, s3 et s4 possèdent un même type de composition déséquilibrée en acides aminés (tableau I) et sont fortement corrélées entre elles (tableau II).

En faveur de notre hypothèse, on peut faire les observations suivantes :

- l'exon 3 est corrélé le plus fortement avec s3, mais beaucoup moins avec s1 et s4 (tableau II); or notre hypothèse implique que seule s3 contienne E3, qui contribuerait pour 36,2% à sa structure (Tableau III).

- la corrélation entre les fragments répétés G, H, I, J et K (présents dans les exons 5 et 7) et les sérícines diminue de s1 à s4 puis s3 (tableau II), ce qui correspond à la contribution décroissante de ce type de motif dans les sérícines s3 et s4 qui ne contiendraient pas l'exon 5 (Tableau III).

- de même, le début de l'exon 8 (E8/60), fortement corrélé aux 5 motifs répétés, a une corrélation décroissante de s1 à s4 puis s3 (Tableau II), conformément à sa contribution respective (tableau III), ce qui est en accord avec l'observation précédente.

La part des 30 derniers acides aminés de l'exon 8, codant pour un polypeptide présent dans chaque sérícine et qui n'a pas la composition typique des sérícines, n'est pas contradictoire, puisqu'elle permet d'expliquer que s4, à laquelle sa contribution est la plus importante, soit moins corrélée à s1 et s3 que ces deux dernières le sont entre elles.

CONCLUSION

Les sérícines possèdent une composition voisine en acides aminés, caractérisée par une grande richesse en résidus sérine, en aspartate plus asparagine, en glycine et plus généralement en acides aminés polaires (Gamo et coll., 1977 ; Komatsu, 1979).

Le séquençage partiel du gène Ser1 a montré que exceptés les deux premiers exons qui codent pour le signal peptidique, et les 30 derniers codons de l'exon 8, qui codent pour un motif plus hydrophobe, tous les exons codent pour des séquences polypeptidiques possédant une composition typique des sérícines. Cependant, cette similitude des compositions en acides aminés cache une grande diversité des séquences des exons, sauf les exons 5 et 7 qui contiennent le même type de motifs répétés. Cela pose le problème de la convergence de composition en acides aminés à partir de séquences vraisemblablement d'origine différente.

L'existence de motifs de composition en codons assez similaire tout au long du gène permet en outre d'expliquer que, conformément au modèle d'épissage différentiel du transcrit primaire de Ser1 précédemment proposé (Michaille et coll., 1986 ; Michaille, 1987), l'élimination de l'exon 3 (ARNm de 9 000 et 2 800 nt) et/ou de l'exon 5 (ARNm de 4 000 et 2 800 nt), ou leur conservation (ARNm de 10 500 nt) conduit à la synthèse de quatre sérícines possédant une composition globale très voisine en acides aminés, parmi lesquelles on doit vraisemblablement compter les sérícines s1, s3 et s4 décrites par Gamo et coll. (1977).

La composition voisine en codons des divers exons rend probablement compte des propriétés physico-chimiques similaires des diverses sérícines (Gamo et coll., 1977 ; Komatsu, 1979 ; Tsukada et Bertholon, 1981). Au contraire, les variations des compositions en acides aminés chargés entre les divers exons, et peut être aussi la répartition différente des charges à l'intérieur des différents exons, doivent changer la nature des interactions des sérícines avec les autres constituants de la soie, selon qu'elles contiennent ou non les exons 3 et 5. Cela est à mettre en rapport avec l'évolution de la

composition du fil de soie au cours du développement larvaire, et avec la régulation spatio-temporelle

Contribution des exons à chaque polypeptide						
Séricines	M. Mol.	ARNm Ser1	E3	E5	E7	E8/60
s1	309 000	9 000 nt (2 863 A A)	----	76,8 16,3 93,1		2,1
s3	145 000	4 000 nt (1 196 A A)	36,2	----	39,0	5,0
s4	80 000	2 800 nt (796 A A)	----	----	58,6	7,5

Tableau III. Contribution des exons du gène Ser1 au polypeptide codé par trois de ses ARNm matures.

Table III. Contribution of the gene Ser1 exons to the polypeptide encoded by three of its mature mRNAs.

La composition des sérícines s1, s3 et s4 a été déterminée par Gamo et coll. (1977). Leur masse moléculaire (M. Mol.) est donnée en daltons./ *The composition of sericins s1, s3 and s4 was determined by Gamo et al. (1977). The molecular weight (M. w.) is given in daltons.*

La longueur de trois des ARNm de Ser1, supposés coder respectivement pour les sérícines s1, s3 et s4, est donnée en nucléotides. Entre parenthèse, on a indiqué le nombre d'acides aminés potentiellement codés par chaque ARNm, estimé après soustraction des séquences 5' et 3' non traduites, d'une séquence poly A d'environ 100 nt et des exons 1 et 2 qui codent pour le signal peptidique./ *The length of three of Ser1 mRNAs, respectively supposed to encode the sericins s1, s3 and s4, is given in nucleotides. Between brackets is given the number of amino acids potentially encoded for each mRNA, estimated after discarding of the non translated 5' and 3' sequences, the poly A sequence of about 100 nt, and the exons 1 and 2 encoding the peptide signal.*

La contribution des exons à chaque polypeptide est donnée en pourcentage des acides aminés codés par chacun d'eux ; pour l'exon 8, n'ont été considérés que les 60 premiers acides aminés (E8/60) qui possèdent une composition de type sérícine (cf. les tableaux I et II)./ *The contribution of the exons to each polypeptide is given in percentage of amino acids encoded by each of them; regarding the exon 8, only the first 60 amino acids (E8/60) having a sericin-like composition have been considered (see Tables I and II).*

des autres gènes spécifiques du réservoir déjà clonés (Couble et coll., 1987 ; Michaille et coll., en préparation). Au 5ème stade larvaire, on observe en effet que les sérécines constituent autour de la fibroïne, selon la portion du réservoir considérée, des couches concentriques de propriétés physico-chimiques différentes (Shibukawa, 1959 ; Couble et coll., 1987).

BIBLIOGRAPHIE

BIRNSTIEL M.L., BUSSLINGER M. and STRUB K., (1985), Transcription termination and 3' processing: the end is in site., *Cell*, 41, 349-359.

COUBLE P., MICHAILLE J.J., GAREL A., COUBLE M.L. and PRUDHOMME J.C., (1987), Developmental Switches of Sericin mRNA splicing in Individual Cells of *Bombyx mori* Silkgland. *Develop. Biol.*, 124, 431-440.

EICKBUSH T.H. and KAFATOS F.C., (1982), A walk in the chorion locus of *Bombyx mori*., *Cell*, 29, 633-643.

GAMO T., INOKUCHI T. and LAUFER H., (1977), Polypeptides of fibroin and sericin secreted from the different sections of the silk gland in *Bombyx mori*, *Insect Biochem.*, 7, 285-295.

HAMADA Y., YAMASHITA O., and SUZUKI Y., (1987), Haemolymph control of sericin gene expression studied by organ transplantation, *Cell differentiation*, 20, 65-76.

KOMATSU K., (1979), Chemistry and structure of Silk, *JARQ*, 13(1), 64-72.

Mc LAUCHLAN J., GAFFNEY D., WHITTON J.L. and CLEMENTS B.J., (1985), The consensus sequence YGTGTTY located downstream from the AATAAA signal is required for efficient formation of mRNA 3' termini, *Nucl. Acids Res.*, 13(4), 1347-1368.

MESSING J. and VIEIRA J., (1982), A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double digest restriction fragments, *Gene*, 19, 269-276.

MICHAILLE J.J., (1987), Clonage de 5 gènes spécifiques du réservoir de la glande sérécigène de *Bombyx mori*. Contrôle de leur expression et de l'épissage différentiel des ARNm d'un gène de sérécine, Thèse de Doctorat, LYON (Villeurbanne, France).

MICHAILLE J.J., COUBLE P., PRUDHOMME J.C. and GAREL A., (1986), A single gene produces multiple sericin messenger RNAs in the silk gland of *Bombyx mori*, *Biochimie*, 68, 1165-1173.

MOUNT S.M., (1982), A catalogue of splice junction sequences, *Nucl. Acids. Res.*, 10(2), 459-472.

OKAMOTO H., ISHIKAWA E. and SUZUKI Y., (1982), Structural analysis of sericin genes. Homologies with fibroin gene in the 5' flanking nucleotide sequences, *J. Biol. Chem.*, 257(24), 15192-15199.

PRUDHOMME J.C., COUBLE P., GAREL J.P. and DAILLIE J., (1985), Silk synthesis. In "Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology", 571-594., G.A. Kerkut and L.I. Gilbert, Eds, Pergamon, New York.

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

SHIBUKAWA A., (1959), Studies on the silk-substance within the silk gland in the silkworm, *Bombyx mori* L., Bull. Sericult. Exp. Sta., 15(7), 395-401.

SINOHARA H., (1979), Glycopeptides isolated from sericin of the Silkworm, *Bombyx mori*, Comp. Biochem. Physiol., 63 B, 87-91.

STRYDOM D.J., HAYLETT T. and STEAD R.H., (1977), The amino-terminal sequence of silk fibroin peptide Cp. A reinvestigation, Biochem. Biophys. Res. Commun., 79(3), 932-938.

TSUKADA M. and BERTHOLON G., (1981), Etude préliminaire des caractères physicochimiques de la sérécine de la soie., Bull. Scient. ITF, 10(39), 141-154.

THE SERICIN 1 GENE ENCODES SEVERAL TYPES OF SEQUENCES RICH IN SERINE CODONS

J.-J. MICHAILLE, A. GAREL and J.-C. PRUDHOMME Laboratoire de Biologie Générale et Appliquée, CNRS UA92, Université Claude Bernard-Lyon I, 43, boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cédex, France.

A sericin gene (Ser1) was partially cloned and sequenced (Okamoto et al., 1982 ; Michaille et al., 1986). This gene encodes 4 messenger RNAs by differential splicing (2 800, 4 000, 9 000 and 10 500 nt). It is known that sericins have nearly the same amino acid composition (Gamo et al., 1977 ; Komatsu, 1979). It is then expected that all Ser1 exons have a sericin-like composition. This was established for exons 3, 4, 5 and is supported by the sequencing of exon 7 and 8 in the present study. Although exons 3-8 bear different nucleotide sequences, they code for polypeptides of similar composition, probably because of a convergence phenomenon. However, the last 30 amino acids of exon 8 constitute an atypical polypeptide motif and its occurrence in the four polypeptides encoded by Ser1 suggests that it may play an essential role in sericins interactions with other silk proteins.

INTRODUCTION

The silk thread is formed by two major proteins remarkable for their unbalanced amino acid composition.

Fibroin is characterized by its richness in glycine, alanine and serine residues (Gamo et al., 1977 ; Komatsu, 1979). This composition results from the repetition of a motif which confers its crystalline structure (Strydom et al., 1977).

The sericins contributing to 20-30% of the cocoon shell weight, are represented by at least 5 major polypeptides (Gamo et al., 1977) of similar composition characterized by a high content of serine (16.4-38.1%), glycine (11.4-18.0%) and aspartate plus arginine (11.6-13.9%). The apparent molecular weights of these proteins range from 65 000 to 400 000 daltons (Gamo et al., 1977 ; Prudhomme et al., 1985). Some of these sericins are glycosylated (Gamo et al., 1977 ; Sinohara, 1979).

The 5' end of the sericin 1 gene (Ser1) has been cloned and partially sequenced (Okamoto et al., 1982). We have previously cloned and studied the 3' end of this gene (Michaille et al., 1986). It extends over about 23 600 bp; its general structure, as known so far, is represented in Figure 1. It has a unique 5' end (Okamoto et al., 1982) and a unique 3' end (Michaille et al., 1986; Couble et al., 1987). This gene produces 4 messenger RNAs (10 500, 9 000, 4 000 and 2 800 nt) by differential splicing of the primary transcript (Michaille et al., 1986), the exon 3 being either maintained (10 500 and 4 000 nt mRNAs) or eliminated (9 000 and 2 800 nt mRNAs) (Michaille et al., 1986; Hamada et al., 1987). The same situation can be expected in the case of the exon 5 (Michaille, 1987). We have shown that Ser1 expression does not occur in the anterior part of the middle silk gland and that differential splicing of the primary transcript changes during the 5th instar in the median part of the middle silk gland where the mRNA of 4 000 nt is successively replaced by the mRNA of 10

500 and 9 000 nt, whereas the mRNA of 2 800 nt is continuously present in the posterior part of the middle silk gland (Couble *et al.*, 1987).

In spite of this differential splicing affecting a considerable part of the gene coding sequence (64.4% for the 4 000 nt mRNA, 76.3% for the 2 800 nt mRNA), the sericins produced have a similar global composition (Gamo *et al.*, 1977; Komatsu, 1979) although the excised sequences (exons 3 and 5) in these two particular mRNAs, have a typical sericin composition. This suggests that the exons as a whole are responsible for the sericins composition and not only the repeated sequences constituting the exons 5 and 7 (Okamoto *et al.*, 1982; Michaille *et al.*, 1986). In order to confirm this statement, we have sequenced the exon 8 which appears in the four mRNAs produced by Ser1. The data available show that Ser1 has several kinds of motifs with different sequences but comparable codon composition, which are distributed all along the Ser1 gene, except at the very 3' extremity.

MATERIALS AND METHODS

The structure of the various clones and the techniques used have been described previously (Michaille *et al.*, 1986).

The restriction map of the Ser1 gene 3' end presented in Figure 2A has been set up from the sub-clone pBm SJ 5013, coming from the clone λ Bm SJ 5, isolated from the EcoR I genomic library (European strain 703) obtained by Eickbush and Kafatos (1982).

After sub-cloning in M13 mp 10 and mp 11 vectors (Messing and Viera, 1982), the sequencing of exon 8 has been carried out using the chain terminators technique (Sanger *et al.*, 1977).

RESULTS AND DISCUSSION

1. Structure of Ser1 3' end:

By nuclease S1 digestion and primer extension experiments, we had previously evidenced that the Ser1 gene has a unique 3' end borne by the exon 8 (Michaille *et al.*, 1986).

We have mapped the gene region located downstream the restriction site E8 (EcoR I) from the sub-clone pBm SJ 5013 (Michaille *et al.*, 1986). This region of 1 124 nt containing the 8th and last exon (Fig. 2A) has been sequenced (Fig. 2B). According to the results of nuclease S1 mapping (Michaille *et al.*, 1986), the 5' end of exon 8 would be located at 29 bp downstream the B8 site (BamH I), at the level of a CAG sequence, major consensus of 3'-intron-5'-exon junctions (Mount, 1982). A sequence AATAAA (unique among the 1 124 sequenced nucleotides) was found at location 646 of the sequence, being identical to the one described between 10 and 30 nt upstream the polyadenylation site in a great number of superior eukaryotic genes (Birstiel *et al.*, 1985). 14 nucleotides farther is found a motif CAAAGTGTGTGGTTTT of the same type as the one present between 11 and 20 nt downstream the AATAAA site of several eukaryotic genes (Mc Lauchlan *et al.*, 1985). The presence of these two elements suggests that the polyadenylation site may be located on the C in position 660 (C of CAAAGTGTGTGGTTTT motif). The last exon (exon 8) length may then be estimated to 460 nt, in agreement with the estimation of 450 nt previously obtained by nuclease S1 mapping (Michaille *et al.*, 1986).

This exon contains a reading frame of 270 nt (90 A.A.) up to the TAA stop codon at location 471. Choosing this frame leaves about 190 nt for a transcribed but not translated sequence.

This frame rich in serine (30%), threonine (14.4%), glycine (8.9%) and aspartate plus arginine (8.9%) codons duly squares with the composition expected for a sericin (Table I, col. E8). However, it is noteworthy that the polypeptide inferred from this frame is not homogenous. The first two thirds contain all the serine residues and only five apolar A.A. (3 alanine residues and 2 valine residues) whereas the last 30 A.A. form a considerably less polar frame containing (at location 411 and 417 of the nucleotide sequence) the only two cysteine residues detected so far in the Ser1 gene coding sequence beyond the peptide signal. The composition of the polypeptide first region, and especially its richness in polar residues (Table I, col. E8/60) is very similar to the one of the other Ser1 exonic fragments (see Table I).

These results confirm that although the exon 8 differs from the others and does not show any crossed hybridization with them, it contains an original kind of motif rich in serine codons.

The presence of the last 30 A.A. encoded by the exon 8 in each of the polypeptides encoded by Ser1 even when having a totally atypical composition suggests that this carboxy-terminal region has a necessary function in the physico-chemical properties of the sericins.

2. Comparison of Ser1 exonic sequences:

a) The 5' end exons:

They have been sequenced by Okamoto *et al.* (1982). The exons 1 and 2 coding for 12 and 10 A.A. respectively, correspond to the peptide signal. The exon 3 (Table I, col. E3) of which only the first 72 and last 17 A.A. are known, may be poorer in serine and glycine codons (21.6%), but may contain more acid and basic amino acids codons than the other exons sequenced in Ser1. This exon contains a second kind of sequence rich in serine codons. The small exon 4 codes for 26 amino acids including 17 serine residues, but no glycine, aspartate and asparagine residues.

b) The 114 bp repeated motif containing exons:

We know that the gene Ser1 contains about 70 BamH I/BamH I repeated motifs of 114 bp (Michaille *et al.*, 1986) distributed among the exon 5 (58 motifs) and exon 7 (12 motifs). We have randomly sequenced five repeated motifs (respectively referred to as G, H, I, J and K) from the λ Bm SEB 1 clone deriving from the 200 x 300 B. mori hybrid (Fig. 1). These motifs may arise either from the 3' end of the exon 5 or from the exon 7. Working on clones of the Gunpo x Shugyoku genomic library, Okamoto *et al.* (1982) have sequenced the first five repeated fragments of the exon 5, here respectively referred to as B, C, D, E and F in the order of appearance in the gene.

The Table I shows the amino acid composition of fragments issued from the hybrid 200 x 300: G, H, I and J put in together (col. GHIJ) as they are almost identical (see below), and K. However, the K fragment is remarkable because of its higher content in acid and basic residues balanced by a lower content in hydroxylated residues.

These repeated motifs do not give rise to any crossed hybridization with the other exons and constitute an other kind of sequence rich in serine codons.

The comparisons between the nucleotide sequences had brought to light high similarities between these 10 repeated motifs though there are not two of the same (Michaille *et al.*, 1986). The comparison between the polypeptides coded by the 10 repeated motifs sequenced (Fig. 3) shows that their resemblance does not depend on the strain nor on the gene region they come from. Thus the fragments F and G on the one hand, and H on the other hand are identical though they respectively come from the 3' region (200 x 300 hybrid) and the 5' region (Gunpo x Shugyoku hybrid) of the gene. The same observation is made as regards the fragments K and D which are very close but quite different from the other 8, in particular as far as the richness in charged amino acids is concerned. Taking into account that the fragments G, H, I, J and K were cloned at random, these observations suggest that a longer basic motif including several repeated motifs of 114 bp would be present all along the exons 5 and 7 of Ser1.

It can be noted that there is no amino acid substitution in the 10 motifs between location 25 and 35. Similarly, it is noteworthy that, in the fragments K and D, all the additional charged residues are located in the amino-terminal region of the repeated motif, introducing a high dissymetry of charge distribution.

If we take into account the fact that these motifs taken as a whole contain a low amount of stabilizing amino acids of α helix (from 6-9 out of 38), we can postulate that they largely contribute to the β pleated sheet structure reported in sericins (Tsukada and Bertholon, 1981). The knowledge of the complete sequence of the gene would help us to understand the structural constraints that seem to exist and to step forward in analyzing the relationship between the structure and function of these proteins though the algorithms available at present do not allow to predict the structure of proteins with highly repeated motifs.

It is also noteworthy (Michaille *et al.*, 1986) that all the repeated fragments containing EcoR I restriction sites occurring with silent mutation in codons 33 and 34, are located in the exon 5. This suggests that no recombination has recently taken place between the exon 5 and 7 in the strains studied.

exons, and perhaps also the difference in distribution of charges within the different exons, may change the nature of the sericin interactions with the other constituents of silk, depending on whether they contain the exons 3 and 5 or not. This must be put in relation with evolution of the silk thread composition during larval development and with the space-time regulation of the other middle silk gland specific genes already cloned (Couble *et al.*, 1987; Michaille *et al.*, in preparation). It is observed that in the 5th larval instar, the sericins envelop the fibroin with successive layers of different physico-chemical properties according to the middle silk gland region considered (Shibukawa, 1959; Couble *et al.*, 1987).

3. Contribution of the different exons to the structure of peptides coded by Ser1:

Out of the five sericins which amino acid composition was analysed by Gamo *et al.* (1977), two (s2 and s5) are produced by the very anterior part of the middle silk gland where the gene Ser1 is not expressed at the 5th larval instar (Couble *et al.*, 1987). The amino acid composition of the other three sericins is given in Table I. Two of them, s1 (309 000 daltons) and s3 (145 000 daltons) are secreted in the median part of the middle silk gland. In this same region the cells successively produce the mRNAs of 4 000, 10 500 and 9 000 nt by differential splicing of Ser1 transcripts; s4 (80 000 daltons) is present in the region located next to the posterior silk gland which is the only part of the middle silk gland where the 2 800 nt mRNA can be found (Couble *et al.*, 1987).

Not only the abundance of Ser1 mRNAs among the major specific messengers of the middle silk gland (Michaille *et al.*, 1986) but also the molecular weights of s1, s3 and s4 and the middle silk gland regions where they are secreted suggest that they could be synthesized from the Ser1 mRNAs of 9 000, 4 000 and 2 800 nt respectively and that the polypeptide encoded by the mRNA of 10 500 nt would probably correspond to the fraction of high molecular weight (about 400 000 daltons) (Prudhomme *et al.*, 1985) excluded from the electrophoresis gels described by Gamo *et al.* (1977).

This hypothesis can be tested by studying the correlation between the amino acid composition of the exons of large size and the sericins s1, s3 and s4 (Table I) and their respective contribution to the structure of the polypeptides encoded by the mRNAs of Ser1 (Table III). It is observed that s1, s3 and s5 have the same kind of unbalanced amino acid composition and are highly correlated.

The following observations are made to support this hypothesis:

- The exon 3 is mostly correlated to s3 and considerably less correlated to s1 and s4 (Table I): our hypothesis implies that s3 alone contains E3, contributing to 36.2% of its structure (Table III).
- The correlation between the repeated fragments G, H, I, J and K (present in the exons 5 and 7) and the sericins decreases from s1 to s4, then to s3 (Table II), corresponding to the decreasing contribution of this kind of motif in sericins s3 and s4 which would not contain the exon 5 (Table III).
- Similarly, the beginning of the exon 8 (E8/6O) highly correlated to the five repeated motifs, has a decreasing correlation from s1 to s4, then to s3 (Table II) accordingly to its respective contribution (Table III), and this observation corroborates the previous one. The involvement of the last 30 amino acids of the exon 8 encoding for a polypeptide present in each sericin and not having the sericin-typical composition, is not contradictory since it explains that s4 to which its contribution is most important, is less correlated to s1 and s3 than these two ones between themselves.

CONCLUSION

The sericins have a similar amino acid composition characterized by a high content in serine, aspartate plus arginine and glycine residues and on a more general point of view in polar amino acids (Gamo *et al.*, 1977; Komatsu, 1979).

Partial sequencing of Ser1 gene has shown that, except for the last two exons coding for the peptide signal and the last 30 codons of the exon 8 coding for a more hydrophobic motif, all the exons code for polypeptide sequences having a sericin-typical composition. However, behind this similarity in amino acid composition, arises a large diversity of exon sequences, except for the exons 5 and 7 containing the same kind of repeated motifs. The problem of amino acid composition convergence from sequences of probably different origin is brought up.

The existence of motifs of quite similar codon composition all along the gene suggests that, according to the differential splicing of Ser1 primary transcript previously proposed (Michaille *et al.*, 1986; Michaille, 1987), the eliminating of the exon 3 (mRNAs of 9 000 and 2 800 nt) and/or the exon 5 (mRNAs of 4 000 and 2 800 nt), or their maintenance (mRNA of 10 500 nt), leads to the synthesis of four sericins with a very similar amino acid global composition, among which the sericins s1, s3 and s4 described by Gamo *et al.* (1977).

The similar codon composition of the different exons may be explained by the similar physico-chemical properties of the various sericins (Gamo *et al.*, 1977; Komatsu, 1979; Tsukada and Bertholon, 1981). On the contrary, the changes in the amount of charged amino acids among the

COMBINING ABILITY AMONG MULTIVOLTINE x BIVOLTINE SILKWORM (*BOMBYX MORI* L.) HYBRIDS

R.K. DATTA* and G.D. PERSHAD Silkworm Genetics Laboratory, Central Sericultural Research & Training Institute, Mysore 570 008, India.

* Present address: Director (Technical), Central Silk Board, 39 Mahatma Gandhi road, Bangalore 560 001, India.

*Combining ability for cocoon yield and other five basic independent characters among hybrids of five multivoltine and three bivoltine silkworm (*Bombyx mori* L.) breeds were studied in a 8x8 partial diallel crosses including reciprocals, to select out the best combiners for utilisation in replacing the existing hybrids as well as in the heterosis breeding programme. Quantities for general combining ability (GCA) for all characters and for specific combining ability (SCA) for cocoon yield and filament length were highly significant. Superiority of GCA quantities for five characters was evident from Baker's ratio of $2\sigma_g^2/(2\sigma_g^2 + \sigma_s^2)$ ranging from 0.83 to 0.98. Parental performance as judged by GCA quantities indicated that Hosa Mysore and Mysore Princess multivoltine with NB7 bivoltine were good general combiners. The crosses of Nistari and Daizo multivoltine with NB7, and Hosa Mysore with NB4D2 bivoltine proved better specific combiners for cocoon yield and pupation rate.*

Keywords: combining ability, *Bombyx mori* L., multivoltine, bivoltine, cocoon.

INTRODUCTION

Discovery of a marked luxuriance in F₁ hybrids for economic traits in silkworm by Toyama in 1905 and introduction F₁ hybrids instead of pure strains started a new era. While, in India successful attempts for introduction of silkworm hybrids were made in 1921, their large scale commercial exploitation started very late during mid seventies. However, multivoltine x bivoltine hybrids as against bivoltine x bivoltine hybrids became more popular among the farmers. For this purpose, females of local races were crossed with males of bivoltine strains which were evolved and released by this institute during early seventies. Though the reciprocal crosses (bivoltine x multivoltine) were found not encouraging (Benjamin *et al.*, 1983), no serious attempts were made to identify high yielding combinations from the combining ability studies involving both bivoltine and multivoltine races. Pershad *et al.* (1986a) has identified a few multivoltine strains as better combiner from general and specific combining ability studies. A partial diallel of multivoltine and bivoltine strains was employed in the present studies to determine the best combinations among multi-bivoltine hybrids and the potentiality of the breeds for their utilization in future breeding programme.

MATERIAL AND METHODS

Five multivoltine and three bivoltine breeds, maintained at this institute as inbred strains for a number of generations, are detailed in Table I. These strains were crossed in all possible combinations including reciprocals but excluding hybrids belonging to the same voltinism. The hybrids were reared under controlled conditions of temperature and humidity, with three replications of one laying each, in a completely randomized block design. Analysis of variance was done according to Snedecor (1967) assuming that multivoltine and bivoltine breeds were chosen and cannot be regarded as random.

The analysis for general and specific combining ability and for reciprocal differences for cocoon yield, fecundity, larval duration, pupation rate, shell % and filament length was made according to Griffing's (1956) Model II (non random) and modified for partial diallel analysis. The model for combining ability analysis used:

$$X_{ijkl} = g_i + g_j + s_{ij} + r_{ij} + 1/bk \sum b_k + 1/bk \sum (bv)_{ijk} + 1/bc \sum \sum e_{ijk}$$

where,

g_i and g_j are GCA quantities of the i th female parent and j th male parent respectively. s_{ij} and r_{ij} are the SCA quantities for the cross ($i \times j$) and reciprocal effects respectively. For each cross ($i \times j$), the quantity ($g_i + g_j + s_{ij}$) was computed and the null hypothesis was tested from zero value, assuming no genotypic differences among F_1 s.

RESULTS

Analysis of variance for general and specific combining ability and reciprocal differences among the multivoltine x bivoltine hybrids in *Bombyx mori* L. for fecundity, larval duration, cocoon yield, pupation rate, shell percentage and filament length are presented in Table II. Hybrid mean squares were highly significant for all the traits. Similarly, GCA mean squares were also highly significant for all the traits except cocoon yield, but SCA mean squares were highly significant only for cocoon yield and filament length. The Baker's (1978) ratio ($2 \sigma_g^2 / (2 \sigma_g^2 + \sigma_s^2)$) ranged from 0.37 to 0.98 and was found very high for fecundity (0.91), larval duration (0.98), shell % (0.98) and filament length (0.97).

General combining ability (GCA) effects:

General combining ability quantities measure the comparative performance of the parents in relation to one another. Among the multivoltine races, Hosa Mysore proved to be the best combiner followed by Mysore Princess (Table III). The indigenous race, Nistari and the exotic race, Daizo proved to be better combiners for pupation rate. Better general combiners for fecundity were NB7, Hosa Mysore and Mysore Princess; for cocoon yield was Hosa Mysore; for shell percentage were NB18, Hosa Mysore and Mysore Princess; and for filament length was Mysore Princess (Table III). Nistari and Daizo proved to be better combiners for shortening the larval duration. None of the parents were good general combiners for all the traits.

Specific combining ability (SCA) effects:

Highly significant SCA quantities for fecundity were found in the hybrids of Hosa Mysore and Mysore Princess with NB7; for shorter larval duration in the hybrid of Daizo with NB18; for cocoon yield in the hybrids of Nistari and Daizo with NB7, Hosa Mysore with NB4D2; and for pupation rate in the hybrids of Nistari and Daizo with NB7 and Hosa Mysore with NB4D2; for shell percentage in the hybrids of Kollegal Jawan with NB18 and Daizo with NB4D2; and for filament length in the hybrids of Hosa Mysore and Kollegal Jawan with NB7 (Table IV).

The prominent hybrids for SCA were Hosa Mysore x NB7 for fecundity, filament length, shorter larval duration and shell percentage; Daizo x NB7 and Hosa Mysore x NB4D2 for cocoon yield and pupation rate; and Mysore Princess x NB4D2 for pupation rate, shorter larval duration and filament length (Table IV).

Reciprocal effects:

Reciprocal effects among 15 hybrids for six characters are summarised in Table V. Of interest is to note that reciprocal effects were highly significant for cocoon yield in twelve hybrids where multivoltine breeds are used as female parent. In fact highly significant for cocoon yield in twelve

Parent/ <i>Parent</i>	Origin/ <i>Origine</i>	Egg diapause/ <i>Diapause</i>	Cocoon colour and floss/ <i>Couleur du cocon, blaze</i>	Cocoon shape/ <i>Forme du cocon</i>
Hosa Mysore	CSRTI Mysore (India)	Absent/ Sans	Light green, flossy/ Vert clair, avec blaze	Spindle/ En fuseau
Kollegal Jawan	CSRTI Mysore (India)	Partial/ Partielle	White, less flossy/ Blanc, peu de blaze	Oval/ Ovale
Mysore Princess	CSRTI Mysore (India)	Absent/ Sans	White, less flossy/ Blanc, peu de blaze	Oval/ Ovale
Nistari	Eastern India/ Est de l'Inde	Absent/ Sans	Golden yellow, flossy/ Jaune d'or, avec blaze	Spindle/ En fuseau
Daizo	Japan/ Japon	Partial/ Partielle	Light green, flossy/ Vert clair, avec blaze	Spindle/ En fuseau
NB7	CSRTI Mysore (India)	Complete/ Complète	White, less flossy/ Blanc, peu de blaze	Oval/ Ovale
NB18	CSRTI Mysore (India)	Complete/ Complète	White, less flossy/ Blanc, peu de blaze	Short/ Court
NB4D2	CSRTI Mysore (India)	Complete/ Complète	White, less flossy/ Blanc, peu de blaze	Elongated and constricted/ Allongé et cintré

Table I. Information about multivoltine and bivoltine breeds used as parents.

Tableau I. Description des souches polyvoltines et bivoltines utilisées comme parents.

Characters/ Caractères	Hybrids/ Hybrides	Means squares/ Carres moyens				$2 \sigma_g^2 /$ ($2\sigma_g^2 + \sigma_s^2$)
		GCA	SCA	Reciprocal/ Réciproque	Error Erreur	
Fecundity/ Fécondité	0.012**	6041.08**	1238.59	12555.33**	1342.01	0.91
Total larval duration/ Période larvaire totale	1.41 **	0.87**	0.04	0.88**	0.13	0.98
Cocoon yield/ Rendement en cocon	9.56**	2.35*	7.83**	8.07**	0.89	0.37
Pupation rate/ Taux de nymphose	103.14**	47.15**	19.45	70.51**	14.37	0.83
Shell %/ Richesse soyeuse	1.32**	13.61**	0.45	0.96**	0.30	0.98
Filament length (x 10) / Longueur du filament (x 10)	21.52**	16.22**	1.14**	8.54	1.84	0.97

*, ** significant at 5% and 1% respectively/ significatif à 5 % et 1 % respectivement.

Table II. Analysis of variance for general and specific combining ability and reciprocal differences for multivoltine x bivoltine hybrids of *Bombyx mori* L.

Tableau II. Analyse de variance de la capacité combinatoire générale et spécifique et des différences réciproques chez les hybrides polyvoltin x bivoltin de *Bombyx mori* L.

Races/ Races	Fecundity/ Fécondité	Larval duration/ Période larvaire	Cocoon yield/ Rendement en cocon	Pupation rate/ Taux de nymphe	Shell %/ Richesse soyeuse (%)	Filament length/ Longueur du filament
NB7	H	L	-	-	-	-
NB18	-	-	L	L	H	-
NB4D2	-	-	-	L	-	-
Hosa Mysore	H	-	H	-	H	L
Kollegal Jawan	-	-	L	L	-	-
Mysore Princess	H	-	-	-	H	H
Nistari	-	H	L	H	-	-
Daizo	-	H	-	H	-	-

H = High quantities/ valeurs élevées

L = Low quantities/ valeurs faibles

Table III. General combining ability quantities in multivoltine x bivoltine hybrids of *Bombyx mori* L.

Tableau III. Valeurs de capacité combinatoire générale chez les hybrides polyvoltin x bivoltin de *Bombyx mori* L.

Hybrids/Fecundity/ Hybrides Fécondité		Larval duration/ Période larvaire	Cocoon yield/ Rendement en cocon	Pupation rate/ Taux de nymphe	Shell %/ Richesse soyeuse (%)	Filament length/ Longueur du filament
HM x NB7	H	L	-	-	L	H
KJ x NB7	-	-	-	L	-	H
MP x NB7	H	-	-	-	L	-
N x NB7	-	-	H	H	-	-
D x NB7	-	-	H	H	-	-
HM x NB18	-	-	-	-	-	-
KJ x NB18	-	-	-	-	H	-
MP x NB18	-	-	L	L	-	L
N x NB18	L	-	-	L	-	-
D x NB18	L	H	-	-	-	-
HM x NB4D2	-	-	H	H	-	-
KJ x NB4D2	L	L	-	-	-	L
MP x NB4D2	-	L	-	H	-	L
N x NB4D2	-	L	-	-	-	-
D x NB4D2	-	-	-	-	H	-

H = High quantities/ valeurs élevées

L = Low quantities/ valeurs faibles

HM = Hosa Mysore; KJ = Kollegal Jawan; MP = Mysore Princess; N = Nistari; D = Daizo

Table IV. Specific combining ability quantities in multivoltine x bivoltine hybrids of *Bombyx mori* L.

Tableau IV. Valeurs de capacité combinatoire spécifique chez les hybrides polyvoltin x bivoltin de *Bombyx mori* L.

Hybrids/ Hybrides	Fecundity/ Fécondité	Larval duration/ Période larvaire	Cocoon yield/ Rendement en cocon	Pupation rate/ Taux de nymphe	Shell %/ Richesse soyeuse (%)	Filament length/ Longueur du filament
HM x NB7	-	-	H	H	-	-
KJ x NB7	H	-	-	H	L	L
MP x NB7	-	L	H	-	L	-
N x NB7	H	-	H	-	-	-
D x NB7	H	-	-	-	-	-
HM x NB18	-	H	H	L	-	-
KJ x NB18	L	-	H	-	H	-
MP x NB18	-	-	H	L	-	-
N x NB18	-	H	H	-	-	-
D x NB18	L	-	-	-	-	-
HM x NB4D2	H	-	H	-	-	H
KJ x NB4D2	-	L	H	L	H	-
MP x NB4D2	-	-	H	-	L	-
N x NB4D2	-	L	H	L	-	L
D x NB4D2	-	-	-	-	-	L

H = High quantities/ valeurs élevées

L = Low quantities/ valeurs faibles

HM = Hosa Mysore; KJ = Kollegal Jawan; MP = Mysore Princess; N = Nistari; D = Daizo

Table V. Reciprocal differences in multivoltine x bivoltine hybrids of *Bombyx mori* L.

Tableau V. Différences entre croisements réciproques chez les hybrides polyvoltin x bivoltin de *Bombyx mori* L.

hybrids were where multivoltine breeds are used as female parent. In fact highly significant reciprocal SCA effects were found in the hybrids of NB7 with Kollegal Jawan, Nistari and Daizo for fecundity; for cocoon yield in the hybrids of NB18 with Hosa Mysore, Kollegal Jawan, Mysore Princess, Nistari and NB7 with Hosa Mysore and Mysore princess and Nistari; and NB4D2 with Nistari, Mysore Princess, Kollegal Jawan and Hosa Mysore; for shorter larval duration in the hybrids of NB18 with Hosa Mysore and Nistari; for pupation rate in the hybrids of NB7 with Hosa Mysore and Kollegal Jawan only; for shell percentage in the hybrids of Kollegal Jawan with NB18 and NB4D2; and for filament length in the hybrids of Hosa Mysore with NB4D2.

DISCUSSION

It is an unambiguous fact that multivoltine x bivoltine hybrids increase the cocoon yield as well as improve the other qualitative and quantitative traits (Singh and Hirobe, 1964; Benchamin et al., 1983). In the present study, highly significant mean squares for all the independent basic traits in the hybrids per se confirm the early findings (Pershad et al., 1986a) and indicate that environmental interaction is minimum in multivoltine x bivoltine F₁ hybrids, while occurrence of highly significant variances due to general combining ability for large number of traits (Table II) as against smaller SCA effects, suggest more additive gene action in the inheritance of these traits. This, however, indicated a departure in the inheritance pattern recorded from the combining ability studies of multivoltine races by Pershad et al. (1986a), where both additive and non-additive gene action were apparent. Predominance of GCA effects for five independent basic traits (Table III) as determined from the ratio of $2\sigma_g^2/(2\sigma_g^2 + \sigma_s^2)$ using the formula by Baker (1978) reveals the selection based on the performance of individual line should be effective for exploitation of heterosis.

Among the multivoltine races, Hosa Mysore proved to be the best combiner with significant GCA effects for four traits followed by Mysore Princess for three traits (Table III). It is important to note that Mysore Princess, the highest yielding strain (Pershad et al., 1986b) exhibited no GCA effects for cocoon yield. To identify the reason, the statistical test for heterogeneity of variance (Gilbert, 1958) is being performed now, which will be published elsewhere. In fact, combining ability studies for multivoltine strains by Pershad et al. (1986a) has confirmed that Mysore Princess possessed additive and non-additive genes, and acts as a superior combiner.

Highly significant reciprocal effects for cocoon yield in the twelve out of fifteen combinations indicate positive role of sexlimited trait in specific combinations. Nagamoto (1926) found out that quantitative traits are controlled by the sex-limited alleles of *Lm* (late maturing gene). According to Nagamoto *Lm* prolongs the duration of larval life resulting in increased body weight and cocoon weight. Data presented in Table V showed that larval duration was not found significant though cocoon weights were found highly significant. Thus it is difficult to correlate the presence of *Lm* alleles controlling the cocoon weight here. Alternatively, one may presume the positive role of cytoplasmic inheritance.

It is of interest to note that Hosa Mysore x NB7 and Mysore Princess x NB4D2 are the two superior combiners for SCA effects for most of the traits (Table IV) thereby indicating the presence of dominant or epistatic genes controlling many traits. All the three bivoltine races proved to be specific combiner for a few traits, but are common for pupation rate only. Wherever the multivoltine races like Daizo and Nistari are used, the pupation rate is found highly significant. This clearly indicates the non-additive gene accumulation in these two races for pupation rate.

CONCLUSION

The present study has confirmed that multivoltine female x bivoltine male combinations are better than the bivoltine female x multivoltine male hybrids to gain the maximum cocoon yield, while Hosa Mysore combinations are preferred for improving various quantitative traits. For race improvement programme, selective use of Hosa Mysore, Mysore Princess, Daizo, NB7 holds a better prospect.

ACKNOWLEDGEMENT

Authors are greatly indebted to Dr. Manjeet S. Jolly, Ex-Director CSR&TI, Mysore, for the facilities and encouragement and to Dr. S.K. Bhargava and other technical staff of Genetics Laboratory for their painstaking efforts in rearing and compilation of data.

REFERENCES

- BAKER R.J. (1978) Issues of diallel analysis. *Crop Sci.*, 18, 533-536.
- BENCHAMIN K.V., JOLLY M.S., BENJAMIN D.A.I. (1983) Studies on the reciprocal crosses of multivoltine x bivoltine with special reference to the use of bivoltine hybrid as a parent. *natl. Sem. Silk Res. Dev. (Bangalore) Abst.* p.13.
- GILBERT N.E.G. (1958) Diallel cross in plant breeding. *Heredity*, 12, 477-492.
- GRIFFING B. (1956) Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Aust. J. Biol. Sci.*, 9, 463-492.
- HIROBE T. (1968) Evolution, differentiation and breeding of the silkworm - the silk road, past and present, *Genetics in Asian countries. XII Inter. Cong. Genetics (Tokyo)*, 25-36.
- NAGAMOTO T. (1926) On the sex-linked inheritance of quantitative characters in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Sci. Agr. Soc. Tokyo*, 281, 155-180.
- PERSHAD G.D., DATTA R.K., BHARGAVA S.K., VIJAYAKUMAR H.V., JOLLY M.S. (1986a) Combining ability analysis in multivoltine races of *Bombyx mori* L. *Sericologia*, 26, 307-315.
- PERSHAD G.D., DATTA R.K., VIJAYAKUMAR H.V., JOLLY M.S. (1986b) Performance of some multivoltine races of silkworm (*Bombyx mori* L.). *Sericologia*, 26, 295-301.
- SINGH C.P., HIROBE T. (1964) Studies on the hybrid vigour of back crosses in the silkworm with special reference to the crosses (Tropical x Japanese) under different rearing temperatures. *Bull. Fac. Agric. (Tamagawa Univ.)*, 12, 43-53.
- SNEDECOR G.W. (1967) *Statistical methods*. 6th ed. Iowa State Univ. Press, Ames (Iowa), U.S.A.

CAPACITES COMBINATOIRES ENTRE SOUCHES POLYVOLTINES ET BIVOLTINES DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L.

R.K. DATTA* et G.D. PERSHAD Silkworm Genetics Laboratory, Central Sericultural
Research & Training Institute, Mysore 570 008, Inde.

* Adresse : Directeur technique, Central Silk Board, 39 Mahatma Gandhi road, Bangalore 560
001, Inde.

La capacité combinatoire pour le rendement en cocon et cinq autres caractères principaux indépendants chez les hybrides de cinq souches polyvoltines et trois souches bivoltines du ver à soie Bombyx mori L., a été étudiée dans des croisements dialléliques partiels 8x8 incluant les croisements réciproques, afin de sélectionner les meilleures combinaisons et de les utiliser à la place des hybrides existants ou dans un programme de sélection. Les capacités combinatoires générales quantitatives (GCA) sont très significatives pour tous les caractères et les capacités combinatoires spécifiques (SCA) quantitatives sont très significatives pour le rendement en cocon et la longueur du filament. La supériorité des quantités GCA pour cinq caractères est démontrée par le rapport de Baker, $2\sigma_g^2/(2\sigma_g^2 + 2\sigma_s^2)$ qui va de 0,83 à 0,98. Les performances des parents évaluées par les quantités GCA montrent que les souches polyvoltines Hosa Mysore et Mysore Princess ont de bonnes capacités combinatoires générales avec la souche bivoltine NB7. Les croisements des souches polyvoltines Nistari et Daizo avec NB7 et de Hosa Mysore avec la souche bivoltine NB4D2 se sont révélés les meilleures combinaisons spécifiques pour le rendement en cocon et le taux de nymphose.

INTRODUCTION

La découverte d'une vigueur marquée des hybrides F₁ chez le ver à soie pour les caractères économiques par Toyama en 1905 et l'introduction des hybrides F₁ au lieu des races pures ont marqué le début d'une ère nouvelle. En Inde, malgré des essais réussis d'introduction des hybrides F₁ en 1921, leur utilisation à grande échelle en exploitation commerciale a commencé très tard, au milieu des années 70. Cependant les hybrides de polyvoltins x bivoltins, contrairement aux hybrides bivoltins

x bivoltins, sont devenus populaires parmi les sériciculteurs. Des femelles de races locales ont été croisées avec des mâles de souches bivoltines sélectionnées et fournies par notre Institut au début des années 70. Bien que les croisements réciproques (bivoltin x polyvoltin) n'aient pas donné de résultats encourageants (Benjamin *et al.*, 1983), il n'y a eu aucun essai sérieux pour trouver des combinaisons à hautes performances en étudiant les capacités combinatoires des races polyvoltines et bivoltines. Pershad *et al.* (1986a) ont identifié quelques souches polyvoltines ayant de meilleures capacités combinatoires générales et spécifiques. Un croisement diallélique partiel de souches polyvoltines et bivoltines a été employé dans notre étude afin de déterminer quelles sont les meilleures combinaisons parmi les hybrides poly x bivoltins et le potentiel des souches en vue de leur utilisation dans un futur programme de sélection.

MATERIELS ET METHODES

Cinq souches polyvoltines et trois souches bivoltines conservées dans notre institut en lignées consanguines depuis plusieurs générations sont utilisées et décrites dans le Tableau I. Ces souches sont croisées dans toutes les combinaisons possibles y compris les croisements réciproques, mais en excluant les hybrides de deux souches de même voltinisme. Les hybrides sont élevés dans des conditions d'humidité et de température contrôlées, avec trois replicata d'une ponte prise au hasard chacun. Une analyse de variance est faite en suivant la méthode de Snedecor (1967) en considérant que les souches polyvoltines et bivoltines ont été choisies et non prises au hasard.

L'analyse de la capacité combinatoire générale et spécifique et des différences réciproques pour le rendement en cocon, la fécondité, la période larvaire, le taux de nymphose, la richesse soyeuse et la longueur du filament, a été faite en suivant le Modèle II (sans hasard) de Griffing (1956) et modifiée pour l'analyse du diallélisme partiel. Le modèle utilisé pour l'analyse de combinaison est le suivant :

$$X_{ijkl} = g_i + g_j + s_{ij} + r_{ij} + 1/bk \sum b_k + 1/bk \sum (bv)_{ijk} + 1/bc \sum \sum k_l^{eijkl}$$

où g_i et g_j sont les quantités GCA respectives du ième parent femelle et du jème parent mâle, s_{ij} et r_{ij} sont respectivement les quantités SCA pour le croisement ixj et pour les effets réciproques. Pour chaque croisement (ixj), la valeur $(g_i + g_j + s_{ij})$ est calculée et l'hypothèse nulle est testée à partir de la valeur zéro, en considérant qu'il n'y a pas de différences génotypiques parmi les F_1 .

RESULTATS

Les analyses de variance pour la capacité combinatoire générale et spécifique et les différences réciproques parmi les hybrides de polyvoltin x bivoltin chez *B. mori* L., effectuées pour la fécondité, la période larvaire, le rendement en cocon, le taux de nymphose, la richesse soyeuse et la longueur du filament, sont présentées dans le Tableau II. Les carrés moyens des hybrides sont très significatifs pour tous les caractères. De même, les carrés moyens de GCA sont très significatifs pour tous les caractères sauf le rendement en cocon mais les carrés moyens SCA sont très significatifs seulement pour le rendement en cocon et la longueur du filament. Le rapport de Baker (1978) $(2 \sigma_g^2 / (2 \sigma_g^2 + \sigma_s^2))$ varie de 0,37 à 0,98 et est très élevé pour la fécondité (0,91), la durée de la période larvaire (0,98), la richesse soyeuse (0,98) et la longueur du filament (0,97).

Effets combinatoires généraux (GCA) :

Les quantités GCA mesurent et comparent les performances des parents les uns par rapport aux autres. Parmi les races polyvoltines, Hosa mysore a montré les meilleures capacités combinatoires, suivie de Mysore Princess (Tableau III). La race indigène Nistari et la race exotique Daizo ont des capacités combinatoires supérieures pour le taux de nymphose. Pour la fécondité, les meilleures performances combinatoires sont obtenues avec NB7, Hosa Mysore et Mysore Princess ; pour le rendement en cocon avec Hosa Mysore ; pour la richesse soyeuse avec NB18, Hosa Mysore et Mysore Princess ; pour la longueur du filament avec Mysore Princess (Tableau III). Nistari et Daizo montrent les meilleures performances quant à la réduction de la période larvaire. Aucun de ces parents ne donne des capacités combinatoires générales élevées pour la totalité des caractères.

Effets combinatoires spécifiques (SCA) :

Des quantités SCA très significatives ont été obtenues pour la fécondité chez les hybrides de Hosa Mysore et Mysore Princess avec NB7 ; pour la réduction de la période larvaire chez l'hybride de Nistari et Daizo avec NB7 et de Hosa Mysore avec NB4D2 ; pour la richesse soyeuse chez les hybrides de Kollegal Jawan avec NB18 et de Daizo avec NB4D2 et pour la longueur du filament chez les hybrides de Hosa Mysore et de Kollegal Jawan avec NB7 (Tableau IV).

Les meilleurs hybrides pour les effets SCA sont Hosa Mysore x NB7 pour la fécondité, la longueur du filament, la réduction de la période larvaire et la richesse soyeuse ; Daizo x NB7 et Hosa Mysore x NB4D2 pour le rendement en cocon et le taux de nymphose ; et Mysore Princess x NB4D2 pour le taux de nymphose, la réduction de la période larvaire et la longueur du filament (Tableau IV).

Effets de réciprocité :

Les effets de réciprocité entre les 15 hybrides pour les six caractères sont donnés dans le Tableau V. Il est intéressant de noter que les effets de réciprocité sont très significatifs pour le rendement en cocon chez les 12 hybrides pour lesquels des races polyvoltines ont été employées comme parent femelle. En fait, les effets de réciprocité sont très significatifs chez les hybrides de NB7 avec Kollegal Jawan, Nistari et Daizo pour la fécondité ; pour le rendement en cocon chez les hybrides de NB18 avec Hosa Mysore, Kollegal Jawan, Mysore Princess et Nistari ; de NB7 avec Hosa Mysore, Mysore Princess et Nistari ; et de NB4D2 avec Nistari, Mysore Princess, Kollegal Jawan et Hosa Mysore ; pour la réduction de la période larvaire chez les hybrides de NB18 avec Hosa Mysore et Kollegal Jawan uniquement ; pour la richesse soyeuse chez les hybrides de Kollegal Jawan avec NB18 et NB4D2 ; et pour la longueur du filament chez les hybrides de Hosa Mysore avec NB4D2.

DISCUSSION

C'est un fait reconnu que les croisements polyvoltin x bivoltin augmentent le rendement en cocon et améliorent les autres caractères qualitatifs et quantitatifs (Singh et Hirobe, 1964 ; Benchamin et al., 1983). Dans notre étude les carrés moyens hautement significatifs pour tous les caractères de base indépendants chez les hybrides per se, confirment les résultats antérieurs (Pershad et al., 1986a) et indiquent que l'interaction de l'environnement est minimale chez les hybrides F₁ de polyvoltin x bivoltin, tandis que la présence de variations hautement significatives dues à la capacité combinatoire générale pour un grand nombre de caractères (Tableau II) par rapport aux effets plus faibles des SCA, suggère plus une action additive de gènes dans l'hérédité de ces caractères. Ce point a déjà été abordé par l'observation du profil héréditaire au cours des études effectuées par Pershad et al. (1986a) sur les capacités combinatoires des races polyvoltines, où l'action de gènes additifs et non-additifs était apparente. La prédominance des effets GCA pour cinq caractères fondamentaux indépendants (Tableau III), telle qu'elle est déterminée à partir du rapport $2 \sigma_g^2 / (2 \sigma_g^2 + \sigma_s^2)$ en utilisant la formule de Baker (1978), révèle que la sélection basée sur la performance individuelle des lignées doit être efficace pour exploiter l'hétérosis.

Parmi les races polyvoltines, Hosa Mysore montre les meilleures capacités combinatoires avec des effets GCA significatifs pour quatre caractères, suivi de Mysore Princess pour trois caractères (Tableau III). Il est important de noter que Mysore Princess, la souche la plus productive (Pershad et al., 1986b) ne montre pas d'effets GCA pour le rendement en cocon. Pour en connaître la raison, nous sommes actuellement en train de procéder au test statistique du potentiel d'hétérogénéité (Gilbert, 1958) dont les résultats seront publiés ailleurs. En fait, les études de capacité combinatoire des souches polyvoltines de Pershad et al. (1986a) confirment que Mysore Princess possède des gènes additifs et non-additifs et possède des capacités combinatoires supérieures.

Les effets réciproques très significatifs observés pour le rendement en cocon chez 12 des 15 combinaisons, démontrent le rôle positif de caractère lié au sexe dans des combinaisons spécifiques. Nagamoto (1926) a montré que des caractères quantitatifs sont contrôlés par des allèles de *Lm* (gène de maturation tardive) liés au sexe. d'après Nagamoto, *Lm* prolonge la durée de la vie larvaire ce qui entraîne une augmentation du poids corporel et du poids du cocon. Les données du Tableau V montrent que la durée de la période larvaire n'est pas significativement différente bien que le poids du cocon

soit très significativement différent. Il est donc difficile de mettre en relation ici la présence d'allèles *Lm* contrôlant le poids du cocon. On pourrait aussi invoquer le rôle positif de l'hérédité cytoplasmique.

Il est intéressant de noter que Hosa Mysore x NB7 et Mysore Princess x NB4D2 donnent les effets SCA les meilleurs pour la plupart des caractères (Tableau IV) suggérant ainsi la présence de gènes dominants ou épistatiques contrôlant de nombreux caractères. Les trois races bivoltines montrent des capacités combinatoires spécifiques pour quelques caractères, mais communes pour le taux de nymphose seulement. Lorsqu'on utilise des races polyvoltines comme Daizo et Nistari, le taux de nymphose est très significatif. Ceci indique clairement l'accumulation de gènes non-additifs chez ces deux races pour le taux de nymphose.

CONCLUSION

La présente étude confirme que les combinaisons hybrides femelle polyvoltine x mâle bivoltin sont meilleures que femelle bivoltine x mâle polyvoltin pour obtenir un rendement en cocon maximum, tandis que les combinaisons avec Hosa Mysore sont meilleures pour améliorer divers caractères quantitatifs. Dans un programme d'amélioration des races, l'utilisation sélective de Hosa Mysore, Mysore Princess, Daizo et NB7 devrait donner les meilleurs résultats.

OCCURRENCE OF A NEW STEM-BLIGHT AND COLLAR-ROT DISEASES OF MULBERRY FROM INDIA

B.R. DAYAKAV YADAV & J. SUKUMAR Moriculture Division, Karnataka State Sericulture Development Institute, Talagattapura, BANGALORE 560 062 (India)

Two stem diseases of mulberry were recorded from Ootacamund and Bangalore (India). The pathogens were identified as *Phoma mororum* Sacc. and *Phoma exigua* Desm.; *P. exigua* is recorded for the first time on mulberry from India. The disease symptoms caused by the two species were quite different. The isolation and Pathogenecity tests proved that both the species are pathogenic to mulberry.

Key words: *Phoma*, collar-rot, stem-blight, mulberry

INTRODUCTION

Species of *Phoma* have a wide geographical distribution causing diseases of many economically important plants (Wollenweber et al., 1936; Boerema et al., 1970; Kimura, 1979). Mulberry (*Morus alba* L.) is the chief source of food for silkworms (*Bombyx mori* L.) The plant is perennial and yields more than 5 harvests a year. During our routine epidemiological investigations two diseases namely the collar-rot and stem-blight caused by *Phoma* spp. were noticed, and are described in the present communication.

MATERIALS AND METHODS

The pathogens were isolated on PDA medium from the infected stem portions following standard isolation techniques. The conidia were harvested in sterilized distilled water from a 10 day old culture and automised/smeared on healthy mulberry stems. Plants receiving sterilized distilled water alone served as control. The inoculated plants were covered by sterile polyethylene bags to ensure high humidity and to protect from external contamination.

RESULTS AND DISCUSSION

On the basis of morphology and cultural characters (Boerema, et al., 1970; Boerema & Dorenbosch, 1973), the two species of *Phoma* were identified as *Phoma mororum* Sacc., and *Phoma exigua* Desm., and for the first time *P. exigua* is reported on *Morus alba* L. from India by us.

The above materials have been deposited at Commonwealth Mycological Institute (CMI), England, under IMI N 300 864 and 300 863 respectively.

The collar-rot disease caused by *P. mororum* Sacc. was observed during July to September 1985 on 12% of the plants examined in the villages adjoining Bangalore. Disease symptoms appear in the

form of brown discolouration of the stem near the ground level causing sudden withering of the leaves on affected branches. In the initial stages a white mycelial mat was observed on the infection site which later bore sub-crumpent pycnidia. The disease was found to be favoured by high soil moisture.

The stem-blight disease caused by *P. exigua* was observed on 18% of the plants at Govt. Silk Farm, Ootacamand during July to October 1985. The pathogen affects tender portions of the stem which becomes pale-brown and swollen followed by a split. The leaves wither and the stem usually breaks at the point of infection. Inside the necrotic lesions are the radially arranged concentric rings of pycnidia.

On the artificially inoculated plants, typical light brown spots appeared on the stem portions which gradually increased in size. The plants receiving *P. mororum* developed infection spots on the 7th day leading to withering of the whole shoot. Plants receiving *P. exigua* developed symptoms on the 10th day after inoculation. In the initial stages the stem started swelling at the infected region and in the next three days pycnidia were formed followed by withering of shoot tips. Repeated isolations of the pathogen from such artificially inoculated plants yielded the original fungus used for inoculation. Studies on the biological and chemical control of the diseases are under progress.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr. E. Punithalingam, Mycologist, CMI England for confirming the identity of the fungi and the Director, KSSDI for facilities.

REFERENCES

- BOEREMA G.H. and DORENBOSCH M.M.J., (1970) On *Phoma macrostomum* Mont. a ubiquitous species on woody plants. *Perseonia* 6, 49-58
- BOEREMA G.H., and DORENBOSCH M.M.J. (1973) The *Phoma* and *Ascochyta* species described by Wollenweber and Hochapfel in their study on fruit- rotting. *Studies in Mycology* N3, CVS. Baarb Publ., Netherlands, 50p.
- KATSUTARO KIMURA, (1979) Mulberry diseases of Japan, Kenpakusha Publ. Co., Japan, 163 P.
- WOLLENWEBER, H.W. and Hochapfel H., (1936) Beitrage zur kenntnis parasitarer und saprophytischer pilze. I. *Phomopsis*, *Dendrophoma*, *Phoma* und *Ascochyta* und ihre Beziehung zur Fruchtfäule. *Z. Parasitkde* 8, 561-60.

FREQUENCE D'APPARITION D'UNE NOUVELLE MALADIE DE LA ROUILLE DE LA TIGE ET DU POURRISSEMENT DU COLLET, CHEZ LE MURIER EN INDE.

B.R. DAYAKAV YADAV & J. SUKUMAR Moriculture Division, Karnataka State Sericulture Development Institute, Talagattapura, BANGALORE 560 062, Inde.

*Deux maladies de la tige du mûrier ont été observées à Ootacamand et à Bangalore (Inde). Les éléments pathogènes ont été identifiés comme **Phoma mororum** Sacc. et **Phoma exigua** Desm. C'est la première fois qu'on observe **P. exigua** sur le mûrier en Inde. Les symptômes de la maladie de ces deux espèces sont très différents. Les tests d'isolement et de pathogénicité ont montré que les deux espèces sont pathogènes du mûrier.*

INTRODUCTION

La répartition géographique des espèces du *Phoma* est très large, provoquant des maladies chez beaucoup de plantes économiquement importantes (Wollenweber *et al.* 1936 ; Boerema *et al.* 1970 ; Kimura, 1979). Le mûrier (*Morus alba* L.) est la nourriture principale des vers à soie (*Bombyx mori* L.). C'est une plante vivace qui donne plus de cinq récoltes par an. Au cours de nos recherches épidémiologiques courantes, nous avons observé deux maladies, celle du pourrissement du collet et celle de la rouille de la tige dues au *Phoma spp.* que nous décrivons dans cet article.

MATERIEL ET METHODES

Les éléments pathogènes prélevés sur la partie infectée de la tige sont isolés sur un milieu gélosé avec dextrose de pomme de terre suivant les techniques d'isolement courantes. Les conidies sont récoltées dans de l'eau distillée stérilisée sur une culture de 10 jours et sont vaporisées sur les tiges de mûrier saines. Les plantes ayant reçu seulement de l'eau distillée servent de témoin. Les plantes inoculées sont couvertes de sacs stériles de polyéthylène afin d'assurer un taux d'humidité élevé et de les protéger contre toute contamination extérieure.

RESULTATS ET DISCUSSION

D'après leurs caractères morphologiques et de culture, les deux espèces de *Phoma* sont identifiées comme *Phoma mororum* Sacc. et *Phoma exigua* Desm., qui est ainsi observé pour la première fois sur *Morus alba* L. d'Inde.

Les matériaux ci-dessus cités sont déposés à l'Institut Mycologique du Commonwealth (CMI), Angleterre, respectivement sous les N IMI 300864 et 300 863.

La maladie du pourrissement du collet provoquée par le *P. mororum* Sacc. a été observée de juillet à septembre 1985 sur 12% des plantes examinées dans les villages proches de Bangalore. Les symptômes de la maladie apparaissent sous la forme d'une décoloration brune de la tige près du niveau du sol, provoquant une brusque flétrissure des feuilles des branches contaminées. Dans un premier temps, on peut observer un tapis mycélien blanc sur l'emplacement de l'infection qui portera plus tard des picnides. La maladie est favorisée par un terrain très humide.

La maladie de la rouille de la tige provoquée par *P. exigua* a été observée sur 18% des plantes de la Ferme Séricicole gouvernementale à Ootacamond, pendant les mois de juillet à octobre 1985. Les éléments pathogènes affectent les parties tendres de la tige, laquelle devient marron clair et gonflée puis se fend. Les feuilles se flétrissent et généralement la tige se casse au point d'infection. A l'intérieur des lésions nécrotiques, on observe les anneaux concentriques des picnides disposés radialement.

Sur les plantes inoculées artificiellement, des taches typiques marron clair apparaissent sur les parties de la tige qui grossissent petit à petit. Les plantes ayant reçu *P. mororum* ont développé des taches d'infection à partir du 7 jour, jusqu'à ce que la rouille gagne la tige entière. Sur les plantes ayant reçu *P. exigua*, les symptômes apparaissent le 10 jour après l'inoculation. Dans un premier temps, la tige commence par enfler au niveau de la partie infectée et les 3 jours suivants les picnides se forment et sont suivies d'une flétrissure des rejets. Les isollements répétés de l'élément pathogène provenant de ces plantes inoculées artificiellement ont aboutit au champignon original utilisé pour l'inoculation. Les études sur le contrôle biologique et chimique de ces maladies est en cours.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Dr. E. Punithalingam, Mycologiste, CMI, Angleterre pour sa confirmation de l'identité des champignons et le Directeur, KSSDI pour l'utilisation des installations.

THE COURSE OF MEIOSIS IN INDIAN FEMALE ERI SILKWORM, *PHILOSAMIA RICINI*

O. PREMILA CHANU, N. IBOTOMBI, S.C. KUNDU and Th. BHAGIRATH Department of Life Sciences, Manipur University, Imphal 795003, India.

The course of meiosis was studied in female eri silkworm, Philosamia ricini by analysing the frequency of oogonial cells using conventional airdrying-Giemsa staining technique. Meiosis begins from the onset of third instar. Leptotene appears to last from third upto late fourth instar, zygotene from mid-fourth instar upto late pupal stage and post-pachytene oocyte cells from the onset of fifth instar upto late pupal stage, and diakinetid cells from the beginning of cocoon life and upto the end. Metaphase I cells appear from the fourth day of larval cocoon life. At the end of pupal stage only metaphase I cells are seen. Meiosis is arrested at metaphase I till fertilisation in female eri silkworm. Egg formation starts at the pre-emergent moth stage, number of eggs increasing after emergence.

INTRODUCTION

In Lepidoptera, though the chromosome number of over 1000 species including about twenty five saturniid species has been reported (see Traut and Mosbacher, 1968; Robinson, 1971; Ennis, 1976; Gupta and Narang, 1980), most of the reports dealt with the metaphase I count in the males. In Bombycidae, genetical and cytological analysis of meiosis in both male and female *Bombyx mori* have yielded valuable insight into the mechanism of meiosis. The eri silkworm *Philosamia ricini* (Saturniidae) constitutes a favourable system for cytogenetical studies for several reasons: crossing over and chiasma formation are limited to the male-sex (Narang and Gupta, 1979), chromosome numbers are comparatively low ($2n = 28$), it can be maintained in the laboratory easily and its multivoltine nature. However, genetical and cytological studies in eri silkworm are not available as yet except preliminary meiotic study (Narang and Gupta, 1979) and pachytene synaptonemal complex analysis (Bhagirath *et al.*; Ibotombi *et al.*; in press). In spite of the importance of silkworms as genetic tools the detailed course of meiosis has not been studied in any of the silkworm species. The purpose of the present study is to report critically the sequence of meiotic stages found during different developmental stages of female *Philosamia ricini*.

MATERIAL AND METHODS

Philosamia ricini, the domesticated eri silkworm, collected from local Government Farms and reared in our laboratory constituted the experimental material. The larvae were maintained at room temperature (20 to 24°C) and fed with castor (*Ricinus communis*) leaves.

The method used for cytological preparation is a modification of the conventional air drying technique. The gonads were dissected out under the Stereo binocular dissecting microscope, from sixth day of second instar upto moth. Only female gonads were used. After a pretreatment with hypotonic solution (0.4% KCl) for 20 to 30 minutes, the gonads were fixed in methanol-acetic acid (3:1) for 30 minutes. One gonad was then placed on an alcohol cleaned-slide with one drop of the

fixative and punctured there with a fine tungsten needle and teased apart. The cells were thus liberated to form a smear which was then flooded with more drops of the fixative and were allowed a quick to and from movement for 2-3 times with a needle. The gonad of 2nd to 3rd instar larvae were very small and so were squashed instead of puncturing.

The slides were then air-dried at room temperature in a dust free chamber which were then fixed further by dipping momentarily in glacial acetic acid solution and dried again as before.

The slides were stained in 10% giemsa solution, adjusted to pH 6.8 by using phosphate buffer, for 20 to 30 minutes. The slides were then washed in distilled water and air-dried. The occurrence and frequency of meiotic cells in successive stages of life cycle were noted. The total number of cells observed in each developmental stage of the worms ranges from 100 to 250.

RESULTS AND DISCUSSION

The present study of the sequential progression of female meiotic cells with the developmental age of the worm gives not only the approximate duration of the specific stages but also the different behaviours of the chromosomes at these stages.

The distribution of the frequencies of meiotic stages are given in Fig. 1. The graph illustrates the progression of the different stages of meiosis in oocytes of *P. ricini* on successive days of the instars.

Preleptotene cells (Fig. 2a) could be seen only from the 8th day of second instar. The nuclei are larger than those of the mitotic interphase cells and the chromatin threads cannot be identified. This indicates that the gonadal cells are transformed from mitotic to meiotic from the same onwards. This stage continues upto fourth instar, frequency being highest on day 12 of second instar as shown in Fig. 1.

Not only the meiotic cells, the mitotic prometaphase and metaphase cells are observed from the second to fourth instar larvae which suggest that there is a mitotic division during early gonadal development from which the oögonial and the nurse cells originate as described by Rasmussen (1976) in *Bombyx mori*. These mitotic chromosomes lack identifiable constrictions.

Meiosis starts in the beginning of third instar as leptotene cells (Fig. 2b). This is characterised by unpaired diffused chromosomes and can be identified from the first day of third instar upto fourth instar, frequency being highest on day 5 of third instar. This observation is in strong contrast to that of Narang and Gupta (1979) that meiosis commences in 4-5th instar and are arrested at late prophase I till the eggs are laid. Our observation is in agreement with the work of Murakami and Imai (1974) in *Bombyx mori* and *B. mandarina*. During zygotene (Fig. 2c) the homologues show presynaptic configurations as is usually the case in other animals and spans from 6th day of third instar upto end of fifth instar frequency of which being the highest on day 6 of fourth instar. Pachytene cells (Fig. 2d), characterized by the complete pairing of all the homologous chromosomes into 14 bivalents can be identified from 5th day of fourth instar upto end of pupal stage with the highest frequency on day 1 of fifth instar. The bivalents become shorter and thicker as the stage progresses.

At late leptotene the telomeric ends of the chromosomes, the attachment plates, are attached to a particular area of the nuclear membrane, the attachment zone (Fig. 2b) whereby establishing the bouquet stage. The bouquet stage persists till late zygotene and are dissociated at pachytene.

From day 2 of fifth instar onwards after pachytene two courses of further morphological developmental patterns can be observed; the oocyte proceeds to diplotene (Fig. 2e) that attains maximum frequency on day 6 of pupal life and further stages while the nurse cell (Fig. 2h,i) degenerates. The frequency of the post pachytene oocytes viz., diplotene, diakinesis and metaphase I is much lower than that of degenerating nurse cells which suggests that the nurse cells and oocytes in silkworms follow a similar morphology of developmental pattern upto pachytene after which they diverge. This observation tallies with the works of Miya et al. (1970); and Rasmussen (1976) in *B. mori*. Diakinesis stage (Fig. 2f) can be observed only from beginning to end of cocoon life, frequency being maximum in the middle of pupal life. At this stage the chromosomes become much condensed and shortened. During diplotene, diakinesis and metaphase I (Fig. 2e,f,g) the homologues are co-oriented parallelly which suggests that there is no crossing over and chiasma formation in the females of this species as observed by earlier workers in *B. mori* (e.g., Sturtevant, 1915; Rasmussen,

1976). The appearance of metaphase I from the fourth day of cocoon life and reaching the maximum frequency on the 13th day of cocoon life and immediately forming eggs in the pre-emergent moth suggest that the cells are arrested at metaphase I as observed in *Bombyx* females (see Rasmussen, 1976). At metaphase I, the bivalents become much condensed and appear as small dumb-bell shaped bodies (Fig. 2g). The latter stages probably progress within a very short time.

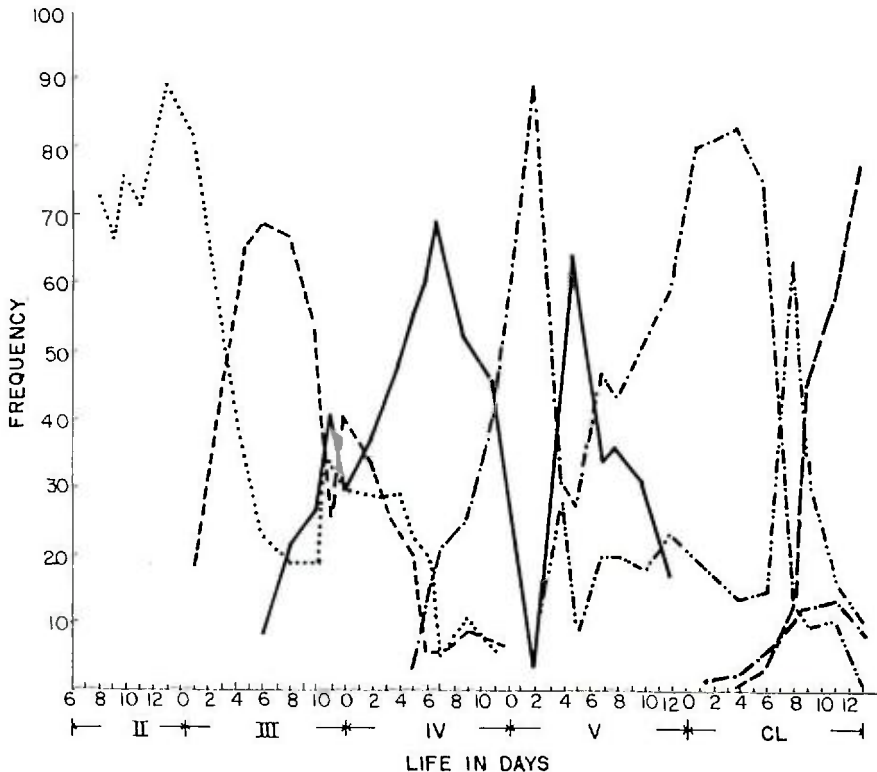


Figure 1. Graph shows the progress of the different stages of meiosis in female eri silkworm.

Figure 1. Progression des différents stades de la méiose chez la femelle du ver à soie eri.

II : 2nd instar/ 2ème âge, III : 3rd instar/ 3ème âge, IV : 4th instar/ 4ème âge, V : 5th instar/ 5ème âge; CL : Cocoon life/ Vie dans le cocon.

Preleptotene/ Préleptotène Leptotene/ Leptotène -----, Zygotene/ Zygotène _____, Pachytene/ Pachytène -.-.-.-., Diplotene/ Diplotène -.-.-.-., Diakinesis/ Diacinese _____, Metaphase I/ Métaphase I _____

Figures 2 a-i. Air-dried Giemsa-stained microphotographs of different stages of meiosis in female eri silkworms.

(a) **Preleptotene on day 8 of second instar.** The chromatin material is condensed into dot like structure (CM).

(b) **Leptotene on day 4 of third instar.** The telomeric ends of the chromosomes are attached to a restricted region of the nuclear membrane i.e., the attachment zone (AZ). Many chromosomes form a loop (L).

(c) **Mid zygotene on day 8 of third instar.** paired (P) and unpaired (UP) regions are present in several bivalents.

(d) **Pachytene on day 5 of fourth instar.** All the 28 homologues are completely paired into 14 bivalents (BV).

(e) **Diplotene on day 2 of fifth instar.** Disjunction of the homologues (H) occurs parallelly throughout the length of each bivalent.

(f) **Diakinesis on day 2 of pupal life.** Homologous chromosomes are completely separated, but the ends remain proximal forming a ring-shaped structure. The chromosomes are extremely condensed and thickened.

(g) **Metaphase I on day 3 of pupal life.** The bivalents form small, dense and dumb-bell-shaped bodies (BV).

(h) **Degenerating nurse cell on day 2 of fifth instar.** The bivalents are irregular in shape and condensed.

(i) **Degenerating nurse cell on day 4 of fifth instar.** The chromatin material is irregular-shaped and has disorganized structure.

Bar = 10 micron for Figure 2a-i.

Figure 2 a-i. Microphotographies après coloration Giemsa et séchage à l'air, montrant les différents stades de la méiose chez la femelle du ver à soie eri.

(a) **Stade préleptotène au 8ème jour du 2ème âge.** Le matériel chromatique est condensé en structures en forme de points (CM).

(b) **Stade leptotène au 4ème jour du 3ème âge.** Les extrémités télomériques des chromosomes sont fixées à une région précise de la membrane nucléaire : la zone d'attachement (AZ). De nombreux chromosomes forment des boucles (L).

(c) **Milieu du stade zygotène au 8ème jour du 3ème âge.** Les régions appariées (P) et non-appariées (UP) sont visibles chez plusieurs bivalents.

(d) **Stade pachytène au 5ème jour du 4ème âge.** Les 28 homologues sont tous entièrement appariés en 14 bivalents (BV).

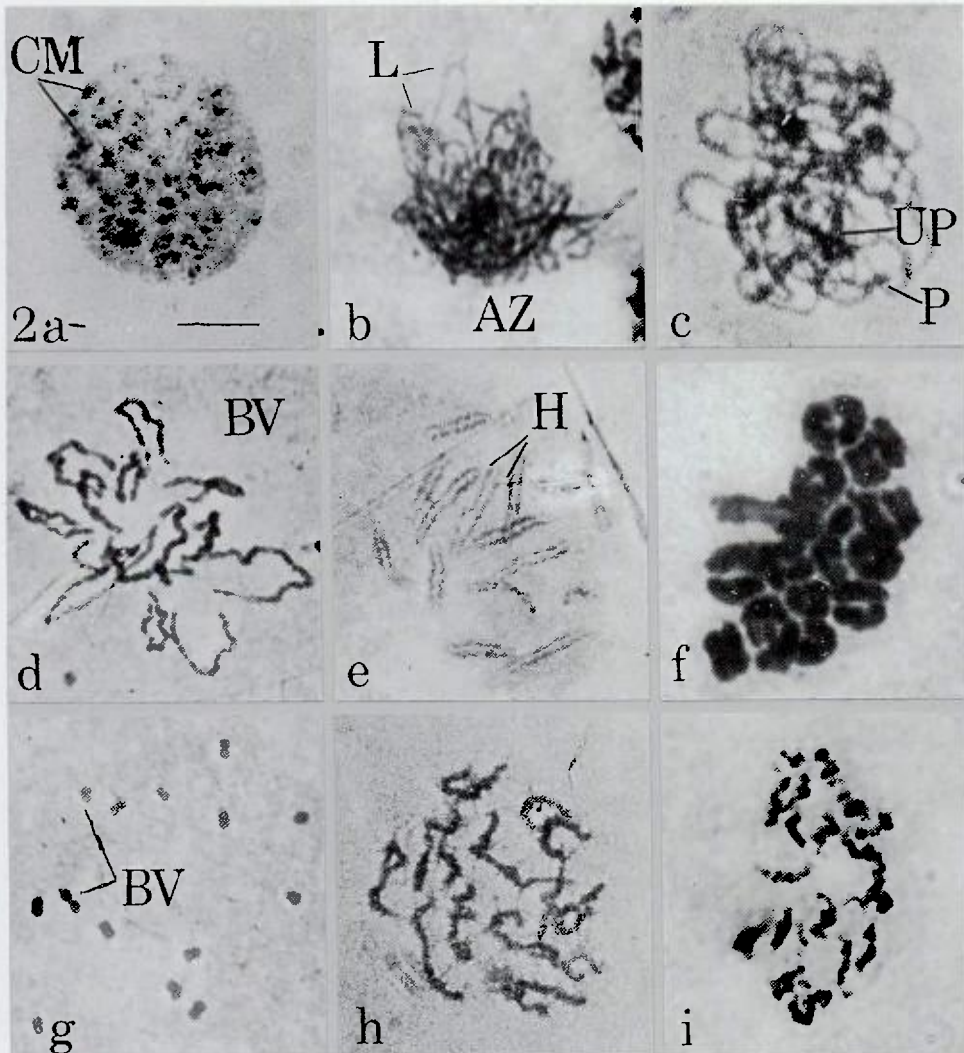
(e) **Stade diplotène au 2ème jour du 5ème âge.** La disjonction des homologues (H) se produit parallèlement sur toute la longueur de chaque bivalent.

(f) **Diacinèse au 2ème jour de la nymphose.** Les chromosomes homologues sont complètement séparés, mais leurs extrémités restent proches, formant une structure en anneau. Les chromosomes sont extrêmement condensés et épaissis.

(g) **Métaphase I au 3ème jour de la nymphose.** Les bivalents prennent la forme d'haltères (BU).

(h) **Cellule mère en dégénérescence au 2ème jour du 5ème âge.** Les bivalents sont de forme irrégulière et condensée

(i) **Cellule mère en dégénérescence au 4ème jour du 5ème âge.** Le matériel chromatique a une forme irrégulière et une structure désorganisée.



The absence of primary constriction from the late mitotic prophase and metaphase chromosomes and the extreme condensation of meiotic metaphase I chromosomes into a round mass showing no morphological constriction also confirms the holokinetic nature (non localised centromeres) of the chromosomes in the females of this species as has been observed in *B. mori* and *B. mandarina* (Murakami and Imai, 1974; Rasmussen and Holm, 1982).

Figure I concludes that there is demarcation in between beginnings and also in between ends of successive stages of meiosis, earlier cells being converted to more advanced cells and so on.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CSIR, New Delhi.

REFERENCES

- BHAGIRATH Th., KUNDU S.C., IBOTOMBI N., Pachytene synaptonemal complex analysis in Indian eri silkworms. I. *Philosamia ricini*. *Sericologia* (in press).
- ENNIS T.J. (1976) Sex chromatin and chromosome numbers in Lepidoptera. *Can. J. Genet. Cytol.*, 18, 119-130.
- GUPTA M.L., NARANG R.C. (1980) Chromosome number, sex chromatin and sex chromosome mechanism in some saturnid moths of India. *Entomon.*, 5(1), 13-18.
- IBOTOMBI N., BHAGIRATH Th., KUNDU S.C. Pachytene synaptonemal complex analysis in Indian eri silkworms. II. *Philosamia cynthia*. *Sericologia* (in press).
- MIYA K., KURIHARA M., JANIMURA J. (1970) Electron microscope studies on the oogenesis of the silkworm, *Bombyx mori* L. III. *J. Fac. Agric. Iwate Univ.*, 10, 59-83.
- MURAKAMI A., IMAI H.T. (1974) Cytological evidence for holocentric chromosomes of the silkworms, *Bombyx mori* and *B. mandarina*, (Bombycidae, Lepidoptera). *Chromosoma (Berl.)*, 47, 167-178.
- NARANG R.C., GUPTA M.L. (1979) Chromosomal studies in eri silk moth, *Philosamia ricini* Hutt. (Lepidoptera, Saturniidae). *Entomon.*, 4(3), 217-221.
- RASMUSSEN S.W. (1976) The meiotic prophase in *Bombyx mori* females analyzed by three-dimensional reconstructions of synaptonemal complexes. *Chromosoma (Berl.)*, 54, 245-293.
- RASMUSSEN S.W., HOLM P.B. (1982) The meiotic prophase in *Bombyx mori* females analyzed by three dimensional reconstructions of synaptonemal complexes. *Insect Ultrastructure*, vol. 1, 61-85.
- ROBINSON R. (1971) *Lepidoptera genetics*. Pergamon press, Toronto.
- STURTEVANT A.H. (1915) No crossing over in the female of the silkworm moth. *Amer. Naturalist*, 49, 42-44.
- TRAUT W., MOSBACHER G.C. (1968) Geschlechts chromatin bei Lepidopteren. *Chromosoma*, 25, 345-356.

LE DEROULEMENT DE LA MEIOSE CHEZ LA FEMELLE DU VER A SOIE ERI INDIEN, *PHILOSAMIA RICINI*

O. PREMILA CHANU, N. IBOTOMBI, S.C. KUNDU et Th. BHAGIRATH Department of Life Sciences, Manipur University, Imphal 795003, Inde.

*Nous avons étudié le déroulement de la méiose chez la femelle du ver à soie eri *Philosamia ricini* en analysant la fréquence des ovogonies par la technique habituelle de coloration Giemsa. La méiose commence au début du 3ème âge larvaire. Le stade leptotène semble durer du 3ème à la fin du 4ème âge, le stade zygotène du milieu du 3ème âge jusqu'à la fin du 5ème âge, le stade pachytène du milieu du 4ème âge jusqu'à la fin de la nymphose, les ovocytes post-pachytène du début du 5ème âge jusque vers la fin de la nymphose et les cellules diacinétiques à partir du début du cocon jusqu'à la fin. Les cellules en métaphase I apparaissent à partir du 4ème jour de la vie dans le cocon. A la fin de la nymphose, on observe uniquement des cellules en métaphase I. La méiose s'arrête en métaphase I jusqu'à la fécondation chez la femelle du ver à soie eri. La formation des oeufs débute au stade de la pré-émergence du papillon, le nombre d'oeufs augmentant après l'émergence.*

INTRODUCTION

Bien que le nombre de chromosomes ait été étudié chez plus de 1 000 espèces de Lépidoptères, y compris environ 25 espèces de Saturniides (Traut et Mosbacher, 1968 ; Robinson, 1971 ; Ennis, 1976 ; Gupta et Narang, 1980), la plupart de ces études concernent le dénombrement au cours de la métaphase I chez les mâles. Chez les Bombycidae, l'analyse génétique et cytologique de la méiose chez le mâle et la femelle de *Bombyx mori*, a apporté une meilleure connaissance du mécanisme de la méiose. Le ver à soie eri *Philosamia ricini* (Saturniidae) constitue un modèle approprié à l'étude cytogénétique pour plusieurs raisons : le croisement et la formation du chiasma sont limités au sexe masculin (Narang et Gupta, 1979), le nombre de chromosomes est comparativement faible ($2n = 28$), son élevage en laboratoire est facile, il est polyvoltin. Cependant, on ne dispose pas jusqu'à présent d'études génétiques et cytologiques chez le ver à soie eri, à l'exception d'une étude préliminaire sur la méiose (Narang et Gupta, 1979) et d'une analyse du complexe synaptonémal du pachytène (Bhagirath *et al.* ; Ibotombi *et al.*, sous presse). Malgré l'importance des vers à soie comme matériels génétiques, le déroulement de la méiose n'a été étudié en détail chez aucune des espèces de ver à soie. Le but de notre étude est de décrire de manière critique la séquence des phases méiotiques au cours des différents stades du développement de la femelle de *Philosamia ricini*.

MATERIELS ET METHODES

Le matériel expérimental est constitué par le ver à soie cri domestique *Philosamia ricini*, collecté dans des Fermes d'Etat de la région et élevé dans notre laboratoire. Les larves sont maintenues à température ambiante (20 à 24 °C) et nourries avec des feuilles de ricin (*Ricinus communis*).

La méthode employée pour la préparation cytologique est une modification de la technique traditionnelle par séchage à l'air. Les gonades sont disséquées sous microscope binoculaire à partir du 6ème jour du 2ème âge larvaire jusqu'au stade du papillon.

Seules les gonades femelles sont utilisées. Après un pré-traitement dans une solution hypotonique (0,4 % KCl) pendant 20-30 minutes, les gonades sont placées dans un mélange méthanol-acide acétique (3:1) pendant 30 minutes. Chaque gonade est ensuite placée sur une lame de verre nettoyée à l'alcool avec une goutte de fixateur, crevée à l'aide d'une aiguille fine en tungstène et étalée. Les cellules sont alors libérées et forment un frottis auquel on ajoute des gouttes de fixateur remuées avec l'aiguille par un mouvement aller-retour effectué deux à trois fois. Les gonades des 2ème et 3ème âges sont très petites et sont écrasées au lieu d'être crevées. Les lames sont ensuite séchées à l'air à température ambiante dans une pièce exempte de poussière, puis elles sont fixées une nouvelle fois par un trempage dans une solution d'acide acétique glacial et séchées de nouveau.

Les lames sont trempées pendant 20 à 30 minutes dans une solution Giemsa à 10 % ajustée à pH 6,8 grâce à un tampon phosphate. Les lames sont ensuite rincées dans de l'eau distillée et séchées à l'air. La présence et la fréquence des cellules méiotiques au cours des stades successifs du cycle vivant, sont enregistrées. Le nombre total de cellules observées au cours de chaque stade de développement du ver à soie varie de 100 à 250.

RESULTATS ET DISCUSSION

La présente étude sur la progression séquentielle des cellules méiotiques femelles en fonction du stade de développement du ver à soie donne la durée approximative des phases spécifiques et également les différents comportements des chromosomes au cours de ces phases.

La Figure 1 montre la répartition des fréquences des phases méiotiques. Le graphique montre la progression des différentes phases de la méiose chez les ovocytes de *P. ricini* au cours des différents âges larvaires.

Les cellules au stade préleptotène (Fig. 2a) sont visibles seulement à partir du 8ème jour du 2ème âge. Les noyaux sont plus gros que ceux des cellules en interphase mitotique et les brins de chromatine ne peuvent pas être identifiés. Cela indique que les cellules de la gonade passent de la mitose à la méiose à partir de ce jour-là. Ce stade se poursuit jusqu'au 4ème âge, la fréquence maximum se situant au 12ème jour du 2ème âge comme le montre la Figure 1.

Du 2ème au 4ème âge, on observe non seulement les cellules méiotiques, mais aussi les cellules mitotiques en prémétaphase et en métaphase, ce qui indique qu'une division mitotique a lieu au début du développement des gonades, qui est à l'origine des cellules nourricières et ovogoniales comme l'a décrit Rasmussen (1976) chez *Bombyx mori*. Ces chromosomes mitotiques n'ont plus de constriction identifiables.

La méiose commence au début du 3ème âge avec les cellules en phase leptotène (Fig. 2b). Ceci est caractérisé par des chromosomes non appariés et diffus et peut être identifié dès le 1er jour du 3ème âge jusqu'au 4ème âge, la fréquence la plus élevée se situant au 5ème jour du 3ème âge. Cette observation contredit fortement celle de Narang et Gupta (1979) selon lesquels la méiose commence au 4ème-5ème âges et est interrompue en fin de prophase I jusqu'au moment de l'oviposition. Notre observation concorde avec les travaux de Murakami et Imai (1974) chez *Bombyx mori* et *B. mandarina*. Au cours du stade zygotène (Fig. 2c) les chromosomes homologues donnent des configurations présynaptiques comme c'est habituellement le cas chez d'autres animaux, et ce stade s'étend du 6ème jour du 3ème âge jusqu'à la fin du 5ème âge, avec la fréquence la plus élevée au 6ème jour du 4ème âge. Les cellules au stade pachytène (Fig. 2d), caractérisées par l'appariement complet de tous les chromosomes homologues en 14 bivalents, peuvent être identifiées à partir du

5ème jour du 4ème âge jusqu'à la fin de la nymphose avec la fréquence la plus élevée au 1er jour du 5ème âge. Les bivalents raccourcissent et s'épaississent au fur et à mesure que le stade avance.

A la fin du leptotène, les extrémités télomériques des chromosomes et les plaques de fixation sont attachées à un endroit particulier de la membrane nucléaire, la zone d'attachement (Fig. 2b), là où s'établit le stade en bouquet. Le stade en bouquet perdure tard au stade zygotène et se dissocie au pachytène.

A partir du 2ème jour du 5ème âge, après le pachytène, on peut observer deux profils de développement morphologique, l'ovocyte passe au stade diplotène (Fig. 2e) qui atteint sa fréquence maximale au 6ème jour de la nymphose, et poursuit son évolution, tandis que la cellule mère (Fig. 2h,i) dégénère. La fréquence des ovocytes post-pachytène, c'est-à-dire diplotène, diacinèse et métaphase I, est bien plus faible que celle des cellules mères en dégénérescence, ce qui suggère que les cellules mères et les ovocytes chez le ver à soie ont la même évolution morphologique jusqu'au pachytène et divergent ensuite. Cette observation concorde avec les résultats de Miya *et al.* (1970) et de Rasmussen (1976) chez *B. mori*. Le stade de la diacinèse (Fig. 2f) peut être observé seulement du début à la fin de la vie dans le cocon, la fréquence maximale se situant au milieu de la nymphose. A ce stade les chromosomes deviennent plus condensés et raccourcissent. Pendant le diplotène, la diacinèse et la métaphase I (Fig. 2e,f,g), les homologues sont orientés parallèlement ce qui suggère qu'il n'y a pas de crossing-over et de formation de chiasmas chez les femelles de cette espèce comme l'ont déjà observé certains chercheurs chez *B. mori* (par exemple, Surtevant, 1915 ; Rasmussen, 1976). L'apparition de la métaphase I à partir du 4ème jour de la vie dans le cocon, atteignant la fréquence maximum au 13ème jour de la vie dans le cocon, et la formation d'oeufs immédiatement chez le pré-imago, suggèrent que les cellules sont bloquées en métaphase I comme cela a été observé chez les femelles de *Bombyx mori* (Rasmussen, 1976). A la métaphase I, les bivalents deviennent plus condensés et apparaissent comme des petits corps en forme d'haltères (fig. 2g). Les stades suivants se déroulent probablement en très peu de temps.

L'absence de constriction primaire chez les chromosomes de la fin de la prophase et de la métaphase mitotiques et l'aspect concentré des chromosomes de la métaphase I méiotique en une masse ronde sans constriction morphologique, confirment la nature holocinétiq (centromères non localisées) des chromosomes chez les femelles de cette espèce, comme dans le cas de *B. mori* et *B. mandarina* (Murakami et Imai, 1974 ; Rasmussen et Holm, 1982).

On peut conclure d'après la Figure 1 qu'il n'existe pas de démarcation entre le début et la fin des stades successifs de la méiose, les cellules du départ se transformant en cellules plus avancées, et ainsi de suite.

FLOWERING PROCESS AND ANTHESIS OF MULBERRY UNDER TEMPERATE CLIMATIC CONDITIONS (KASHMIR VALLEY)

A.K. TIKU, B.B. BINDROO and R.K. PANDIT Division of Sericulture, SK University of Agricultural Sciences and Technology, P.B. 23, G.P.O., Srinagar 190 001, Mirgund, Kashmir, India.

Flowering process and anthesis was studied in 30 varieties of mulberry (Morus). The time taken for complete opening of first buds ranges from one to seven days. The varieties are either male, female, dioecious, monoecious or mixed. The time taken for attaining maturity of female flowers within a variety ranged from a minimum of 1-5 days in Kanva-2 (M. alba) to a maximum of 14-18 days in Kokuso-20 (M. multicaulis). The period for attaining maturity of male flowers within a variety ranged from 4-7 days in Chinese White (M. alba) to as high as 21-23 days in Obawase (M. bombycis). The receptivity period of female flowers for a variety ranges from 5-17 days. The dehiscence of anthers is complete within 5 days to a period of 11 days.

Key words: Morus, mulberry, anthesis, flowering process, sex behaviour.

INTRODUCTION

Mulberry belonging to genus *Morus* comprises about 35 species (Anonymous, 1975). The silk mulberry is being cultivated mostly in China, Japan, India, Russia and Korea. There are hundreds of silk mulberry varieties belonging to different species. About the classification of mulberry still there is lot of confusion. The criteria being used for classification include length of the style of the female flower (Koidzumi, 1917 quoted from Katsumata, 1971), shape of the idioblast (Katsumata, 1971) and other morphological characters. This is further being confused by the sex of the mulberry trees which is not consistent from species to species and variety to variety.

Mulberry is dioecious or monoecious in nature. The heterozygosity of the plants gives lot of scope for its improvement for the production of new varieties with increased leaf yield, rich in nutrition. Breeding new varieties by artificial crossing, a breeder ought to know the behaviour of the mulberry plants, vis-a-vis sex of the plants, the time of flowering, dehiscence of anthers, receptivity of the female flower, etc. In tropical regions this does not pose a big problem as the mulberry trees can bear flowers all the year and in response to pruning of the twigs. Studies on anthesis in mulberry have been carried out previously in tropical region by Das *et al.* (1970). However, in temperate climate like Kashmir valley where the active growth period for mulberry is limited beginning from the end of March till October, there is no available literature regarding the onset of flowering and flowering process and the present study forms a part of contribution in this direction.

MATERIAL AND METHODS

The material consisted of 30 mulberry varieties (Table I) including both exotic and indigenous belonging to four species of *Morus* viz., *M. alba*, *M. bombycis*, *M. multicaulis* and *M. indica*, maintained in the germ plasm bank of the Division of Sericulture (SKUAST), Mirgund, Kashmir. The observations were recorded in the year, 1985 on the trees numbering from a minimum of 7 to 20 in different varieties. The characters observed were the date of commencement for opening of first bud, time taken for complete opening of buds in the variety, time taken for maturity of female flowers, receptivity period, time taken for attaining of maturity of male flowers and dehiscence period. The method followed for characterization of different parameters were as described by Das *et al.* (1970). These data were computed for the variety as a whole. The sex of the variety was determined from the presence of the male and/or female flowers on the trees.

RESULTS

The data recorded for various characters is presented in Table I. The first opening of buds in the mulberry after a prolonged winter dormancy takes place on 28th March in the variety Chinese White. The process is completed by 15th April in the variety Accession No.18. The time taken for complete opening of buds in the varieties ranges from one to seven days. The least time is taken by the varieties Goshocrami, Kokuso-21, Kasuga, Limoncina, Acc. No. 18 which is 1 to 2 days and a maximum of 1-7 days by varieties Tomieso, Shimanouchi and Francee. Rest of the varieties fall within this range. The sex of the varieties under report is either male, female, dioecious, monoecious or mixed. 14 varieties are pure female, 2 are pure male, one is strictly dioecious and 9 are monoecious. 2 female varieties show male catkins and monoecious catkins also. Two varieties are predominantly dioecious. The peculiar features observed about the sex include that some varieties have exclusively male or female flowers. The sex is expressed differently in some dioecious and monoecious varieties under report. The variety Goshocrami shows predominantly dioecious nature but monoecious plants as well as monoecious catkins are also present. Some of the monoecious varieties either show predominantly female nature viz., Obawase, Kairyoroso or predominantly male nature viz., Kokuso-27, Senmatsu, Francee. A peculiar phenomenon is observed in variety Enshutakasuke where the predominantly monoecious condition also shows dioecious plants with some monoecious catkins and in male plants, monoecious catkins bear predominantly male flowers and in the female plants the situation being vice versa. In Kanva-2 variety which is a female, some male catkins were found at a latter stage as well as monoecious catkins.

The time taken for attaining maturity of female flowers within a variety is minimum of 1-5 days in variety Kanva-2 and maximum of 14-18 days in Kokuso-20. The receptivity period of female flowers for a variety ranges from 5 to 17 days. The time taken for attaining of maturity of male flowers in a variety is as low as 4-7 days in variety Chinese White and as high as 21-23 days in variety Obawase. The dehiscence of anthers is complete in a variety within 5 days as in varieties Goshocrami and Chinese White to a period of 11 days in variety Kokuso-27.

DISCUSSION

The results described above and referred in Table I give an overall picture of behaviour of mulberry varieties as to their flowering time, flowering process and variation in sex under temperate climate. It is observed that there is no synchronization in the opening of first bud/buds, within and amongst the variety/varieties. Interesting results observed as to the sex behaviour of the mulberry plants indicate that the sex in mulberry is not clearly differentiated at specific as well as at varietal level as the plants must be possessing potentially both male and female determining genes, the effect of which may be expressing differently under the influence of external stimuli such as climate. Earlier workers (Osawa, 1920; Sinoto, 1929) suggested that the presence of two large sized chromosomes play a role in the sex determination in dioecious taxa of *Morus*. Gill and Gupta (1979) have demonstrated that these two chromosomes have no role in sex determination and suggest that sex mechanism is genic rather than chromosomal. Schaffner (1936) is of the opinion that sex in *Morus* is

Species and variety/ <i>Espèce et variété</i>	Sex/ <i>Sexe</i>	Opening of first buds/ <i>Débourrement des premiers bourgeons</i>	Complete opening of buds (days)/ <i>Débourrement complet (jours)</i>	Maturity of female flower (days)/ <i>Maturité de la fleur femelle (jours)</i>	Receptivity period (days)/ <i>Période de réceptivité (jours)</i>	Maturity of male flower (days)/ <i>Maturité de la fleur mâle (jours)</i>	Dehiscence period (days)/ <i>Période de déhiscence (jours)</i>	Other features/ <i>Autres composantes</i>
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Morus alba								
Kanva-2	F	April 1	2-5	1-5	17	Not observed/ <i>Non observé</i>	Not observed/ <i>Non observé</i>	Also male catkins found at a later stage as well as monoecious catkins/ <i>Châtons mâles à un stade plus avancé, également châtons monoïques</i>
Chinese White	M	March 28	1-3			4-7	5	
Serpentina	F	April 6	3-4	7-11	6			
Limoncina	Mono	April 7	1-2	12-13	8	17-19		Only monoecious catkins, male flower appearance is much later than female flower. No dehiscence observed/ <i>Châtons monoïques uniquement, la fleur mâle apparaît bien plus tard que la fleur femelle. Pas de déhiscence</i>
Chattatul (Mirgund)	Mono	April 5	1-6	5-10	12	9-15	8	Predominantly monoecious; monoecious catkins also/ <i>Prédominance monoïque, châtons monoïques également</i>

F = Female/Femelle, M = Male/Mâle, Mono = Monoecious/Monoïque, Di = Dioecious/Dioïque

Table I. Various mulberry (*Morus*) varieties with the data showing sex behaviour, flowering process and anthesis in Kashmir conditions.

Tableau I. Comportement sexuel, floraison et anthérogenèse de différentes variétés de mûrier (*Morus*) dans les conditions du Cachemire.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Morus alba								
Chattatul (Zainageer)	F	April 5	1-6	8-14	9			
Ichinose	F	April 8	1-3	10-12	6			
Kokuso 27	Mono	April 4	1-6	13-18	13	13-17	11	Predominantly male; dioecious plants and monoecious catkins also present/ <i>Prédominance mâle, plants dioïques et châtons monoïques également présents</i>
Takowase	F	April 5	2-4	8-11	13			
K.N.G.	F	April 10	1-5	6-11	8			
Tomieso	M	April 4	1-7			9-17	6	
Tsukasakuwa	Mono	April 3	2-5	3-5	14	6-12	7	Monoecious catkins also present/ <i>Châtons monoïques également présents</i>
Morus bombycis								
Enshutakasuke	Mono	April 2	1-5	8-12	11	10-13	8	Monoecious predominantly; dioecious plants also with some monoecious catkins. In male plants monoecious catkins bear predominantly male flowers and vice versa in female/ <i>Essentiellement monoïque, également plants dioïques avec châtons monoïques. Chez les plants mâles, les châtons monoïques portent essentiellement des fleurs mâles et vice versa chez les plants femelles</i>
Shimanouchi	F	April 4	3-7	9-14	15			

Table I. (Part II) /Tableau I (Hème Partie)

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Morus bombycis								
Obawase	Mono	April 5	2-4	7-10	12	21-23	8	Predominantly female; monoecious catkins also present/ <i>Essentiellement femelle, châtons monoïques également présents</i>
Senmatsu	Mono	April 3	2-6	8-13	13	12-17	6	Predominantly male; monoecious catkins also present/ <i>Essentiellement mâle, châtons monoïques également présents</i>
Morus multicaulis								
Goshoerami	Di	April 7	1-2	6-7	11	5-13	5	Predominantly dioecious, monoecious plants and monoecious catkins also present/ <i>Essentiellement dioïque, plants monoïques et châtons monoïques également présents</i>
Kokuso-20	Di	April 3	1-5	14-18	9	11-16	8	
Kokuso-21	F	April 8	1-2	10-11	7			
Kairyoroso	Mono	April 8	1-6	11-16	11	18-23	7	Predominantly female/ <i>Prédominance femelle</i>
Rokokuyaso	F	April 3	1-3	4-6	17			
Kasuga	F	April 4	1-2	11-12	10			
Morus indica								
Sujanpur	Di	April 3	1-5	3-5	7	Not observed/ <i>Non observé</i>	Not observed/ <i>Non observé</i>	Predominantly dioecious; monoecious plants also present/ <i>Essentiellement dioïque, plants monoïques également présents</i>

Table I. (Part III) / Tableau I. (IIIème Partie)

A.K. TKU

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Species unknown/ Nom d'espèce inconnu								
Muki	F	April 10	1-4	8-11	7			
Acc. No. 18	F	April 15	1-2	8-9	5			
Francee	Mono	April 4	1-7	6-7	10	9-15	9	Predominantly male variety; monoecious catkins also/ <i>Variété à prédominance mâle, châtons monoïques également</i>
Zest	F	April 2	1-4	10-13	11			
Acc. No. 24	F	April 4	1-3	13-16	7			Monoecious catkins also/ <i>Châtons monoïques également</i>
Acc. No. 31	F	April 5	1-3	7-10	8			
Lajward	F	April 5	1-5	8-13	9			

Table I. (Part IV)

Tableau I. (IVème Partie)

controlled by some physiological factor. Ogure (1976) and Ogure et al. (1980, 1981) reported the change in the sex expression in *M. alba* L. varieties with the help of ethrel. In *M. nigra* Jaiswal and Kumar (1980, 1981b) induced male inflorescences on the female plants with exogenous application of GA₃ and vice-versa with the chemical chlorfurenol. Female *M. alba* variety Kanva-2 was induced to produce male and hermaphrodite inflorescences by the application of colchicine solution by Dwivedi et al. (1984). Jaiswal and Kumar (1981a) reported that in *M. nigra* increase in peroxidase activity induced or gave support to the development of female sex organs, whereas decrease in activity to the formation of male structures. Isoperoxidase B is inhibitory to the development of reproductive structures and its simultaneous decay stimulates plants to develop the female primordia. Regulation of sex expression in flowering plants has been attributed to genetic, environmental and chemical factors (Frankel and Galun, 1977).

Das et al. (1970) reported that the complete emergence of the inflorescence in mulberry varied from 1-4 days in tropical climate. Our studies indicate the complete opening of floral buds in different varieties under temperate climate within 1-7 days. Present studies also throw light on the complete time taken for attaining of maturity of female flowers in a variety which will help in formulating the breeding programme. The receptivity period for a mature female flower in the absence of pollen has already been reported by Das et al. (1970). Our personal observations in conducting artificial pollination seem to conform to their results. For a breeder to conduct artificial pollination in temperate region, the study indicates the period available for crossing without resorting to any special means such as storing pollens or using cut branches as has been suggested by Sugiyama (1953) which is always not practicable. The results have also been helpful in co-ordinating the artificial crossing at this centre of tropical varieties such as Kanva-2 which is early sprouter with Chinese White variety (exotic) which gives the early available pollen for crossing in temperate region. Further studies regarding the crossability of different varieties are in progress.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks are due to Prof. A. Ahmad, Vice Chancellor (SKUAST) for providing the facilities, Prof. B.C. Das, Ex-Chief Scientist for valuable suggestions and Dr. A.R. Trag, Senior Scientist of Division of Sericulture for encouragement.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1975) Text book of tropical sericulture. Japan overseas co-operation volunteers. 4-2-4 Hiroo, Sibuya-ku, Tokyo, Japan.
- DAS B.C., PRASAD D.N., KRISHNASWAMY S. (1970) Studies on anthesis in mulberry. Indian J. Seric., 9(1), 59-63.
- DWIVEDI N.K., SIKDAR A.K., DANDIN S.B., SHASHTRY C.R. (1984) Modification of sex expression in mulberry by colchicine. Curr. Sci., 53(19), 1036-1037.
- FRANKEL R., GALUN E. (1977) Pollination mechanism, reproduction and plant breeding. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, New York.
- GILL B.S., GUPTA R.C. (1979) Cytological studies in the sex types of *Morus alba* L. (Moraceae). Curr. Sci., 48(1), 35-36.
- JAISWAL V.S., KUMAR A. (1980) Induction of male inflorescences on the female plants of *Morus nigra* L. by GA₃. Indian J. Exp. Biol., 18(8), 911-913.
- JAISWAL V.S., KUMAR A. (1981a) Activity and isozymes of peroxidase in *Morus nigra* L. during sex differentiation. Z. Pflanzenphysiol., Bd. 102, 299-302.
- JAISWAL V.S., KUMAR A. (1981b) Modification of sex expression and fruit formation on male plants of *Morus nigra* L. by chlorfurenol. Proc. Indian Acad. Sci. (Plant Sci.), 90(5), 395-400.
- KATSUMATA F. (1971) Shape of idioblasts in mulberry leaves with special reference to the classification of mulberry trees. J. Seric. Sci. Japan, 40(4), 313-322.
- OGURE M. (1976) Effects of ethrel (2-chloroethane phosphonic acid) on sex expression in mulberry. J. Seric. Sci. Japan, 45(2), 185-186.

OGURE M., HARASHIMA N., NAGANUMA K., MATSUSHIMA M. (1980) Effects of time for ethrel treatment on sex expression in mulberry, *Morus alba* L. J. Seric. Sci. Japan, 49(6), 517-520.

OGURE M., HARASHIMA N., NAGANUMA K., MATSUSHIMA M. (1981) Sex expression of ethrel-treated and non-treated shoots of a tree in mulberry, *Morus alba* L. J. Seric. Sci. Japan, 50(1), 16-19.

OSAWA I. (1920) Cytological and experimental studies in *Morus* with special reference to triploid mutants. Bull. Imp. Seric. Expt. St. (Japan), 1, 318-366.

SCHAFFNER J.H. (1936) Off spring of a self-pollinated reversed carpillate plant of *Morus alba*. Botan. Gaz., 98, 425-428.

SINOTO Y. (1929) Chromosome studies in some dioecious plants with special reference to the allosomes. Cytologia, 1, 109-191.

SUGIYAMA T. (1953) Studies on the hybridization of mulberry trees by use of cuttings. Bull. Seric. Expt. St., 14(4), 199-200.

FLORAISON ET ANTHESE DU MURIER EN CLIMAT TEMPERE (VALLEE DU CACHEMIRE)

A.K. TIKU, B.B. BINDROO et R.K. PANDIT Division of Sericulture, SK University of
Agricultural Sciences and Technology, P.B. 23, G.P.O., Srinagar 190 001, Mirgund,
Kashmir, Inde.

Nous avons étudié la floraison et l'anthèse chez 30 variétés de mûrier (Morus). Le temps nécessaire à l'ouverture complète des premiers bourgeons varie de 1 à 7 jours. Les variétés sont mâle, femelle, dioïque, monoïque ou mixte. Le temps nécessaire pour parvenir à la maturité des fleurs femelles au sein d'une même variété varie d'un minimum de 1 à 5 jours chez Kanva-2 (M. alba) à un maximum de 14-18 jours chez Kokuso-20 (M. multicaulis). La période nécessaire à la maturation des fleurs mâles au sein d'une même variété varie de 4-7 jours chez Chinese White (M. alba) à 21-23 jours chez Obawase (M. bombycis). La période de réceptivité des fleurs femelles pour une variété varie de 5 à 17 jours. La déhiscence des anthères est complète entre 5 et 11 jours.

INTRODUCTION

Le Mûrier appartenant au genre *Morus* comprend environ 35 espèces (anonyme, 1975). Le mûrier séricicole est cultivé principalement en Chine, au Japon, en Inde, en Russie et en Corée. Il existe des centaines de variétés séricicoles appartenant à différentes espèces.

Il y a encore beaucoup de confusion en ce qui concerne la classification du mûrier. Les critères utilisés pour la classification incluent la longueur du style de la fleur femelle (Koidzumi, 1917 cité par Katsumata, 1971), la forme de l'idioblaste (Katsumata, 1971) et d'autres caractères morphologiques. La confusion est encore aggravée à cause du sexe des mûriers qui n'est pas uniforme d'une espèce à l'autre, ni d'une variété à l'autre.

Dans la nature le mûrier est dioïque ou monoïque. L'hétérozygotie des plants permet de produire de nouvelles variétés améliorées avec un rendement en feuilles accru, des qualités nutritives enrichies. L'élaboration de nouvelles variétés par croisement artificiel demande que l'on connaisse le comportement des plants de mûrier en ce qui concerne le sexe des plants, la période de floraison, la déhiscence des anthères, la réceptivité des fleurs femelles, etc. Dans les régions tropicales, ceci n'est pas un gros problème car le mûrier peut avoir des fleurs toute l'année et répondre à la taille des rameaux. Des études sur l'anthérogénèse du mûrier ont déjà été effectuées en région tropicale par Das *et al.* (1970). Cependant, on ne dispose d'aucune littérature sur le démarrage de la floraison et le processus de floraison en climat tempéré comme celui de la vallée du Cachemire où la période de

croissance active pour le mûrier se situe de la fin mars à octobre. Notre étude contribuera à développer cet aspect.

MATERIEL ET METHODES

Le matériel est constitué par 30 variétés de mûrier (Tableau I) comprenant à la fois des variétés exotiques et indigènes appartenant à quatre espèces de *Morus* : *M. alba*, *M. bombycis*, *M. multicaulis* et *M. indica*, conservées dans la banque germinale de la Division de Sériciculture (SKUAST), Mirgund, Kashmir. Les observations ont été enregistrées dans l'année 1985 sur un nombre d'arbres variant de 7 à 20 dans différentes variétés. Les caractères observés sont la date du début du débourrement des premiers bourgeons, le temps nécessaire pour l'ouverture complète des bourgeons chez une variété, le temps nécessaire pour la maturité des fleurs femelles, la période de réceptivité, le temps nécessaire pour la maturité des fleurs mâles et la période de déhiscence. La méthode suivie pour caractériser les différents paramètres est celle décrite par Das *et al.* (1970). Ces données sont calculées pour la variété prise dans son ensemble. Le sexe de la variété est déterminé par la présence de fleurs mâles et/ou femelles sur les arbres.

RESULTATS

Les valeurs enregistrées pour les différents caractères sont présentées dans le Tableau I. Le premier débourrement intervient le 28 mars chez la variété Chinese White. Le processus est terminé au 15 avril chez la variété Accession N 18. Le temps nécessaire à l'ouverture complète des bourgeons varie de 1 à 7 jours selon les variétés. Le temps le plus court (1 à 2 jours) est observé chez les variétés Goshierami, Kokuso-21, Kasuga, Limoncina, Acc. N 18 et le maximum de 1-7 jours chez les variétés Tomieso, Shimanouchi et Francee. Le reste des variétés se situe dans l'intervalle. Le sexe des variétés étudiées est mâle, femelle, dioïque, monoïque ou mixte. 14 variétés sont purement femelles, deux sont purement mâles, une est strictement dioïque et neuf sont monoïques. Deux variétés femelles portent à la fois des châtons mâles et des châtons monoïques. Deux variétés ont une prédominance dioïque. Les composantes particulières au sexe incluent que certaines variétés ont exclusivement des fleurs mâles ou femelles. Le sexe s'exprime différemment dans certaines variétés dioïques et monoïques étudiées. La variété Goshierami montre une prédominance dioïque mais comprend aussi des plants monoïques ainsi que des châtons monoïques. Certaines variétés monoïques montrent une prédominance femelle (Obawase, Kairyoroso) ou mâle (Kokuso-27, Senmatsu, Francee). On observe un phénomène singulier chez la variété Enshutakasuke à prédominance monoïque qui comporte également des plants dioïques avec quelques châtons monoïques, des plants mâles avec des châtons monoïques portant en majorité des fleurs mâles, et des plants femelles où l'on trouve la situation inverse. Chez Kanva-2, qui est femelle, on trouve quelques châtons mâles à un stade tardif ainsi que des châtons monoïques.

Le temps nécessaire pour atteindre la maturité des fleurs femelles au sein d'une variété est au minimum de 1-5 jours chez la variété Kanva-2 et au maximum de 14-18 jours chez la variété Kokuso-20. La période de réceptivité des fleurs femelles pour une variété va de 5 à 17 jours. Le temps nécessaire pour atteindre la maturité des fleurs mâles au sein d'une variété est au minimum de 4-7 jours chez la variété Chinese White et au maximum de 21-23 jours chez la variété Obawase. La déhiscence des anthères est achevée en 5 jours chez les variétés Goshierami et Chinese White et prend jusqu'à 11 jours chez la variété Kokuso-27.

DISCUSSION

Les résultats ci-dessus regroupés dans le Tableau I donnent une vue d'ensemble du comportement des variétés de mûrier en ce qui concerne le moment de la floraison, le processus de floraison et la variation du sexe en climat tempéré. On observe qu'il n'y a pas de synchronisation du débourrement du(des) bourgeon(s) au sein d'une(des) variété(s). Les résultats intéressants observés en ce qui concerne le sexe des plants de mûrier indiquent que le sexe chez le mûrier n'est pas clairement différencié que ce soit au niveau de l'espèce ou de la variété ; les plants doivent posséder

à la fois des gènes déterminant le sexe mâle et femelle, qui sont exprimés différemment sous l'influence de facteurs externes comme le climat. Des chercheurs (Osawa, 1920 ; Sinoto, 1929) ont suggéré que la présence de deux chromosomes de grande taille joue un rôle dans la détermination du sexe chez les taxons dioïques de *Morus*. Gill et Gupta (1978) ont démontré que ces deux chromosomes ne jouent aucun rôle dans la détermination du sexe et suggèrent que le mécanisme de détermination du sexe est plus génétique que chromosomique. Schaffner (1936) pense que le sexe chez *Morus* est contrôlé par quelque facteur physiologique. Ogure (1976) et Ogure *et al.* (1980, 1981) ont observé un changement dans l'expression sexuelle chez des variétés de *M. alba* L. en utilisant de l'ethrel. Jaiswal et Kumar (1980, 1981b) ont induit chez *M. nigra* des inflorescences mâles sur des plants femelles par application exogène de GA3 et l'inverse avec du chlorflurenol. Dwivedi *et al.* (1984) ont induit des inflorescences mâles et hermaphrodites chez la variété femelle Kanva-2 (*M. alba*) par application d'une solution de colchicine. Jaiswal et Kumar (1981a) ont observé chez *M. nigra* qu'une augmentation de l'activité peroxydase induit ou favorise le développement des organes sexuels femelles et sa diminution, la formation des structures mâles. L'isoperoxydase B inhibe le développement des structures reproductrices et son affaiblissement permet au plant de développer les structures femelles. La régulation de l'expression du sexe chez les plants qui fleurissent a été attribuée à des facteurs génétiques, environnementaux et chimiques (Frankel et Galun, 1977).

Das *et al.* (1970) ont observé que l'apparition complète de l'inflorescence chez le mûrier varie de 1 à 4 jours en climat tropical. Nos études montrent que l'épanouissement complet des fleurs s'effectue entre 1 et 7 jours chez les différentes variétés en climat tempéré. Nos études montrent également quel est le temps nécessaire pour atteindre la maturité des fleurs femelles chez une variété et aideront à mettre au point un programme de sélection. La période de réceptivité d'une fleur femelle mature en l'absence de pollen a également été observée par Das *et al.* (1970). Nos observations sur la pollinisation artificielle semblent confirmer leurs résultats. Notre étude indique quelle est la période favorable pour pratiquer la pollinisation artificielle dans une région tempérée sans avoir recours à des méthodes spéciales telles que conserver les pollens ou utiliser des branches coupées comme le suggérait Sugiyama (1953) ce qui n'est pas toujours faisable. Les résultats ont également aidé à la coordination dans notre Centre du croisement artificiel de variétés tropicales comme Kanva-2 qui est une variété précoce avec Chinese White (exotique) produisant du pollen pour le croisement en région tempérée. Des études sur le croisement des différentes variétés sont en cours.

RESISTANCE OF SOME MULBERRY SILKWORM LINES TO POLYHEDROSIS

Teresa KREMKY and Elzbieta MICHALSKA Department of Genetics, Agricultural University (SGGW - AR), 05-840 Brwinow, Przejazd 4, Poland.

Studies were carried out during four sericultural seasons (1982-1985) on six silkworm lines inoculated with nuclear polyhedrosis virus and/or submitted to a low temperature treatment. Survival rates: first - until the 9th day after the treatment, and second - until pupation, were estimated. In the group inoculated with the virus in every generation the survival rate was higher than in the group submitted to a single inoculation. The low temperature treatment of larvae gave the activation of latent form of virus. Survival rate in different tested lines was similar, but reaction to inoculation and low temperature was different.

INTRODUCTION

This experiment was carried out in purpose to obtain by special selection the silkworm lines resistant to nuclear polyhedrosis.

According to many authors (Aizawa and Furuta, 1964; Aratake, 1973) polyhedrosis may be achieved by inoculation *per os* or by activation of the latent form of the virus existing in the silkworm larvae by treating them with the low temperature just after ecdysis of the 4th or 5th instar.

We had no success in our previous experiments in which we used low temperature treatment method (Kremky and Michalska, 1984).

In this paper we refer the results of our four years experiment in which two above mentioned methods were applied.

MATERIAL AND METHODS

The experiment was carried out from 1982 to 1985 rearing seasons. Material from the Silk Research Station at Zolwin (Institute of Natural Fibres) was used. It were silkworm breeding lines Aa, AB, Kd, Miz, Tbl and Uc. Only lines Aa and AB were used in all four years experiments.

Two methods of inducing polyhedrosis were applied:

1. Inoculation *per os* on the 2nd day of the 4th instar - 100 larvae were fed with 10 grams of mulberry leaves sprayed with 2ml suspension containing 16 000-20 000 polyhedral bodies per 1ml.
2. Low temperature stress of +4C (S) lasting 12 hours in experiment of 1983 and 6 hours in the later ones was applied after 4th moult.

Whole material was divided into two series of groups: uninfected (U) and infected (I). In each of the two series, the one third of groups was treated with inoculation of the virus, one third was maintained during 6 hours in low temperature, and one third was not treated, left as a control group (Fig. 1). This scheme of experiment was settled out for each breeding line.

The survival rate (%) was calculated on the 9th day after treatment (stage I) and before pupation (stage II), for each batch consisting of 3-5 samples of 30 larvae of the same line. The data used in

statistical analysis have been previously transformed according to the formula: $y = \arcsin x^{1/2}$. The results of each season were calculated separately by the analysis of variance according to the model:

$$Y_{ijk} = \mu + a_i + b_j + (ab)_{ij} + e_{ijk}$$

where:

Y_{ijk} = k th observation of the i th group and j th line, μ = overall mean, a_i = effect of the i th group, b_j = effect of the j th line, $(ab)_{ij}$ = interaction of the i th group with j th line, e_{ijk} = random error.

RESULTS AND DISCUSSION

In all experiments we have obtained significant differences in survival rate for both experimental factors (Table I). The differences among breeding lines and the interaction effect were less clear and less systematic. They were significant only in experiment of 1983 when the large number of samples was available. The means for survival rate according to applied method of inducing infection, used breeding lines and year are shown in Tables II-V.

The 1982 experiment was the first one in which we introduced nuclear polyhedrosis virus to one part of experimental population. The response was very strong and expressed by decrease of survival rate (near 40% in inoculated groups) calculated up to 9th day after treatment as well as for whole experimental period. Breeding lines responded with not striking difference of this reaction. Only Tbl line showed the highest mortality (Table II).

In the 1983 experiment the significantly higher survival rate was obtained in two groups after inoculated parents as compared with control groups after non inoculated one (IU₂ versus U₂ and I₂ versus UI₂). Difference between I₂ and UI₂ is the measure of selection response to an applied factor. A decrease in the survival rate in groups treated with low temperature (US₂ and IS₂) gives an evidence for activation of nuclear polyhedrosis virus what previously was not observed (Kremky and Michalska, 1984). Such result confirms a suggestion about the transovarian virus transfer. A strong reaction in the US₂ group obtained from uninfected parents might suggest an incidence (apart of all precautions undertaken) of secondary infections of the parental generations. In this case the difference between control and inoculated groups would be due to the probability of a contact with the virus.

The reaction of tested silkworm breeding lines was under influence of the experimental factor. Among inoculated groups the Uc line showed the lowest survival rate. Simultaneously this line was relatively resistant to the low temperature treatment. From the difference of these two reactions it may be presumed that there is the probable appearance of certain specialization in the immune mechanism. This presumption may be important because the use of each experimental factor separately in the selection could give a different reaction from the genetic point of view.

In 1984 the weaker reaction on both experimental factors was observed (Table IV). In general, the survival rate in experimental as well as in control groups was very high. This survival rate in control groups U₃ and IU₃ (generation after non-treated parents) is probably due to simultaneous self selection followed by secondary infections.

Differences between lines are small and unimportant for practice.

Similar observations were made in 1985 when in several samples was no death until the 9th day after treatment. It seems that lines chosen as experimental material had high genetic resistance to nuclear polyhedrosis.

Watanabe and Maeda (1978) had stated that silkworm resistance on per os inoculation of denso-nucleosis virus is determined by major gene. It may be that similar mechanisms have acted in case of polyhedrosis.

On the base of obtained results it can be stated that observed silkworm mortality due to polyhedrosis is caused rather by uncontrolled secondary infection and in the less extend by activation of latent form of virus. It could explain the absence of polyhedrosis in beginning experiments (Kremky and Michalska, 1984) when low temperature stress was used. The genetic variance which is responsible for the susceptibility to polyhedrosis might be eliminated by selection.

Year/ Année	I series/ Lot I			II series/ Lot II		
1982	Uninoculated (U ₁) <i>Non inoculé</i>			Inoculated (I ₁) <i>Inoculé</i>		
1983	Uninoculated (U ₂) <i>Non inoculé</i>	Inoculated (UI ₂) <i>Inoculé</i>	Stressed (US ₂) <i>Basse température</i>	Inoculated (I ₂) <i>Inoculé</i>	Uninoculated (IU ₂) <i>Non inoculé</i>	Stressed (IS ₂) <i>Basse température</i>
1984	Uninoculated (U ₃) <i>Non inoculé</i>	Inoculated (UI ₃) <i>Inoculé</i>	Stressed (US ₃) <i>Basse température</i>	Inoculated (I ₃) <i>Inoculé</i>	Uninoculated (IU ₃) <i>Non inoculé</i>	Stressed (IS ₃) <i>Basse température</i>
1985	Uninoculated (U ₄) <i>Non inoculé</i>	Inoculated (UI ₄) <i>Inoculé</i>	Stressed (US ₄) <i>Basse température</i>	Inoculated (I ₄) <i>Inoculé</i>	Uninoculated (IU ₄) <i>Non inoculé</i>	Stressed (IS ₄) <i>Basse température</i>

Figure 1. Experimental shedule. *Figure 1. Shéma de l'expérience.*

RESISTANCE OF SILKWORM TO POLYHEDROSIS

Year/ Année	Source of variation/ Source de variation	d.f./ d.l.	Mean squares/ I	Carrés moyens II
1982	Groups/ groupes	1	9781,72**	12944,70**
	Lines/ lignées	3	117,64*	374,50
	Interaction/ interaction	3	74,27	887,59**
	Error/ erreur	28	35,10	134,56
1983	Groups/ groupes	5	27903,70**	16870,30**
	Lines/ lignées	5	261,31**	3368,12**
	Interaction/ interaction	25	392,91**	434,16**
	Error/ erreur	137	61,79	121,90
1984	Groups/ groupes	5	734,42**	856,36**
	Lines/ lignées	3	61,04	102,49
	Interaction/ interaction	15	68,23	112,15
	Error/ erreur	50	55,46	71,51
1985	Groups/ groupes	5	155,35**	393,74**
	Lines/ lignées	4	24,99	304,48**
	Interaction/ interaction	20	41,06	158,00*
	Error/ erreur	60	23,68	82,18

** significant p.05/ significatif p.05

* significant p.01/ significatif p.01

Table I. Analysis of variance of the survival rate of silkworm larvae until the 9th day after treatment (I) and until pupation (II) in 1982-1985.

Tableau I. Analyse de variance du taux de survie des larves de ver à soie jusqu'au 9ème jour après le traitement (I) et jusqu'à la nymphose (II) de 1982 à 1985.

Groups/ groupes					
U1 (*)			II		
Line/ lignée	n	x	n	x	x line/ lignée x
I. Until the 9th day after treatment/ jusqu'au 9e jour après le traitement					
Aa	5	99.4	5	64.4	81.9 a (**)
AB	5	100.0	5	63.0	81.5 b
Tbl	5	100.0	5	66.8	83.4 c
Uc	5	98.0	1	50.0	74.0 abc
x group/ groupe x		99.4 A		61.0 A	
II. Until pupation/ jusqu'à la nymphose					
Aa	5	93.2	5	50.3	71.7
AB	5	85.9	5	43.7	64.8
Tbl	5	91.4	5	17.7	54.5
Uc	5	67.4	1	50.0	58.7
x group/ groupe x		84.5 A		40.4 A	

(*) Symbol of groupe - see fig.1./ symbole du groupe - cf. fig.1.

(**) Identical letters denote significant mean difference ($p < 0.5$)/ Les lettres identiques montrent une différence de moyenne significative ($p < 0.5$)

Table II. Survival rate (%) of silkworm larvae in 1982.

Tableau II. Taux de survie (%) larves de ver à soie en 1982.

Groups/ groupes							
Line/ lignée	U2	UI2	US2	I2	IU2	IS2	x line/ lignée x
I. Until the 9th day after treatment/ jusqu'au 9ème jour après le traitement							
Aa	100.0	92.4	19.6	92.1	100.0	15.0	81.4 a (*)
AB	100.0	93.8	19.0	96.4	100.0	12.3	80.0 b
Kd	100.0	91.9	22.1	99.4	100.0	9.4	81.0 c
Miz	100.0	93.0	35.1	97.7	100.0	0.3	72.4 d
Tbl	100.0	90.0	21.1	96.2	100.0	2.1	76.2 e
Uc	100.0	57.8	26.0	49.9	100.0	25.5	68.5 abcde
x	100.0	88.2	22.5	92.3	100.0	8.7	
Group/ groupe	ABCD	BFIJK	AEFGH	DHKMN	FILM	CGJLN	
II. Until pupation/ jusqu'à la nymphose							
Aa	74.2	72.9	11.7	66.5	90.6	10.3	56.1 abc
AB	86.8	70.4	13.5	78.7	86.9	4.0	55.8 def
Kd	72.7	33.1	5.7	73.8	81.3	1.6	40.8 adgh
Miz	82.2	50.7	12.7	88.7	99.0	0.0	48.8 hjk
Tbl	82.0	35.8	0.5	32.1	77.8	1.0	32.3 cfik
Uc	34.5	3.5	0.1	3.4	71.2	0.7	12.0 begij
x	72.0	42.6	4.8	56.3	85.4	1.9	
Group/ groupe	ABCDE	BFIJK	AFGH	EHKMN	CGILM	DJLN	

(*) Identical letters denote significant means difference ($p < 0.5$) /

Des lettres identiques montrent une différence des moyennes significative ($p < 0.5$).

Table III. Survival rate (%) of silkworm larvae in 1983.

Tableau III. Taux de survie (%) des larves de ver à soie en 1983.

Groups/ groupes							
Line/ lignée	U3	UI3	US3	I3	IU3	IS3	x line/ lignée x
I. Until the 9th day after treatment/ jusqu'au 9ème jour après le traitement							
Aa	100.0	90.2	94.4	95.6	100.0	86.1	96.0 a (*)
AB	100.0	97.7	99.6	96.8	100.0	90.3	98.6 a
Kd	100.0	84.7	94.7	93.3	100.0	97.8	96.9
Miz	100.0	94.6	100.0	91.6	100.0	87.5	97.8
x	100.0	92.5	98.0	94.5	100.0	90.8	
Group/ groupe	ABCD	BEI	AEFGH	DHK	FIJK	CGJ	
II. Until pupation/ jusqu'à la nymphose							
Aa	99.7	89.5	93.6	95.6	99.6	69.0	93.8 a
AB	100.0	94.5	99.6	94.2	100.0	84.5	97.5 ab
Kd	98.5	84.7	91.4	91.5	100.0	96.2	95.1 b
Miz	99.2	86.1	100.0	89.1	97.3	80.1	94.4
x	99.5	89.0	97.3	92.8	99.7	83.9	
Group/ groupe	ABCD	BEI	AEFGH	DHKL	FIJK	CGJL	

(*) Identical letters denote significant means difference ($p < 0.5$)/ Des lettres identiques montrent une différence des moyennes significative ($p < 0.5$)

Table IV. Survival rate (%) of silkworm larvae in 1984.

Tableau IV. Taux de survie (%) des larves de ver à soie en 1984.

Groups/ groupes							
Line/ lignée	U4	UI4	US4	I4	IU4	IS4	x line/ lignée x
I. Until the 9th day after treatment/ jusqu'au 9ème jour après le traitement							
Aa	100.0	96.3	100.0	100.0	100.0	100.0	99.9
AB	100.0	99.2	99.2	96.8	100.0	100.0	99.7
Kd	100.0	98.7	99.6	99.7	100.0	100.0	99.8
Miz	100.0	99.3	100.0	98.6	100.0	100.0	99.9
Tbl	100.0	100.0	95.5	93.0	100.0	100.0	99.4
x	100.0	99.1	99.5	98.4	100.0	100.0	
Group/ groupe	A(*)	ABC	ABC	ABC	B	C	
II. Until pupation/ jusqu'à la nymphose							
Aa	95.5	84.7	98.4	98.9	100.0	96.3	97.0 a
AB	99.6	92.8	97.9	78.0	99.7	96.1	95.9 b
Kd	97.0	95.6	93.6	95.2	96.7	95.4	95.7 c
Miz	93.5	95.1	98.8	94.8	99.3	64.5	93.5
Tbl	91.2	95.0	88.7	80.9	94.6	69.5	87.8 abc
x	96.0	93.0	96.2	91.3	98.7	87.2	
Group/ groupe	E	C	D	B	ABC	ADE	

(*) Identical letters denote significant means difference ($p < 0.05$)/ Des lettres identiques montrent une différence des moyennes significative ($p < 0.05$).

Table V. Survival rate (%) of silkworm larvae in 1985.

Tableau V. Taux de survie (%) des larves de ver à soie en 1985.

Year/ Année	Stage/ Stade	U	Groups/ <i>groupes</i>					x group/ <i>groupe x</i>
			UI	US	I	IU	IS	
Line Aa/ Lignée Aa								
1982	I	99.4	-	-	64.4	-	-	81.9
	II	93.2	-	-	50.3	-	-	71.7
1983	I	100.0	92.4	19.6	92.1	100.0	15.0	81.4
	II	74.2	72.9	11.7	66.5	90.6	10.3	56.1
1984	I	100.0	90.2	94.4	95.6	100.0	86.1	96.0
	II	99.7	89.5	93.6	95.6	99.6	69.0	93.8
1985	I	100.0	96.3	100.0	100.0	100.0	100.0	99.9
	II	95.5	84.7	98.4	98.9	100.0	96.3	97.0
Line AB/ Lignée AB								
1982	I	100.0	-	-	63.0	-	-	81.5
	II	85.9	-	-	43.7	-	-	64.8
1983	I	100.0	93.8	19.0	96.4	100.0	12.3	80.8
	II	86.8	70.4	13.5	78.7	86.9	4.0	55.8
1984	I	100.0	97.7	99.6	96.8	100.0	90.3	98.6
	II	100.0	94.5	99.6	94.2	100.0	84.5	97.5
1985	I	100.0	99.2	99.2	96.8	100.0	100.0	99.7
	II	99.6	92.8	97.9	78.0	99.7	96.1	95.9

Table VI. Survival rate (%) of the Aa and AB lines during 4 years experiment.

Tableau VI. Taux de survie (%) des lignées Aa et AB au cours des 4 années de l'expérience.

CONCLUSIONS

On the basis of obtained results in this experiment it can be said that:

1. In the groups inoculated with the virus in each generation (I) the survival rate was higher than in groups inoculated only once in parent generation (UI). This difference might be considered as a reaction to the selection.
2. A decrease in survival rate after the low temperature treatment (US and IS) might be due to the activation of nuclear polyhedrosis virus. It may confirm the hypothesis about the transovarian virus transfer. On the other hand, a decrease of survival rate in non-inoculated low temperature stressed groups (US) may suggest the incidence of secondary infections.
3. The tested lines showed various reactions to inoculation as well as to low temperature stress.
4. The external infections rather than the activation of latent form of the virus seems to be a main cause of the disease. A decrease of survival rate in non-inoculated low temperature stressed groups (US) may suggest the incidence of secondary infections.

REFERENCES

- AIZAWA K., FURUTA Y. (1964) Resistance to polyhedrosis in F1 hybrids between resistant and original strains in the silkworm, *Bombyx mori*. J. Sericult. Sci. Japan, 33(5), 399-406.
- ARATAKE Y. (1973) Strain difference of the silkworm, *Bombyx mori* L. in the resistance to a nuclear-polyhedrosis virus. J. Sericult. Sci. Japan, 42(3), 230-238.
- KREMKY T., MICHALSKA E. (1984) Effect of temporary reduced air temperature during silkworm *Bombyx mori* L. rearing, on some characters of the inbred lines. Sericologia, 24(1), 29-42.
- WATANABE H., MAEDA S. (1978) Genetic resistance to peroral infection with a densovirus in the silkworm, *Bombyx mori* L. J. Sericult. Sci. Japan, 47(3), 209-214.

RESISTANCE A LA POLYEDROSE DE CERTAINES LIGNEES DU VER A SOIE DU MURIER

Teresa KREMKY et Elzbieta MICHALSKA Département de Génétique, Ecole Supérieure
d'Agriculture (SGGW-AR), O5-840 Brwinow, Przejazd 4, Pologne.

Pendant quatre saisons (1982-1985) nous avons effectué des expérimentations dans lesquelles les vers à soie de six lignées ont été infectés avec le virus de la polyédrose nucléaire et/ou soumis à basse température. Le taux de survie des vers à soie a été enregistré jusqu'au 9ème jour après le traitement et jusqu'à la nymphose. Le taux de survie des vers à soie dans les groupes infectés à chaque génération est plus élevé que dans les groupes infectés une seule fois. L'influence des basses températures s'est manifestée par l'activation de la forme latente du virus. La saison a également une influence. Les différentes lignées testées ont le même taux de survie mais elles se distinguent par leur réaction à l'infection ainsi qu'à la température.

INTRODUCTION

Cette expérience a été effectuée afin d'obtenir par sélection spécifique des lignées de ver à soie résistantes à la polyédrose nucléaire. Selon de nombreux chercheurs (Aizawa et Furata, 1964 ; Aratake, 1973) la polyédrose peut être obtenue par inoculation *per os* ou par activation de la forme latente du virus existant chez les larves de ver à soie en les soumettant à des basses températures juste après l'ecdysis du 4ème ou du 5ème âge.

Nous n'avons obtenu aucun résultat lors de nos précédentes expériences de traitement à basse température (Kremky et Michalska, 1984).

Nous rapportons ici les résultats de quatre années d'expérimentations pendant lesquelles les deux méthodes mentionnées ci-dessus ont été appliquées.

MATERIEL ET METHODES

L'expérimentation a été conduite pendant les saisons d'élevage de 1982 à 1985. Le matériel expérimental provenait de la Silk Research Station de Zolwin (Institute of Natural Fibers). Il s'agit des lignées sélectionnées de ver à soie Aa, AB, Kd, Miz, Tbl et Uc. Seules les lignées Aa et AB ont été employées dans les quatre expériences.

Deux méthodes ont été appliquées pour induire la polyédrose :

1. Inoculation par voie orale au 2ème jour du 4ème âge. 100 larves ont été nourries avec 10 g de feuilles de mûrier vaporisées avec 2 ml de suspension contenant 16 000-20 000 polyèdres par ml.

2. Traitement à basse température de + 4 C (S) effectué après la 4ème mue, pendant 12 heures lors de l'expérience de 1983 et pendant 6 heures lors des expériences suivantes.

Le matériel expérimental est divisé en deux groupes : non-infecté (U) et infecté (I). Dans chacun des deux groupes, un tiers est traité par inoculation du virus, un tiers est soumis au traitement à basse température pendant 6 heures et le dernier tiers n'est pas traité et pris comme lot témoin (Fig. 1). Ce schéma expérimental est reproduit pour chaque lignée.

Le taux de survie (%) est calculé le 9ème jour après le traitement (stade I) et avant la nymphose (stade II), pour chaque lot comprenant de 3 à 5 échantillons de 30 larves d'une même lignée.

Les données utilisées pour l'analyse statistique ont été transformées selon la formule : $y = \arcsin x \sqrt{2}$. Les résultats de chaque saison ont été calculés séparément par analyse de variance en suivant le modèle :

$$Y_{ijk} = + a_i + b_j + (ab)_{ij} + e_{ijk}$$

où :

Y_{ijk} = kème observation du ième groupe et de la jème lignée,

= moyenne globale,

a_i = effet du ième groupe,

b_j = effet de la jème lignée,

$(ab)_{ij}$ = interaction du ième groupe avec la jème lignée,

e_{ijk} = erreur.

RESULTATS ET DISCUSSION

Nous avons obtenu dans toutes les expériences des différences significatives du taux de survie pour les deux facteurs expérimentaux (Tableau I). Les différences entre lignées et l'effet d'interaction sont moins clairs et moins systématiques. Ils sont significatifs uniquement dans l'expérience de 1983 où l'on disposait d'un grand nombre d'échantillons. Les taux de survie moyens sont présentés dans les tableaux II à V en fonction de la méthode d'induction de l'infection employée, des lignées utilisées et de l'année.

Lors de l'expérience de 1982, nous avons introduit pour la première fois le virus de la polyédrose nucléaire chez une partie de la population expérimentale. La réponse fut très forte et traduite par une diminution du taux de survie (près de 40 % chez les groupes inoculés) calculé jusqu'au 9ème jour après le traitement comme pour toute la période expérimentale. Nous n'avons pas observé de différence significative de la réponse selon les lignées. Seule la lignée Tbl a montré une plus forte mortalité (Tableau II).

En 1983, nous avons obtenu un taux de survie significativement plus élevé dans deux groupes provenant de parents inoculés, par rapport aux groupes témoins correspondants provenant de parents non-inoculés (IU₂ par rapport à U₂ et I₂ par rapport à UI₂). La différence entre I₂ et UI₂ représente la réponse de sélection à un facteur expérimental. La diminution du taux de survie chez les groupes soumis à basse température (US₂ et IS₂) montre une activation du virus de la polyédrose nucléaire qui n'avait pas été observée précédemment (Kremky et Michalska, 1984). Ce résultat confirme l'hypothèse du transfert transovarier du virus. Une forte réaction observée chez le groupe US₂ provenant de parents non-infectés peut indiquer la présence (malgré toutes les précautions prises) d'infections secondaires des générations parentales. Dans ce cas la différence entre le lot témoin et les groupes infectés serait probablement due à un contact avec le virus.

La réaction des lignées de ver à soie testées subit l'influence du facteur expérimental. Parmi les groupes infectés, la lignée Uc montre le taux de survie le plus bas. En même temps, cette lignée est relativement résistante au traitement à basse température. A cause de la différence entre ces deux réactions, on peut penser qu'une certaine spécialisation du mécanisme immunitaire apparaît. Cette présomption peut être importante parce que l'utilisation de chaque facteur expérimental séparément dans la sélection peut donner une réaction différente du point de vue génétique.

En 1984, on observe une réaction plus faible aux deux facteurs expérimentaux (Tableau IV). En général, le taux de survie est très élevé à la fois chez les groupes testés et chez les groupes témoins. Ce taux de survie observé chez les groupes témoins U3 et IU3 (génération provenant de parents non-traités) est probablement dû à une auto-sélection simultanée suivie par des infections secondaires.

Les différences entre lignées sont faibles et ne sont pas importantes du point de vue pratique.

Des observations similaires sont faites en 1985, où l'on observe aucune mortalité chez plusieurs groupes jusqu'au 9ème jour après le traitement. Il semble que les lignées choisies pour l'expérimentation aient une grande résistance génétique à la polyédrose nucléaire.

Watanabe et Maeda (1978) ont rapporté que la résistance du ver à soie à l'inoculation par voie orale du virus de la densonucléose est déterminée par un gène majeur. Il se peut que des mécanismes semblables aient joué dans le cas de la polyédrose.

Sur la base de ces résultats, on peut dire que la mortalité du ver à soie observée et due à la polyédrose est plutôt causée par une infection secondaire non contrôlée et dans une moindre mesure par l'activation de la forme latente du virus. Ceci pourrait expliquer l'absence de polyédrose dans les premières expériences (Kremky et Michalska, 1984) lors du traitement à basse température. La variabilité génétique qui est responsable de la sensibilité à la polyédrose pourrait être éliminée par sélection.

CONCLUSIONS

Sur la base des résultats obtenus lors de cette expérience, on peut dire que :

1. Chez les groupes inoculés avec le virus à chaque génération (I), le taux de survie est plus élevé que chez les groupes inoculés lors d'une seule génération (UI). Cette différence pourrait être considérée comme une réaction à la sélection.

2. La diminution du taux de survie après le traitement à basse température (US et IS) pourrait être due à l'activation du virus de la polyédrose nucléaire. Ceci pourrait confirmer l'hypothèse sur le transfert transovarien du virus. D'un autre côté, la diminution du taux de survie chez les groupes soumis à basse température (US) peut indiquer la présence d'infections secondaires.

3. Les lignées testées ont montré des réactions différentes à l'inoculation, comme au traitement à basse température.

4. Des infections externes plutôt que l'activation de la forme latente du virus semblent être la cause principale de la maladie. La diminution du taux de survie chez les groupes non-inoculés soumis à basse température (US) semble indiquer la présence d'infections secondaires.

STUDY ON THE SPREAD OF PEBRINE AFTER INTRODUCTION OF TRANSOVIARIALLY INFECTED WORMS IN A COLONY OF SILKWORM (*BOMBYX MORI* L.)

M. BAIG, M.V. SAMSON, T.O. SASIDHARAN, S.D. SHARMA, M. BALAVENKATASUBBAIAH and M.S. JOLLY Central Sericultural Research & Training Institute, Mysore 8, India.

1,3,6,9,12 and 15 larvae transovarially infected with pebrine were introduced in a colony of 200 healthy silkworms, *Bombyx mori* at III instar. During larval stage there was no mortality due to pebrine. However in moth stage 41.32% of infection was recorded in batches introduced with one infected larva. The infection increased proportionately with the increase in the number of infected larvae introduced. In 15 larvae introduced batches the infection was 83.47%. Spread of infection due to secondary contamination is assessed.

INTRODUCTION

Pebrine is a chronic disease of silkworm, *Bombyx mori* caused by a microsporidian parasite, *Nosema bombycis* (Naegeli). Most common ways of infection are transovarial and peroral (Pasteur, 1870). The disease is also transmitted from one generation to the next through the external contamination of eggs by spores (Masera, 1938a). Few authors have reported the seasonal changes in the incidence of pebrine disease of silkworm (Noamani *et al.*, 1971a; Devaiah and Krishnaswami, 1975). Noamani *et al.* (1971b) assessed the changes in cocoon characters in infected silkworm larvae. Many reports (Neriki and Ito, 1896; Ishiwata, 1897; and Ohshima, 1960) are available concerning the epizootiology of pebrine in Japan. The reports of the extent of damage due to secondary contamination of pebrine in a rearing bed are almost non-existent in India. Therefore the present study is aimed at determining the extent of infection when transovarially infected larvae are introduced in a colony of healthy silkworm larvae.

MATERIAL AND METHODS

A popular bivoltine hybrid race (NB₁₈ x NB₇) of silkworm, *Bombyx mori* were brushed and reared upto II instar in normal rearing conditions. After II moult, 1,3,6,9,12 and 15 transovarially infected larvae were introduced in a colony of 200 healthy larvae each. Three replications for each group were maintained and rearing was continued upto spinning stage. Dead larvae were tested for the presence of pebrine spores. Data in respect of the rearing performance and other characters like larval weight, larval duration, E.R.R. %, single cocoon weight, single shell weight and shell ratio were also recorded. Good cocoons thus harvested were kept for moth emergence and later were microscopically examined for the presence of the spores of *Nosema bombycis* and total infection in moth stage was recorded and tabulated in Table I.

No. of larvae introduced per bed/ <i>Nbre de larves malades par claie</i>		Wt of 10 larvae/ Pds de 10 larves	Larval duration days : hours/ <i>Période larvaire jours : heures</i>	E.E.R./ Taux effectif	Single cocoon weight/ <i>Poids du cocon (g)</i>	Single shell weight/ <i>Poids de la coque (g)</i>	Shell ratio/ Richesse <i>soyeuse (%)</i>	Total % of infection in moth stage/ <i>% total d'infection au stade papillon</i>
1	1 larva/ larve	34.57	27 : 06	84.83	1.633	0.320	19.55	41.32
2.	3 larvae/larves	37.87	27 : 06	80.00	1.593	0.310	19.44	45.10
3.	6 larvae/larves	38.50	27 : 06	80.00	1.573	0.283	18.01	63.23
4.	9 larvae/larves	37.03	27 : 06	76.17	1.600	0.310	19.38	69.46
5.	12 larvae/larves	36.83	27 : 06	69.83	1.500	0.300	20.00	76.55
6.	15 larvae/larves	36.77	27 : 06	71.67	1.620	0.313	19.33	83.47
7.	Control/ Lot témoin	37.10	27 : 00	77.83	1.660	0.343	20.48	-
C.D. at 5% level/ C.D. au seuil de 5 %		N.S.	N.S.	5.42	0.082	N.S.	N.S.	4.76

Table I. Spread of pebrine after introduction of infected larvae in a colony of healthy silkworms.

Tableau I. Diffusion de la pébrine après introduction de larves infectées dans une population saine de vers à soie.

RESULTS AND DISCUSSION

Results of the experiment are presented in Table I. It is evident from the data obtained, that no significant changes were observed in larval weight and it ranged between 34.57g to 38.50g in the beds introduced with infected larvae whereas in control the larval weight was 37.01g. The larval duration was less by 6 hours in control (27.00) than in treated batches. A decrease in E.R.R.% was observed with the increase in the number of infected larvae introduced in a bed. Single cocoon weight, single shell weight and S.R.% were not affected significantly by the introduction of infected larvae.

No mortality due to pebrine was recorded during larval stage. Testing results of moth examination clearly indicate that with the increase in the number of infected larvae introduced, the percent infection in moth stage was proportionately increased. In one infected larva introduced batch, 41.32% infection was recorded whereas 3, 6, 9, 12 and 15 infected larvae introduced batches showed 45.10%, 63.23%, 69.46%, 76.55% and 83.47% infection respectively. No infection was recorded in control.

The results of the experiment quantifies and affirms the fast spreading nature of the disease through secondary contamination. The extent of contamination was in proportion to the number of infected larvae introduced and it reached to as high as 83.47% level when 15 larvae were introduced. In a similar study, Ishihara (1965) also confirmed the above findings and reported that the change of the epizootic pattern corresponded to the change in number of larvae excreting spores of *Nosema bombycis*.

REFERENCES

- DEVAIAH M.C., KRISHNASWAMI S. (1975) Observations on the seasonal incidence of pebrine disease on the silkworm *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 15, 27-30.
- ISHIHARA R. (1965) The spread of pebrine within a colony of the silkworm *Bombyx mori* (Linnaeus). J. Invertebr. Pathol., 7, 126-131.
- ISHIWATA T. (1897) Effect of transovum transmission of *Nosema bombycis* Naegeli on the silkworm rearing. Tokyo Sangyo Koshujo Jokoku, 13, 142-195.
- MASERA E. (1938a) Azione biologica di metalli sulle uova di *Bombyx mori* L. infetti di pebrina (nota preliminare). Mem. R. Accad. Sci. Arti. Padova, 54, 7.
- NERIKI Y., ITO T. (1896) Studies on pebrine disease. Tokyo Sangyo Koshujo Hukoku, w12, 236-273.
- NOAMANI M.K.R., KRISHNASAMI S., SHAKUNDU A.K. (1971a) Assessment of different cocoon characters of the multivoltine silkworm *Bombyx mori* L. as influenced by pebrine disease. Indian J. Seric., 10, 96-100.
- NOAMANI M.K.R., KRISHNASAMI S., SHAKUNDU A.K. (1971b) Observations on the seasonal incidence and intensity of pebrine disease of the silkworm (*Bombyx mori* L.) under West Bengal climatic conditions. Indian J. Seric., 10, 101-104.
- OHSHIMA K. (1960) Investigation on the distribution of the moth of silkworm (*Bombyx mori* L.) suffering from pebrine in a lot and its sampling method. Japan J. Appl. Entomol. Zool., 4, 212-225.
- PASTEUR L. (1870) Etudes sur la maladie des vers soie. In: Pebrine disease of silkworm, 1971, Overseas Technical Cooperation Agency, Japan.

ETUDE SUR LA DIFFUSION DE LA PÉBRINE APRES INTRODUCTION DE LARVES INFECTÉES PAR VOIE TRANSOVARIENNE DANS UNE POPULATION DE VERS A SOIE *BOMBYX MORI* L.

M. BAIG, M.V. SAMSON, T.O. SASIDHARAN, S.D. SHARMA, M.
BALAVENKATASUBBAIAH et M.S. JOLLY Central Sericultural Research & Training
Institute, Mysore 8, Inde.

1, 3, 6, 9, 12 et 15 larves infectées par la pébrine par voie transovarienne sont introduites dans une population saine de 200 vers à soie Bombyx mori au 3ème âge. On n'observe pas de mortalité due à la pébrine au cours de la période larvaire. Cependant au stade du papillon, on enregistre 41,32 % d'infection dans les lots où l'on a introduit une larve infectée. L'infection augmente proportionnellement au nombre de larves infectées introduites. Dans les lots où l'on a introduit 15 larves infectées, le pourcentage d'infection est de 83,47. Nous avons calculé la diffusion de l'infection par contamination secondaire.

INTRODUCTION

La pébrine est une maladie chronique du ver à soie *Bombyx mori* causée par un parasite microsporidien, *Nosema bombycis* (Naegeli). Les moyens de contamination les plus courants sont par les voies transovarienne et pérorale (Pasteur, 1870). La maladie se transmet également d'une génération à l'autre par contamination externe des oeufs par des spores (Masera, 1938a). Quelques auteurs ont décrit les variations saisonnières de la pébrine du ver à soie (Noamani *et al.*, 1971a ; Devaiah et Krishnaswami, 1975).

Noamani *et al.* (1971b) ont évalué les variations des caractères du cocon chez les larves infectées. On trouve de nombreux rapports (Neriki et Ito, 1896 ; Ishiwata, 1897 et Oshima, 1960) sur l'épizootie de la pébrine au Japon. Les rapports sur l'étendue des dégâts provoqués par contamination secondaire de pébrine dans les claies d'élevage sont pratiquement inexistantes en Inde. Notre étude a pour but de déterminer l'importance de l'infection quand des larves infectées par la voie transovarienne sont introduites dans une population de vers à soie sains.

MATERIEL ET METHODES

Des vers à soie d'une race hybride bivoltine de *Bombyx mori* (NB₁₈ x NB₇) sont élevés dans des conditions normales jusqu'au 2ème âge. Après la 2ème mue, 1, 3, 6, 9, 12 et 15 larves infectées par voie transovarienne sont introduites dans des populations saines de 200 larves chacune. Trois replicatas sont effectués pour chaque groupe et l'élevage est poursuivi jusqu'au stade du filage du cocon. Les larves mortes sont examinées pour déterminer la présence des spores de pébrine. Les données concernant les performances d'élevage et d'autres caractères tels que le poids larvaire, la durée de la période larvaire, le taux effectif d'élevage (%), le poids du cocon simple, le poids de la coque simple et la richesse soyeuse sont également enregistrées. Les bons cocons récoltés sont gardés jusqu'à l'émergence du papillon et sont ensuite examinés au microscope pour déterminer la présence de spores de *Nosema bombycis* et l'infection totale au stade du papillon a été représentée dans le Tableau I.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de l'expérience sont présentés dans le Tableau I. D'après les valeurs obtenues, on n'observe pas de changement significatif dans le poids larvaire qui se situe entre 34,57 g et 38,50 g dans les claies où l'on a introduit des larves infectées alors que le poids larvaire chez les lots témoins est de 37,01 g. La période larvaire est de 6 jours plus courte chez les témoins (27,00) que chez les lots traités. On observe une diminution du taux effectif d'élevage avec l'augmentation du nombre de larves infectées introduites. Le poids du cocon, le poids de la coque et la richesse soyeuse ne sont pas affectés de manière significative par l'introduction de larves infectées.

On n'enregistre pas de mortalité due à la pébrine pendant la période larvaire. Les résultats de l'examen des papillons indiquent clairement que le pourcentage d'infection au stade adulte augmente proportionnellement au nombre de larves infectées introduites. On enregistre 41,32 % d'infection dans le lot avec introduction d'une larve infectée alors que les pourcentages d'infection sont respectivement de 45,10; 63,23; 69,46; 76,55 et 83,47 % chez les lots avec introduction de 3, 6, 9, 12 et 15 larves infectées. On n'enregistre pas d'infection dans le lot témoin.

Les résultats de l'expérience quantifient et confirment la vitesse de propagation de la maladie par la contamination secondaire. L'importance de la contamination est proportionnelle au nombre de larves infectées introduites et atteint 83,47 % lorsque 15 larves sont introduites. Dans une étude similaire, Ishihara (1965) a également confirmé les résultats ci-dessus et a observé que le changement du paysage épizootique correspond au changement du nombre de larves excréant des spores de *Nosema bombycis*.

EFFECT OF CERTAIN DISINFECTANTS AS SURFACE STERILENTS AGAINST PEBRINE IN SURFACE CONTAMINATED LAYINGS

M. BAIG, M.V. SAMSON, S.D. SHARMA, M. BALAVENKATASUBBAIAH, T.O.
SASIDHARAN and M.S. JOLLY Central Sericultural Research & Training Institute,
Mysore 570 008, India.

The comparative efficacy of four disinfectants viz., Hilite (potassium dichloro isocyanurate), Sodium hypochlorite, bleaching powder and formalin in four different concentrations (0.5%, 1.0%, 1.5% and 2.0%) were tested as surface sterilents against the spread of pebrine (Nosema bombycis) in a colony of silkworm, Bombyx mori, hatched from surface contaminated layings. All the tested concentrations of disinfectants were found to be effective in preventing the spread of disease. The rate of infection ranged between 1.34% and 4.11% in treated batches, whereas in control batch the infection was 62.52% at moth stage.

INTRODUCTION

Pebrine is one of the most deadly diseases of silkworm, *Bombyx mori* caused by a protozoan parasite, *Nosema bombycis*. Much work has been done by different authors on various aspects of the disease and its causative agent (Lavanya, 1982; Abe, 1978; Devaiah and Krishnaswami, 1976). Several authors have studied the infectivity and pathogenicity of *Nosema bombycis* to silkworm larvae (Ishihara, 1963; Oshima, 1970; Fujiwara, 1979). Astaurov *et al.* (1952) suggested short treatment with hot water for the control of pebrine in silkworm eggs. Sterilizing actions of high temperature on infections in silkworm during different stages of diapause have also been reported by Bedrjakova and Verenskaja (1958). Fujiwara and Kagawa (1984) studied the control of *Nosema bombycis* parasitising silkworm eggs by treatments with hydrochloric acid or exposure to various temperatures. In the present study, a few disinfectants have been tested to evaluate their efficacy as surface sterilents against surface contamination of layings with *Nosema bombycis* spores.

MATERIAL AND METHODS

A popular bivoltine hybrid race, NB18 x NB7, of silkworm was used in the present study. The layings in blue egg stage were surface contaminated with a fixed load of *Nosema bombycis* spores (0.2ml of a spore suspension of 9×10^9 spore/ml for each laying) and then allowed to dry. After contamination, the layings were dipped in four concentrations (viz. 0.5%, 1.0%, 1.5% and 2.0%) of Hilite, sodium hypochlorite, bleaching powder and formalin for 10 minutes and later dried and incubated at 25°C. After hatching, the larvae were reared under normal rearing conditions. After III moult, three replications of 100 larvae each were made for each treatment alongwith two controls (viz. (a) contaminated layings dipped in distilled water for 10 minutes, and (b) contaminated laying without dipping).

Treatment/ Traitement	Weight of 10 mature larvae/ <i>Poids de 10 larves matures</i> (g)	Larval duration/ <i>Période larvaire</i> (hr)	E.R.R./ Taux <i>effectif d'élevage</i> (%)	Single cocoon weight/ <i>Poids du cocon</i> (g)	Single shell weight/ <i>Poids de la coque</i> (g)	Shell ratio/ <i>Richesse soyeuse</i> (%)
Hilite 0.5%/ <i>Hilite à 0,5 %</i>	36.67	668	83.66	1.491	0.303	20.35
Sodium hypochlorite 0.5%/ <i>Hypochlorite de sodium à 0,5 %</i>	37.92	668	83.26	1.525	0.313	20.52
Bleaching powder 0.5%/ <i>Chlorure de chaux à 0,5 %</i>	36.54	657	84.33	1.515	0.306	20.18
Formalin 0.5%/ <i>Formol à 0,5 %</i>	36.63	673	81.33	1.544	0.325	21.12
Hilite 1.0%/ <i>Hilite à 1,0 %</i>	35.91	672	85.16	1.541	0.324	20.95
Sodium hypochlorite 1.0%/ <i>Hypochlorite de sodium à 1,0 %</i>	36.07	674	81.65	1.547	0.317	20.40
Bleaching powder 1.0%/ <i>Chlorure de chaux à 1,0 %</i>	38.02	673	81.11	1.503	0.313	20.85
Formalin 1.0%/ <i>Formol à 1,0 %</i>	37.25	674	79.89	1.160	0.315	21.12
Inoculated control dipped in distilled water/ <i>Lot témoin inoculé traité à l'eau distillée</i>	35.75	676	79.83	1.460	0.295	20.24
Inoculated control/ <i>Lot témoin</i>	36.92	662	77.44	1.499	0.304	20.45
C.D. at 5%/ <i>C.D. au seuil de 5 %</i>	1.48	1.31	-	-	-	-

Table I. Effect of various disinfectants (at 0.5 and 1.0% concentration) on larval and cocoon characters of silkworm *Bombyx mori* L.

Tableau I. Effet de divers désinfectants (utilisés en concentrations de 0,5 et 1,0 %) sur les caractères larvaires et du cocon chez *Bombyx mori* L.

Treatment/ Traitement	Weight of 10 mature larvae/ Poids de 10 larves matures (g)	Larval duration/ Période larvaire (hr)	E.R.R./ Taux effectif d'élevage (%)	Single cocoon weight/ Poids du cocon (g)	Single shell weight/ Poids de la coque (g)	Shell ratio/ Richesse soyeuse (%)
Hilite 1.5%/ Hilite à 1,5 %	38.34	672	83.11	1.532	0.317	21.00
Sodium hypochlorite 1.5%/ Hypochlorite de sodium à 1,5 %	37.97	674	81.89	1.544	0.312	20.25
Bleaching powder 1.5%/ Chlorure de chaux à 1,5 %	36.58	676	82.00	1.531	0.325	21.20
Formalin 1.5%/ Formol à 1,5 %	38.08	673	82.16	1.510	0.307	20.43
Hilite 2.0%/ Hilite à 2,0 %	37.88	672	84.16	1.478	0.305	21.06
Sodium hypochlorite 2.0%/ Hypochlorite de sodium à 2,0 %	37.22	674	83.33	1.510	0.317	20.98
Bleaching powder 2.0%/ Chlorure de chaux à 2,0 %	35.82	674	79.35	1.526	0.319	20.95
Formalin 2.0%/ Formol à 2,0 %	36.44	672	78.39	1.486	0.304	20.49
Inoculated control dipped in distilled water/Lot témoin inoculé traité à l'eau distillée	35.75	676	79.83	1.460	0.295	20.24
Inoculated control/ Lot témoin	36.92	662	77.44	1.499	0.304	20.45
C.D. at 5%/ C.D. au seuil de 5 %	1.48	1.31	-	-	-	-

Table II. Effect of various disinfectants (at 1.5 and 2.0% concentration) on larval and cocoon characters of silkworm *Bombyx mori* L.

Tableau II. Effet de divers désinfectants (utilisés en concentrations de 1,5 et 2,0 %) sur les caractères larvaires et du cocon chez *Bombyx mori* L.

DISINFECTANTS AGAINST PEBRINE

Treatment/ Traitement	% of diseases during larval stage/ % de maladies pendant le stade larvaire			% of pebrine during moth stage/ % de pébrine pendant le stade papillon
	Pebrine/ Pébrine	Other diseases/ Autres maladies	Total/ Total	
Hilite 0.5%/ Hilite à 0,5 %	-	16.33	16.33	2.67
Sodium hypochlorite 0.5%/ Hypochlorite de sodium à 0,5 %	-	16.72	16.72	4.11
Bleaching powder 0.5%/ Chlorure de chaux à 0,5 %	-	15.72	15.72	3.92
Formalin 0.5%/ Formol à 0,5 %	-	18.16	18.16	3.21
Hilite 1.0%/ Hilite à 1,0 %	-	14.82	14.82	2.80
Sodium hypochlorite 1.0%/ Hypochlorite de sodium à 1,0 %	-	18.11	18.11	2.56
Bleaching powder 1.0%/ Chlorure de chaux à 1,0 %	-	17.88	17.88	2.76
Formalin 1.0%/ Formol à 1,0 %	-	20.10	20.10	2.73
Inoculated control dipped in distilled water/ Lot témoin inoculé traité à l'eau distillée	3.83	16.72	20.55	46.14
Inoculated control/ Lot témoin	5.99	19.44	25.43	62.52
C.D. at 5%/ C.D. au seuil de 5 %	-	2.01	2.01	1.20

Table III. Effect of various disinfectants (at 0.5 and 1.0% concentration) on the incidence of pebrine during larval and moth stage of the silkworm, *Bombyx mori* L.

Tableau III. Effet de divers désinfectants (en concentrations de 0,5 et 1,0 %) sur la présence de pébrine au cours des stades larvaire et adulte du ver à soie *Bombyx mori* L.

Treatment/ Traitement	% of diseases during larval stage/ % de maladies pendant le stade larvaire			% of pebrine during moth stage/ %
	Pebrine/ Pébrine	Other diseases/ Autres maladies	Total/ Total	% de pébrine pendant le stade papillon
Hilite 1.5%/- Hilite à 1,5 %	16.88	16.88	1.75	
Sodium hypochlorite 1.5%/ Hypochlorite de sodium à 1,5 %	-	19.22	19.22	2.08
Bleaching powder 1.5%/ Chlorure de chaux à 1,5 %	-	17.99	17.99	2.85
Formalin 1.5%/ Formol à 1,5 %	-	18.16	18.16	2.20
Hilite 2.0%/ Hilite à 2,0 %	-	17.18	17.18	2.54
Sodium hypochlorite 2.0%/ Hypochlorite de sodium à 2,0 %	-	15.66	15.66	2.08
Bleaching powder 2.0%/ Chlorure de chaux à 2,0 %	-	30.60	30.60	2.75
Formalin 2.0%/ Formol à 2,0 %	-	21.60	21.60	1.34
Inoculated control dipped in distilled water/Lot témoin inoculé traité à l'eau distillée	3.83	16.72	20.55	46.14
Inoculated control/ Lot témoin	5.99	19.44	25.43	62.52
C.D. at 5%/ C.D. au seuil de 5 %	-	2.01	2.01	1.20

Table IV. Effect of various disinfectants (at 1.5 and 2.0% concentration) on the incidence of pebrine during larval and moth stage of the silkworm, *Bombyx mori* L.

Tableau IV. Effet de divers désinfectants (en concentrations de 1,5 et 2,0 %) sur la présence de pébrine au cours des stades larvaire et adulte du ver à soie *Bombyx mori* L.

A regular record of mortality due to pebrine and other diseases was maintained throughout the rearing. Other rearing characters such as larval duration, larval weight, single cocoon weight, single shell weight and shell ratio % were recorded. The harvested good cocoons were kept for moth emergence. The moths thus emerged were tested for the presence of the spores of *Nosema bombycis* and the results were tabulated.

RESULTS AND DISCUSSION

The data on the average of three trials are furnished in Tables I-IV. Larval duration and larval weight showed significant variation from the control batches. Among the various treatments, highest percentage of ERR was obtained in Hilite (1%) treated batches (85.16%). The lowest ERR (77.54%) as expected was observed in inoculated control. Characters viz., single cocoon weight, single shell weight and SR % were not found to be affected by any of the treatments at any concentration.

There was no mortality due to pebrine in all the treatments. However, two controls viz., inoculated control dipped in distilled water and inoculated control without any treatment showed 3.83 and 5.99% mortality respectively. The incidence of other diseases as evident from the tables III & IV did not follow any pattern. The moths emerged from the cocoons so reared, revealed the presence of *Nosema bombycis* spores. In Hilite treated batches, the infection rate ranged between 1.75 and 2.80%. In batches treated with different concentrations of sodium hypochlorite, infection was in the range of 2.08-4.11%. In case of treatment with bleaching powder, 3.92% infection was recorded at 0.5% concentration and 2.75% at 2.0% concentration. Formalin treatment at 2.0% concentration resulted in the lowest incidence of pebrine (1.34%).

All the treatments were found to be highly effective when compared to inoculated control in which the infection was as high as 62.52%. The layings contaminated and dipped in distilled water recorded lower incidence of pebrine than the contaminated control as spores would have been washed away due to dipping in water.

All the disinfectants tested as surface sterilents significantly reduced the incidence of pebrine. Kagawa (1980) studied the efficacy of formalin as disinfectant against *Nosema bombycis* and reported an increased death rate of spores with increase in formalin concentration and temperature. Hitoshi and Ishihara (1981) tested nine kinds of chemicals as inhibitory agents against the hatch of *Nosema bombycis*, including Hilite which showed high degree of inhibitory effect on the spores. Similar effect has also been observed in present study with Hilite, the treatment of which significantly reduced the spread of pebrine infection.

It may be concluded from the studies that the four disinfectants viz., Hilite, Sodium hypochlorite, Bleaching powder and Formalin can effectively be used as surface sterilents in all the concentrations reported in this study. Hilite in particular as evident from the results, seems to be suitable alternative surface sterilent for Formalin.

REFERENCES

- ABE Y. (1978) The life cycle of *Leptomonas* sp., a protozoan parasite of the silkworm *Bombyx mori* L. J. Sericult. Sci. Japan, 47(5), 421-426.
- ASTAUROV B.L., OVANESJAN T.G., LOBSHAMIDZE V.G. (1952) Disinfection of pebrinous eggs of the silkworm by short treatment with hot water. Dokl. Varchril, 3, 44-51.
- BEDRJAKOVA T.A., VERENSKAJA V.N. (1958) Sterilization action of high temperatures on infections of the silkworm *Bombyx mori* L. with *Nosema bombycis* Naeg. during the different stages of diapause. Kodlady Akad. Nauk SSSR., 122, 737-740.
- DEVAIAH M.C., KRISHNASWAMI S. (1976) Observations on the seasonal incidence of pebrine disease on the silkworm *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 14(1), 27-30.
- FUJIWARA T. (1979) Infectivity and pathogenicity of *Nosema bombycis* to larvae of the silkworm. J. Sericult. Sci. Japan, 48, 376-380.
- FUJIWARA T., KAGAWA T. (1984) Control of *Nosema bombycis* parasitising silkworm eggs by treatments with hydrochloric acid or exposure to various temperatures. J. Sericult. Sci. Japan, 53, 394-397.

- HITOSHI I., ISHIHARA R. (1981) Inhibitory effect of several chemicals against the hatch of *Nosema bombycis* spores. J. Sericult. Sci. Japan, 50, 276-281.
- ISHIHARA R. (1963) Effect of infection by *Nosema bombycis* Nageli on pupal development of the silkworm, *Bombyx mori* L. J. Insect Pathol., 5, 131-140.
- KAGAWA T. (1980) The efficacy of formalin as disinfectant of *Nosema bombycis* spores. J. Sericult. Sci. Japan, 48, 218-222.
- LAVANYA A. (1982) Pathological influences of *Nosema bombycis* in the NB4D2 race of *Bombyx mori*. Mol. Biochem., Parasitol., O (suppl.) 413.
- OSHITA K. (1970) *Nosema* disease of the dead silkworm *Bombyx mori* L. after ripeness. J. Sericult. Sci. Japan, 39, 243-247.

EFFET DE CERTAINS DESINFECTANTS UTILISES POUR STERILISER LA SURFACE DES PONTES CONTAMINEES PAR LA PEBRINE

M. BAIG, M.V. SAMSON, S.D. SHARMA, M. BALAVENKATASUBBAIAH, T.O.
SASIDHARAN et M.S. JOLLY Central Sericultural Research & Training Institute, Mysore
570 008, Inde.

Nous avons testé et comparé l'efficacité de quatre désinfectants ; Hilite (potassium dichloro isocyanurate), hypochlorite de sodium, chaux et formaline, à quatre concentrations différentes (0,5, 1,0, 1,5 et 2,0 %), comme stérilisants de surface pour lutter contre la pébrine (Nosema bombycis) chez une population de vers à soie Bombyx mori, éclosés d'oeufs contaminés en surface. Les quatre concentrations de désinfectants testées se sont révélées efficaces pour prévenir la propagation de la pébrine. Le taux d'infection va de 1,34 à 4,11 % chez les lots traités, pour 62,52 % chez le lot témoin au stade du papillon.

INTRODUCTION

La pébrine, l'une des maladies les plus mortelles du ver à soie, est causée par un parasite protozoaire, *Nosema bombycis*. Beaucoup de travaux ont été faits par différents auteurs sur divers aspects de la maladie et de son agent (Lavanya, 1982 ; Abe, 1978 ; Devaiah et Krishnaswami, 1976). Plusieurs auteurs ont étudié l'infectivité et la pathogénicité de *Nosema bombycis* envers les larves de ver à soie (Ishihara, 1963 ; Oshima, 1970 ; Fujiwara, 1979). Astaurov et al. (1952) ont suggéré un court traitement à l'eau chaude pour les oeufs du ver à soie. Bedrjakova et Verenskaja (1958) ont décrit l'action stérilisante des hautes températures sur les infections du ver à soie à différents stades de la diapause. Fujiwara et Kagawa (1984) ont étudié la lutte contre *Nosema bombycis* parasitant les oeufs de ver à soie par des traitements à l'acide chlorhydrique ou l'exposition à diverses températures. Nous avons essayé dans la présente étude d'évaluer l'efficacité de quelques désinfectants utilisés pour stériliser la surface des oeufs contaminés avec des spores de *Nosema bombycis*.

MATERIEL ET METHODES

Nous avons utilisé pour cette étude une race hybride bivoltine populaire, NB₁₈ X NB₇. Les pontes au stade de la tache noire ont été contaminées avec une charge fixe de spores de *Nosema bombycis* (0,2 ml de suspension de spores contenant 9×10^6 spores/ml pour chaque ponte) et laissées à sécher. Après la contamination, les pontes sont plongées dans 4 concentrations (0,5, 1,0, 1,5 et 2,0 %) de Hilite, hypochlorite de sodium, chaux et formaline pendant 10 minutes et ensuite séchées, puis placées en incubation à 25°C. Après l'éclosion, les larves sont élevées dans des conditions normales d'élevage. Après la 3ème mue, 3 replicatas de 100 larves chacun sont faits pour chaque traitement ainsi que 2 lots témoins (a. pontes contaminées trempées dans de l'eau distillée pendant 10 minutes, et b. pontes contaminées sans trempage).

Les valeurs concernant la mortalité due à la pébrine et d'autres maladies ont été enregistrées régulièrement pendant tout l'élevage. D'autres caractères tels que la durée de la période larvaire, le poids larvaire, le poids du cocon simple, le poids de la coque et la richesse soyeuse (%) ont été enregistrés. Les bons cocons récoltés ont été gardés jusqu'à l'émergence du papillon. La présence de spores de *Nosema bombycis* a été examinée chez les papillons obtenus.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les valeurs moyennes obtenues pour les trois replicatas sont données dans les Tableaux I-IV. La période larvaire et le poids larvaire subissent une variation significative par rapport aux lots témoins. Parmi les différents traitements, le plus haut pourcentage du taux effectif d'élevage (85,16 %) est obtenu avec les lots traités par Hilite à 1 %. Le taux effectif d'élevage le plus faible (77,44 %) est bien sûr observé chez les lots témoins inoculés. Les caractères suivants : poids du cocon, poids de la coque et richesse soyeuse ne semblent affectés par aucun des traitements à aucune des concentrations.

On observe aucune mortalité due à la pébrine avec les divers traitements. Cependant, chez les deux témoins, témoins inoculés trempés dans de l'eau distillée et témoins inoculés sans traitement, on observe respectivement 3,83 et 5,99 % de mortalité.

L'incidence des autres maladies mise en évidence dans les tableaux III et IV ne suit aucun schéma déterminé. On observe la présence de spores de *Nosema bombycis* chez les papillons obtenus. Dans les lots traités avec Hilite, le taux d'infection varie de 1,75 à 2,80 %. Dans les lots traités avec différentes concentrations d'hypochlorite de sodium, l'infection varie de 2,08 à 4,11 %. Dans le cas du traitement avec de la chaux, on a enregistré 3,92 % d'infection avec la concentration de 0,5 % et 2,75 % avec la concentration de 2,0 %. Le traitement à la formaline 2,0 % génère l'incidence de pébrine la plus faible (1,34 %).

Tous les traitements se sont montrés très efficaces par rapport au lot témoin chez lequel l'infection est de 62,52 %. L'incidence de la pébrine est plus faible chez les pontes contaminées et trempées dans de l'eau distillée car les spores ont dû être libérées par le trempage dans l'eau.

Tous les désinfectants employés comme stérilisants de surface ont réduit l'incidence de la pébrine. Kagawa (1980) a étudié l'efficacité de la formaline employée comme désinfectant contre *Nosema bombycis* et a observé une augmentation du taux de mortalité des spores avec l'élévation de la concentration de formaline et de la température. Hitoshi et Ishihara (1981) ont testé neuf sortes de produits chimiques employés comme agents inhibiteurs de l'éclosion de *Nosema bombycis*, y compris l'Hilite lequel a montré un effet inhibiteur élevé sur les spores. Le même effet est observé ici avec l'Hilite, qui réduit de manière significative l'étendue de la pébrine.

On peut conclure que les quatre désinfectants : Hilite, l'hypochlorite de sodium, la chaux et la formaline peuvent être employés efficacement comme stérilisants de surface dans toutes les concentrations étudiées ici. L'Hilite en particulier, comme le montrent les résultats, semble pouvoir remplacer efficacement la formaline.

ULTIMATE KARYOTYPE OF THE HYBRID BETWEEN *ANTHRAEA PERNYI* AND *A. ROYLEI*

Th. BHAGIRATH, S.C. KUNDU and N. IBOTOMBI Department of Life Sciences, Manipur University, Imphal 795 003, India.

Surface-spread synaptonemal complexes (SCs) in the females of F₄₁₋₄₃ of the cross between Anthraea roylei (n=30) and A. pernyi (n=49) were analyzed at the light microscope level. In all the pachytene nuclei examined 49 bivalent SCs were observed. The progenies of the filial generations of the cross studied apparently consist of a uniform population of individuals with 49 bivalents of A. pernyi origin.

INTRODUCTION

Jolly *et al.* (1969) succeeded to produce fully fertile hybrids of two silkworm species, Chinese *Anthraea pernyi* (n=49) and Indian *A. roylei* (n=30). They observed 30, and 32-48 chromosomal units in the metaphase I of the F₁ and F₂ respectively of both the cross and reciprocals (Jolly *et al.*, 1979). Unfortunately pairing behaviour of the parental chromosomes in the primary and early subsequent hybrid generations and backcross progenies was not studied.

Careful examination of Effective Rearing Ratio indicates a sign of low viability in F₂ (Tazima, 1974). Rearing records at Regional Tasar Research Station at Imphal and several other Tasar Farms of Manipur during 1975-1981 showed a sign of adverse effects on viability in filial generations twenties and thirties. For the assurance of the crop the stabilization of chromosome constitution and/or regular disjunction at meiosis are urgently needed as far as the use of filial generations of the hybrid is contemplated. For an understanding of the chromosome constitution and behaviour in the current filial generations of this hybrid pachytene analysis through surface spreading of SCs was undertaken. The study may also provide an insight into the chromosome homology and genetic balance between the two parental species and the ultimate karyotype of the hybrid.

MATERIALS AND METHODS

F₄₁, 42 and 43 progenies of an interspecific hybrid between *Anthraea pernyi* (n=49) and *A. roylei* (n=30), supplied by Regional Tasar Research Station, Imphal, and Government Tasar Farms, Wangbal and Pellele, Manipur, were used in the present study. The ovaries from the third to fifth instar larvae were dissected out and kept in Hank's balanced salt solution (calcium and magnesium free). The fat body was cleaned off and the agglutinated cells of the ovarioles were teased with two tungsten needles under dissecting microscope until the cells were free from one another. A slide (acid-alcohol cleaned and air-dried) was vigorously rubbed with clean silk and a bubble (about 1cm diameter) of chilled 0.2 M sucrose was made. Using a micropipette, a drop of the cell suspension was dropped over the sucrose bubble from a height of about 2cm and the cells were allowed to spread for 30-60 secs. The cells were picked up with a slide cleaned as mentioned above. Both slides were fixed, stained and mounted as described elsewhere (Bhagirath and Kundu, 1985).

The mean relative lengths of individual SCs are given, according to Moses (1977), as the percentage of total SC complement length. The absolute length of each SC, used for relative length calculation, was reproduced with a fine wire from the photograph and length of the wire was measured with a Monostate micrometer as described by Sung and Jagiello (1982).

RESULTS

In all the pachytene nuclei examined, 49 bivalent SCs could be observed (Fig. 1). The small size, large number and frequent overlapping of the SCs rendered it difficult the detailed analysis with light microscope of the constitution and the pairing behaviour of the chromosomes in this hybrid. Moreover, the complexes are often seen in tandem, attached end-to-end associations which may be so closed as to make it difficult to discern the individual members and thus to count the SC number. Nevertheless in favourable preparations it is apparent that the pairing is almost complete and regular. However, in a rare pachytene cell an incomplete SC was observed which had synapsis at both ends and unpaired segment at the middle region (Fig. 1, arrow). Probably the bivalent consists of homoeologous parental chromosomes. One to two spherical nucleoli were present in different early prophase cells. This variation in nucleolus number may be due to different chromosome composition in different cells. The nucleolar organizers are always fused and could be structurally identified in a few cells only. Some of the SCs possess 1-2 distinct terminal or interstitial knobs and thus they can be identified in different cells. Bivalent configuration varies from an almost straight line to a loop. Terminal modification at both ends of each SC is very conspicuous. Several bead like structures are present in the SCs.

Mean relative length and standard deviation of individual bivalents calculated from 5 pachytene cells are shown in Table I. The variation in lengths of each chromosome in different nuclei is small as indicated by small standard deviations. This suggests that the variation in total SC length between different nuclei is distributed more or less evenly among all 49 bivalents of a particular nucleus.

DISCUSSION

The observation of 49 bivalents (Fig. 1) in the hybrid generations studied indicates that the 49 bivalents karyotype is at premium in the situation in which the hybrid has been exposed. Jolly *et al.* (1973) observed only 30 chromosomal units at metaphase I of the first filial generation of both the cross and reciprocal. This observation led Tazima (1974) to suggest that of 30 *roylei* chromosomes 19 pair with 38 *pernyi* chromosomes, 1 *roylei* chromosome associating with 2 *pernyi* chromosomes which are end-to-end associated, forming 19 trivalents and the rest 11 *roylei* chromosomes pair with 11 *pernyi* chromosomes forming 11 bivalents. If it were the case and if chromosome association occurs independently among different homologous chromosome pairs, the gametes produced in the gonads of F₁ generation progenies will have 30 *roylei* chromosomes in one extreme, 49 *pernyi* chromosomes in another extreme and *roylei-pernyi* chromosome mixture of varying number between 31 and 48. The observation of 32-48 chromosome units in the meiotic metaphase of F₂ progenies by Jolly *et al.* (1979) corroborate this contention. The F₁ gametes when fertilized by *roylei* gametes could give rise to backcross progenies (BC₁) of various chromosome constitution but again would exhibit 30 chromosomal units at their meiotic metaphase, irrespective of the chromosome transmitted from the F₁ parents. The actually observed number of Jolly *et al.* (1979) in the meiotic metaphase of BC₁ individuals varied from 34 to 49 but 44 was an average. This observation indicates that the segregation of paired chromosomes was not so regular as in the normal diploid. On an average 14 chromosomes (possibly of *pernyi*) existed in excess in the gametes produced in BC₁. This shows that separation between *roylei* and *pernyi* chromosomes of the trivalents during meiosis in F₁ often became incomplete and gametes having paired *roylei* and *pernyi* chromosomes were produced.

Simple recombination by crossing over might have been insufficient, or insufficiently permanent, and those individuals which received *roylei-pernyi* chromosome combination degenerated due to sterility caused by erratic separation of trivalents. The individuals which received only *roylei* chromosomes might confront a changing environment or a sudden opening up of a new

environment of domestication to which they were not specially adapted as *A. roylei* is a wild species,



Fig. 1. Surface-spread and silver-stained pachytene nucleus of F41 female of the cross between *Antheraea pernyi* and *A. roylei* showing a complete set of 49 synaptonemal complexes complement.

Fig. 1. Noyau du pachytène étalé et coloré à l'argent d'une femelle de la génération F41 du croisement entre Antheraea pernyi et A. roylei, avec un ensemble complet de 49 complexes synaptonémaux.

Arrow indicates unpaired region in a bivalent, apparently No. 4. Bar = 10 micron.

La flèche indique la région non appariée chez un bivalent, apparemment n 4. Barre = 10 microns

and thus those individuals perished due to selection pressure of domestication. *A. pernyi* is a domesticated species, and thus those individuals which received *pernyi* chromosomes survived and continued to exist. We feel that the present progeny karyotype constitutes 49 bivalents of *pernyi* origin in majority of the individuals albeit gene pool of the new breed will be different from that of the *pernyi* because of genetic recombination between the parental genomes.

To understand the nature and behaviour of this hybrid chromosomes a cross was made between this hybrid (n=49) and *Antheraea roylei* (n=31) and SC analysis in the gonads of F₁ of this cross shows 30 to 35 complexes with some trivalents (in preparation).

ACKNOWLEDGEMENTS

The specimens used in the present study were generously supplied by the Regional Tasar Research Station, Imphal and Government Tasar Farms, Wangbal and Pallel, Manipur. The work was supported by University Grants Commission, New Delhi.

REFERENCES

- BHAGIRATH Th., KUNDU S.C. (1985) Effects of the male contraceptive agent gossypol on meiotic chromosomes of the male rat. *Cytogenet. Cell Genet.*, 39, 228-230.
- JOLLY M.S., NARASIMHANNA M.N., SINHA S.S., SEN S.K. (1969) Interspecific hybridization in *Antheraea*. *Ind. J. Heredity*, 1, 45-48.
- JOLLY M.S., SINHA B.R.R., SINHA S.S. (1973) Interspecific hybridization in *Antheraea* (Lep. Saturniidae) with special reference to *A. roylei* MR. and *A. pernyi* G.M. Paper placed at the international sericultural symposium, synchronizing with the XII international silk congress at Barcelona (Spain).
- JOLLY M.S., SEN S.K., PRASAD G.K., SENGUPTA A.K. (1979) Some cytological observations on interspecific hybrid of *A. pernyi* G.M. and *A. roylei* MR. (Saturniidae). *Cytologia*, 44, 259-263.
- MOSES M.J. (1977) The synaptonemal complex and meiosis. In: *Molecular human cytogenetics* (eds. Sparkes R.S., Comings D., Fox C.F.), ICN-UC-LA symp. VII, Academic Press, New York, p. 101-125.
- SUNG W.K., JAGIELLO G. (1982) A technique for light and electron microscopy of the synaptonemal complex of the mouse oocyte. *Can. J. Genet. Cytol.*, 24, 675-680.
- TAZIMA Y. (1974) A view on chromosome behaviour in an interspecific hybrid: *Antheraea roylei* x *A. pernyi*. *Proc. First Int. Seminar on Non-mulberry Silks*, 51-52.

CARYOTYPE DE L'HYBRIDE DE *ANTHERAEA PERNYI* ET *A. ROYLEI* - ACTUALISATION

Th. BHAGIRATH, S.C. KUNDU et N. IBOTOMBI Department of Life Sciences, Manipur University, Imphal 795 003, Inde.

*Les complexes synaptonémaux (CS) étalés à partir des femelles des générations F₄₁ à F₄₃ provenant du croisement entre *Antheraea roylei* (n=30) et *A. pernyi* (n=49) sont observés au microscope optique. Nous avons observé 49 CS bivalents dans tous les noyaux examinés au stade pachytène. La descendance issue de ce croisement forme une population uniforme d'individus possédant 49 bivalents d'origine *A. pernyi*.*

INTRODUCTION

Jolly *et al.* (1969) ont réussi à produire des hybrides complètement fertiles à partir de deux espèces de ver à soie, le ver à soie chinois *Antheraea pernyi* (n=49) et le ver à soie indien *A. roylei* (n=30). Ils ont observé 30 unités chromosomiques en métaphase I chez la génération F₁ et 32 à 48 chez la génération F₂ à la fois lors des croisements directs et des croisements réciproques (Jolly *et al.*, 1979). Malheureusement l'appariement des chromosomes parentaux chez les générations hybrides primaires et les suivantes et chez les descendants issus du croisement de retour n'a pas été étudié.

L'examen attentif du taux effectif d'élevage indique une faible viabilité chez les F₂ (Tazima, 1974). Les résultats d'élevage enregistrés à la Regional Tasar Research Station d'Imphal et d'autres Fermes d'Etat du Manipur de 1975 à 1981, ont montré la manifestation d'effets adverses sur la viabilité des générations F₂₀-F₄₀. Pour les besoins de l'élevage, il est nécessaire et urgent d'obtenir la stabilisation de la constitution des chromosomes et/ou leur séparation régulière lors de la méiose afin de pouvoir utiliser les générations successives. Afin de comprendre la constitution des chromosomes et leur comportement chez les générations successives de cet hybride, nous avons entrepris l'analyse du stade pachytène au moyen de l'étalement des complexes synaptonémaux (CS). Cette étude peut aussi donner des indications sur l'homologie chromosomique et l'équilibre génétique entre les deux espèces parentales ainsi qu'une actualisation du caryotype de l'hybride.

MATERIEL ET METHODES

Les générations F₄₁, F₄₂ et F₄₃ d'un hybride interspécifique de *Antheraea pernyi* (n=49) et *Antheraea roylei* (n=30), fournies par la Regional Tasar Research Station (Imphal) et des Fermes d'Etat du Manipur (Wangball et Pallel) sont utilisées pour cette étude. Les ovaires des larves du 3ème et du 5ème âge sont disséqués et maintenus dans une solution saline équilibrée de Hank (sans calcium ni magnésium). Les corps gras sont enlevés et les cellules agglutinées des ovarioles sont démêlées avec deux aiguilles en tungstène sous le microscope jusqu'à ce qu'elles soient complètement séparées les unes des autres. Une lame (nettoyée à l'acide-alcool et séchée à l'air) est frottée vigoureusement avec un morceau de soie propre et une bulle (environ 1 cm de diamètre) de 0,2 M de sucrose glacé est confectionnée. A l'aide d'une micropipette, une goutte de la suspension cellulaire est versée sur

la bulle de sucrose à 2 cm de hauteur environ et on laisse les cellules s'étaler pendant 30-60 secondes. Les cellules sont prélevées avec une lame nettoyée comme précédemment. Les deux lames sont fixées, colorées et montées comme il a été décrit ailleurs (Bhagirath et Kundu, 1985). La longueur relative moyenne de chaque CS est donnée selon la méthode de Moses (1977) en pourcentage de la longueur du complément CS total. La longueur absolue de chaque CS, utilisée pour calculer la longueur relative, est reproduite avec un fil fin à partir de la photographie et la longueur du fil est mesurée avec un micromètre Monostate comme l'ont décrit Sung et Jagiello (1982).

RESULTATS

On a pu observer 49 CS bivalents pour tous les noyaux du pachytène examinés (Fig. 1). La petite taille, le grand nombre et le chevauchement fréquent des CS a rendu difficile l'analyse détaillée au microscope optique de la constitution et du comportement d'appariement des chromosomes de cet hybride. De plus les complexes sont souvent visibles en tandem, associés bout-à-bout et sont parfois si imbriqués qu'il est difficile de discerner chaque partie individuelle et de dénombrer les CS. On voit cependant dans les préparations favorables que l'appariement est presque complet et régulier. Cependant dans une cellule rare du pachytène, nous avons observé un CS incomplet avec une synapse aux deux extrémités et un segment non apparié dans la région médiane (Fig. 1, flèche). Le bivalent est probablement constitué par des chromosomes parentaux homologues. Un à deux nucléoles sphériques sont présents dans différentes cellules du début de la prophase. Cette variation du nombre de nucléoles est peut-être due à la composition différente des chromosomes dans différentes cellules. Les organisateurs nucléolaires sont toujours fusionnés et leur structure ne peut être identifiée que dans un petit nombre de cellules. Certains des CS possèdent de un à deux noeuds terminaux ou interstitiels distincts et peuvent donc être identifiés chez différentes cellules. La configuration des bivalents varie d'une ligne presque droite à une boucle. La modification terminale aux deux extrémités de chaque CS est très apparente. Plusieurs structures en forme de chapelet sont présentes dans les CS.

La longueur relative moyenne et l'écart-type calculés pour chaque bivalent à partir de cinq cellules du pachytène sont donnés dans le Tableau I. La variation de la longueur de chaque chromosome dans différents noyaux est faible comme l'indiquent les faibles écarts-type. Ceci suggère que la variation de la longueur totale du complexe synaptonémal entre différents noyaux est répartie plus ou moins régulièrement entre les 49 bivalents d'un noyau particulier.

DISCUSSION

L'observation de 49 bivalents (Fig. 1) chez les génération hybrides étudiées indique que le caryotype de 49 bivalents est le plus courant dans la situation à laquelle l'hybride est soumis. Jolly *et al.* (1973) ont observé seulement 30 unités chromosomiques à la métaphase I de la génération F₁ provenant du croisement et du croisement réciproque. Cette observation a conduit Tazima (1974) à suggérer que sur les 30 chromosomes *roylei*, 19 s'appariaient avec 38 chromosomes *pernyi*, 1 chromosome *roylei* s'appariait avec 2 chromosomes *pernyi* qui sont associés bout-à-bout, pour former 19 trivalents et les 11 chromosomes *roylei* restants s'appariaient avec 11 chromosomes *pernyi* pour former 11 bivalents. Si c'était le cas et si l'association de chromosomes a lieu indépendamment parmi différentes paires de chromosomes homologues, les gamètes produits dans les gonades de la génération F₁ auraient 30 chromosomes *roylei* dans un cas extrême, 49 chromosomes *pernyi* dans l'autre cas extrême, et un mélange de chromosomes *roylei-pernyi* en nombre variable entre 31 et 48. L'observation de 32 à 48 unités chromosomiques lors de la métaphase méiotique des descendants F₂ faite par Jolly *et al.* (1979) confirme cette affirmation. Les gamètes F₁ fertilisés par des gamètes *roylei* peuvent produire des descendants de croisement de retour (BC₁) ayant diverses constitutions chromosomiques mais montreraient toujours 30 unités chromosomiques à la métaphase méiotique, sans tenir compte des chromosomes transmis par les parents F₁. Le nombre de chromosomes observés par Jolly *et al.* (1979) chez les individus BC₁ à la métaphase méiotique varie de 34 à 49, avec une moyenne de 44. Cette observation montre que la ségrégation des chromosomes appariés n'est pas aussi régulière que chez un diploïde normal. En moyenne 14 chromosomes (probablement de *pernyi*) existent en surplus dans les gamètes produits chez BC₁. Ceci montre que la séparation au cours de la

méiose entre les chromosomes *roylei* et *pernyi* formant les trivalents chez les F₁ est souvent incomplète et que des gamètes ayant des chromosomes appariés de *roylei* et *pernyi* sont produits.

La simple recombinaison par crossing over n'a peut-être pas été suffisante, ou pas assez permanente, et les individus qui ont reçu la combinaison chromosomique *roylei-pernyi* ont dégénéré à cause de la stérilité provoquée par la séparation irrégulière des trivalents. Les individus qui ont reçu seulement des chromosomes *roylei* seraient confrontés à un environnement modifié ou à l'apparition soudaine de l'environnement de la domestication, à laquelle ils n'étaient pas spécialement adaptés car *A. roylei* est une espèce sauvage, et ces individus auraient donc péri à cause de la pression sélective exercée par la domestication. *A. pernyi* est une espèce domestique et les individus qui ont reçu les chromosomes *pernyi* ont donc survécu. Nous pensons que le caryotype des descendants actuels est constitué par 49 bivalents d'origine *pernyi* pour la majeure partie des individus quoique le pool génétique de la nouvelle lignée soit différent de celui de *pernyi* à cause de la recombinaison génétique entre les génomes des parents.

Afin de comprendre la nature et le comportement de ces chromosomes hybrides, un croisement a été fait entre cet hybride (n=49) et *Antheraea roylei* (n=31) et l'analyse des complexes synaptonémaux dans les gonades des F₁ de ce croisement montre 30 à 35 complexes avec quelques trivalents (en préparation).

PACHYTENE SYNAPTONEMAL COMPLEX ANALYSIS IN AN INDIAN SILKWORM, *PHILOSAMIA RICINI*

Th. BHAGIRATH, S.C. KUNDU and N. IBOTOMBI Department of life Sciences, Manipur University, Imphal 795003, India.

Pachytene synaptonemal complex complement of an Indian eri silkworm Philosamia ricini has been studied using surface spreading technique and light microscope. Absence of recognizable entromere and gradual decrease in length from chromosome N 1 to chromosome N 14 make a precise characterization of all the 14 individual synaptonemal complexes impossible. Bivalent N 11 possesses a pair of nucleoli. Bivalents N 5 and 6 possess terminal knobs or accessory structure. The Z and W chromosomes have exactly the same length forming a complete synaptonemal complex from telomere to telomere and do not possess any characteristic feature of note.

INTRODUCTION

Surface spreading technique of Counce and Meyer (1973) for synaptonemal complexes (SCs) has been extensively applied to the pachytene karyotyping of various plants and animal species (see introduction, Gillies and Cowan, 1985). Successful application of this technique to Lepidopteran meiotic chromosomes (personal observations) allows to study the meiotic chromosome complement of this taxonomic group with light microscope at a higher level of resolution than hitherto possible.

In the eri silkworm *Philosamia ricini*, preliminary cytogenetical studies have been done earlier (see introduction Narang and Gupta, 1979). In this paper we present the *P. ricini* synaptonemal complex karyotype and its comparison with the somatic karyotype.

MATERIALS AND METHODS

The ovaries from the third to fifth instar larvae of Indian eri silkworm, *P. ricini* were dissected out and kept in Hank's balanced salt solution (calcium and magnesium free). The fat body was cleaned off and the agglutinated cells of the ovarioles were teased with two tungsten needles under dissecting microscope until the cells were free from one another. A slide (acid - alcohol cleaned and air-dried) was vigorously rubbed with clean silk and a bubble (about 1 cm diameter) of chilled 0.2 M sucrose was made. Using a micropipette, a drop of the cell suspension was dropped over the sucrose bubble from a height of about 2 cm and the cells were allowed to spread for 30-60 seconds. The cells were picked up with slide cleaned as mentioned above. After air drying both the slides were fixed, stained and mounted as described elsewhere (Bhagirath and Kundu, 1985).

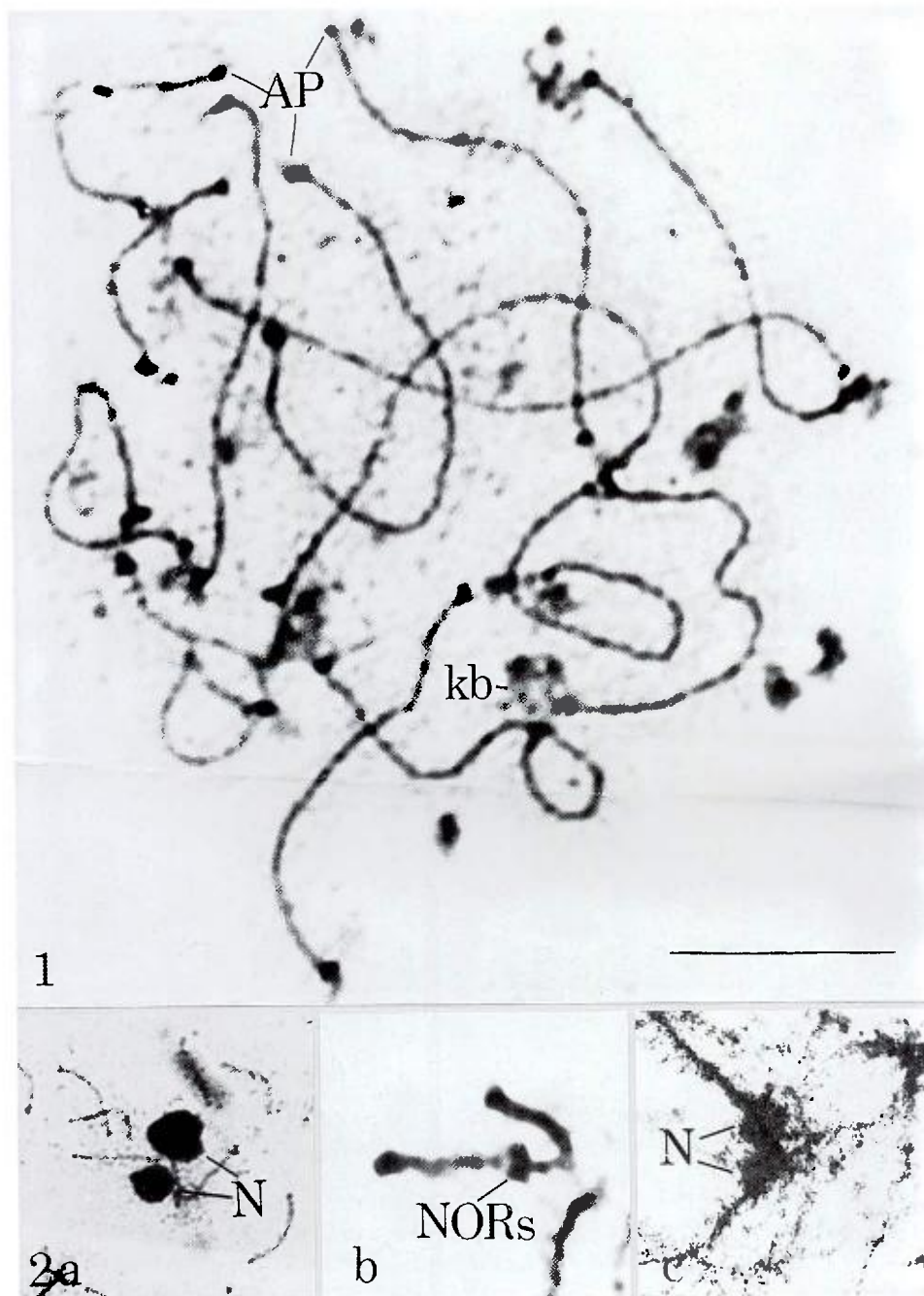
The mean relative lengths of individual SCs are given, according to Moses (1977) as the percentage of total SC complement length. The absolute length of each SC, used for relative length calculation, was reproduced with a fine wire from the photograph and length of the wire was measured with a Monostate micrometer as described by Sung and Jagiello (1982).

Fig. 1. A complete set of surface - spread and silver - stained pachytene synaptonemal complex complement of female *Philosamia ricini*. Note the attachment plaques (AP) and terminal knobs (Kb).

Fig. 1. Complexe synaptonemal complet au stade pachytène après étalement de surface et coloration à l'argent préparé à partir d'une femelle de *Philosamia ricini*.

Fig. 2. Nucleolar chromosomes in females *P. ricini*. a. The two nucleoli (N) organized by the two homologous chromosomes are situated on either side of the bivalent. b. The two nucleolus organizers (NORs) are seen as a pair of dots. c. A pair of nucleolar chromosomes with their nucleoli (N) at Zygotene. Bar = 10 micron.

Fig. 2. Les chromosomes nucléolaires chez la femelle *P. ricini*. a. Les deux nucléoles (N) organisés par les deux chromosomes homologues sont situés de chaque côté du bivalent. b. Les deux organisateurs nucléolaires (NORs) apparaissent comme une paire de points. c. Une paire de chromosomes nucléolaires avec leur nucléoles (N) au stade zygotène. Bar = 10 microns



Chromosome/ <i>Chromosome</i>	% Length/ <i>Longueur (%)</i>	Standard Deviation/ <i>Ecart-type</i>
1	9.9	0.20
2	9.5	0.12
3	9.2	0.13
4	7.7	0.15
5	7.4	0.13
6	7.2	0.12
7	7.1	0.16
8	7.0	0.16
9	6.9	0.19
10	6.8	0.20
11	6.6	0.20
12	6.0	0.19
13	4.6	0.19
14	3.3	0.18

Table I. Mean relative lengths of synaptonemal complexes calculated from 10 pachytene nuclei of *Philosamia ricini* females, given as percentage of the total complement length.

Tableau I. Longueurs relatives des complexes synaptonémaux calculées sur 10 noyaux du stade pachytène du Philosamia ricini femelle, données en pourcentage de la longueur totale.

RESULTS AND DISCUSSION

Pachytene stage is characterized by the completion of SC formation in all the bivalents. Of all the nuclei examined, 31 nuclei showed intact and well spread 14 SCs. In other nuclei the SCs were so stretched or overlapped that identification of individual SCs was difficult or impossible. The full complement of 14 SCs for this species agrees with its diploid chromosome number $2n=28$ reported by earlier workers from somatic chromosome studies (e.g., Kawaguchi and Yosida, 1953). All the 31 nuclei were photographed and of these, 10 best nuclei were used for measurements. Table I shows the relative lengths of individual SCs of 10 pachytene cells. Standard deviations for all the complements are small. It shows that the variation in lengths of each chromosome in different nuclei is small. This suggests that the variation in total SC length between different nuclei is distributed more or less evenly among all 14 bivalents of a particular nucleus. Karyotyping was strictly on the basis of length because of the holocentric nature. The gradual decrease in size of the chromosomes from N1 to N 14 makes a more precise characterization of individual chromosome impossible, and it is quite likely that the ranking numbers assigned to the medium sized chromosome may represent different chromosomes in different cells.

There is a close agreement between the mitotic karyotype (Narang and Gupta, 1979) and the SC karyotype (Table I). The close agreement between the SC Karyotype and the somatic karyotype has been reported for Chinese hamster (Moses *et al*, 1977), humans (Solari, 1980), maize (Gillies, 1981) and cat (Gillies and Cowan, 1985). According to Gillies and Cowan (1985), some differences that exist between the two karyotypes may be due to variation in the rate and extent of contraction during prophase I of meiosis.

The telomeric ends of all the SCs (attachment plaques) are enlarged and densely stained. The SCs contain throughout their length a large number of beads which are apparently a structural differentiation of SCs relating to the chromomere pattern (Bhagirath and Kundu, 1986).

At pachytene the nucleolus is normally absent. In occasional nuclei, the two nuclei, each organized by each homologue of the nucleolar bivalent, were present on either side of the SC (fig. 2a). The two NORs were rarely seen as a pair of dots attached to the SC 11 somewhere in the middle (fig. 2b). At Zygotene, the 2 nucleolar chromosomes could be easily identified as they were frequently associated with their nucleoli (Fig. 2c). The Z and W chromosomes do not possess any distinguishing feature of note and have exactly the same length forming a complete SC from telomere to telomere and thus they cannot be distinguished from the autosomes. Narang and Gupta (1979) reported sexual dimorphism in *Philosamia ricini* with respect to nucleolar bivalent, there being a pair of these in the male and a single in the female. Thus they suggested that the bivalent showing dimorphism represents the sex chromosome pair, the nucleolar chromosome representing the Z and the non nucleolar one the W. Our observation of a pair of nucleolar chromosomes (fig. 2a.c.) is contradictory to their findings and interpretations. To our knowledge attempts to identify the sex chromosomes cytologically in Lepidoptera has not been successful. Chromosomes 5 and 6 appear to possess terminal knobs or accessory structure (fig. 1). These structures were always indistinct at any prophase stage and were observed in a few cells only and thus an attempt to identify these chromosomes by the presence of such a structure was not successful.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Mr. Y. Rajen Singh of Regional Tasar Research Station Imphal, for providing the eri silkworms for the present study. This work was supported by the Council of Scientific and Industrial Research, New Dehli.

REFERENCES

BHAGIRATH Th, KUNDU S.C. (1985), Effects of the male contraceptive agent gossypol on meiotic chromosomes of the male rat, *Cytogenet. Cell Genet.* 39, 228-230.

BHAGIRAH Th and KUNDU S.C. (1985) Sequential analysis of synaptonemal complexes in the repopulating spermatocytes of *Rattus norvegicus* after restricting the germ cell population to spermatogonia by gossypol treatment, *Eur. J. Cell Biol.*, 40, 226-232.

COUNCE S.J. and MEYER G.F. (1973) Differentiation of the synaptonemal complex and the kinetochore in *Locusta* spermatocytes studied by whole mount electron microscopy, *Chromosoma*, 44, 231-253.

GILLIES C.B. (1981) Electron microscopy of spread maize pachytene synaptonemal complexes, *Chromosoma*, 83, 575-591.

GILLIES C.B. and COWAN S.K. (1985), The pachytene synaptonemal complex complement of the cat, *Genetica*, 67, 99-107.

MOSES M.J. (1977), The Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*) I. Morphology of the autosomal complement in spread preparations, *Chromosoma*, 60, 99-125.

NARANG R.C., GUPTA M.L. (1979), Chromosomal studies in eri silkworm *Philosamia ricini* Hutt (Lepidoptera: Saturniidae), *Entomon.*, 4, 217-221

SOLARI A.J. (1980), Synaptonemal complexes and associated structures in microspread human spermatocytes, *Chromosoma*, 81, 315-317.

SUNG W.K. JAGIELLO G. (1982), A technique for light and electron microscopy of the synaptonemal complex of the mouse oocyte, *Can. J. Genet. Cytol.*, 24, 675-680.

ANALYSE DU COMPLEXE SYNAPTONEMAL AU STADE PACHYTENE CHEZ LE VER A SOIE *PHILOSAMIA RICINI*

Th. BHAGIRAH, S.C. KUNDU, et N. IBOTOMI Department of Life Sciences, Manipur University, Imphal - 795003, Inde.

*Le complexe synaptonémal (CS) du stade pachytène du ver à soie indien eri *Philosamia ricini* a été étudié en microscopie optique après étalement de surface. L'absence de centromères reconnaissables et la décroissance progressive de la longueur des chromosomes (du chromosome N 1 au chromosome N 14) ne permettent pas une caractérisation précise des 14 complexes synaptonémaux individuels possibles. Le bivalent N 11 possède une paire de nucléoles. Les bivalents N 5 et 6 possèdent des noeuds terminaux ou structure annexe. Les chromosomes Z et W ont exactement la même longueur, formant un complexe synaptonémal complet de télomère à télomère et ne possèdent aucun trait caractéristique notable.*

INTRODUCTION

La technique d'étalement en surface de Counce et Meyer (1973) pour l'étude des complexes synaptonémaux (SCs) a été largement utilisée pour établir le caryotype du pachytène de différentes plantes et espèces animales (cf. introduction Gillies and Cavan, 1985). L'emploi répété de cette technique sur les chromosomes méiotiques des Lépidoptères (observations personnelles) permet d'étudier le complément chromosomique méiotique de ce groupe taxonomique au microscope optique à un plus haut niveau de résolution qu'il n'était possible jusqu'à présent.

Des études cytogénétiques préliminaires ont déjà été faites chez le ver à soie eri *Philosamia ricini* (cf. introduction Narang et Gupta, 1979). Dans cette étude, nous présentons le caryotype du complexe synaptonémal chez *P. ricini* et sa comparaison avec le caryotype somatique.

MATERIELS ET METHODES

Les ovaires des larves du 3 au 5 âge des vers à soie indiens eri *P. ricini* sont disséqués et conservés dans une solution saline équilibrée de Hawk (sans calcium ni magnésium). Le corps gras est prélevé et les cellules agglutinées des ovarioles sont triturées à l'aide de deux aiguilles de tungsten sous microscope, jusqu'à ce que les cellules se séparent. Une lame (nettoyée à l'acide et alcool, séchée à l'air) est vigoureusement frottée avec de la soie propre et une goutte (environ 1 cm de diamètre) de sucrose 0,2M glacé est formée sur la lame. A l'aide d'une micropipette, une goutte de suspension de

cellules est envoyée sur la goutte de sucrose à partir d'une hauteur de 2 cm environ ; les cellules s'étalent ensuite pendant 30 à 60 secondes. Les cellules sont déposées sur les plaques propres mentionnées plus haut. Après avoir été séchées à l'air, les plaques sont fixées et montées comme le décrivent Bhagirath et Kundu, (1985). Les longueurs moyennes relatives des CS sont données, suivant Moses (1977), comme le pourcentage de la longueur totale du complément CS. La longueur absolue de chaque CS, utilisée pour le calcul de la longueur relative a été mesurée à l'aide d'un fil métallique à partir de la photographie, la longueur étant ensuite déterminée à l'aide d'un micromètre Monostate, décrit par Sung et Jagiello (1982).

RESULTATS ET DISCUSSION

Le stade pachytène est caractérisé par la formation complète de CS pour tous les bivalents. Parmi tous les noyaux observés, 31 étaient intacts et 14 CSs bien étalés. Dans les autres noyaux, les CS sont tellement dispersés ou superposés, que l'identification individuelle des CSs est difficile ou impossible. Le complément complet de 14 CSs concorde, pour cette espèce, avec le nombre diploïde de chromosomes $2n=28$, déterminé antérieurement par les études d'autres auteurs effectuées sur des chromosomes somatiques (Kamaguchi et Yosida, 1953). Les 31 noyaux ont été photographiés et les 10 meilleurs d'entre eux ont été utilisés pour les mesures. Le tableau I montre les longueurs relatives des CSs de 10 cellules pachytène. Les écart-types, pour tous ces compléments sont peu importants. Cela suggère que la variation de la longueur totale du CS entre différents noyaux est distribuée plus ou moins également entre les 14 bivalents d'un noyau particulier. Le caryotype a été établi strictement sur la base de la longueur, à cause de sa nature holocentrique. La diminution progressive de la taille des chromosomes du N 1 au N 14 rend impossible une caractérisation plus précise des chromosomes individuels, et il est probable que les chromosomes classés dans les tailles moyennes peuvent représenter des chromosomes différents selon les cellules.

Il y a concordance étroite entre le caryotype mitotique (Narang et Gupta, 1979) et le caryotype du Cs (tableau I). La concordance étroite entre le caryotype du CS et le caryotype somatique a été observé chez le hamster (Moses *et al.*, 1977), les humains (Solari, 1980) le mais, le chat (Gillies et Cowan, 1985). D'après Gillies et Cowan (1985), les quelques différences qui existent entre les deux caryotypes peuvent être dues aux variations de la vitesse et de l'étendue de la contraction pendant la prophase I de la méiose.

Les terminaisons télomériques de tous les CS (plaques d'attachement) sont élargies et fortement colorées. Les Cs contiennent sur toute leur longueur un grand nombre de gouttes qui sont apparemment une différenciation structurelle des CS, en relation avec le profil chromomérique (Bhagirath et Kundu, 1986). Au stade pachytène, le nucléole est normalement absent. Dans certains noyaux, les deux nucléoles, chacun organisé par chaque homologue du bivalent nucléolaire, sont présents de chaque côté du CS (Fig 2a). On voit rarement les deux organisateurs nucléolaires comme étant une paire de points rattachés au CS 11, quelque part au milieu (Fig. 2b). Au stade Zygotène, les 2 chromosomes nucléolaires peuvent être facilement identifiés, puisqu'ils sont fréquemment associés à leurs nucléoles (Fig. 2c). Les chromosomes Z et W ne possèdent pas de traits distinctifs et ont exactement la même longueur et forment un CS complet de télomère à télomère et ne peuvent pas se distinguer des autosomes. Narang et Gupta (1979) ont noté un dimorphisme sexuel chez *Philosamia ricini* par rapport au bivalent nucléolaire, puisqu'il existe une paire de ceux-ci chez le mâle et un seul chez la femelle. Ils suggèrent ainsi que le bivalent montrant un dimorphisme, représente la paire de chromosomes sexuels, le chromosome nucléolaire représentant le Z et le non nucléolaire le W. Notre observation d'une paire de chromosomes nucléolaires (Fig. 2 A.C.) contredit leurs résultats et interprétations. A notre connaissance, tout essai d'identification cytologique du chromosome sexuel chez les Lépidoptères est impossible. Les chromosomes 5 et 6 possèdent des noeuds terminaux ou une structure accessoire (Fig. 1). Ces structures sont toujours indistinctes à n'importe quel stade de la prophase et ont été observées seulement dans quelques cellules ; ainsi il est impossible d'identifier ces chromosomes à partir de la présence d'une telle structure.

STUDIES ON THE GENETIC ARCHITECTURE AND GENE ACTIONS INVOLVING YIELD AND YIELD COMPONENTS IN DIALLEL POPULATIONS OF TROPICAL TASAR SILKWORM *ANTHERAEA MYLITTA D.*

A.A. SIDDIQUI, A.K. SENGUPTA, AJIT KUMAR, D.P.D. MOHAPATRA and K. SENGUPTA. Breeding and Genetics Laboratory, Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi 5, India.

The component analysis of yield and yield traits of A. mylitta D. indicated that the additive component (D) and the two measures of non-additive (H_1 & H_2) genetic variances were significant for all the characters. The non-additive components (H_1) was higher than (D) for all the characters suggesting additive variance to be less important than dominance variance. The degree of dominance (H_1/D) was higher than 1 suggesting over-dominance. The ratio ($H_2 / 4H_1$) indicated asymmetrical distribution of positive and negative alleles. The proportion of dominant and recessive genes among parents ($4DH_1 + F/4DH_1.F$) indicated an excess of dominant genes for majority of the characters. Heritability both in broad and narrow sense have been computed. Low to moderate estimate of heritability (narrow sense) with low anticipated genetic advance was indicative of non-additive gene action and environmental variations. On these basis, the selection scheme has been discussed.

INTRODUCTION

A quantitative genetic study of the inheritance of silk yield and its component characters was carried out with 6 lines of tropical tasar silkworm *A. mylitta D.* and their F_1 s utilising the diallel cross analysis technique of Jinks (1954). The paper presents an attempt to find out the nature of gene actions involved in the expression of silk yield and its components.

MATERIAL AND METHODS

Non reciprocal crosses in all possible combinations were made among six inbred lines of *A. mylitta D.* viz. Daba, RF₁, RF₄, RF₃₅, R.S. and L₈ during the year 1984-85 at Central Tasar Research and Training Institute, Basic Seed multiplication and Training Centre, Pali, Bilaspur (M.P.). The lines were obtained from Germ Plasm Bank maintained at Central Tasar Research and Training Institute, Field Laboratory, Nagri, Ranchi. The distinguishing features of the inbreds are presented in Table I.

Six parents and fifteen hybrids were reared with three replications in randomized block design layout. Reciprocal crosses were not made in the present investigation because Jolly *et al* (1969, 1972) and Bardaiyar *et al* (1975) reported non-significant reciprocal differences in *A. mylitta D.* Data were recorded for absolute silk yield (average single shell weight multiplied by the total number of cocoons harvested) for each replication the yield contributing factors viz. fecundity, effective rate of rearing (E.R.R. %, cocoon weight, and shell weight. Estimates of V_r , W_r values, components of variation and

genetic ratios were made according to Jinks (Op. Cit). Narrow and broad sense heritabilities were computed following the method of Mather and Jinks (1971).

RESULTS

Range, mean, C.D. for the studied characters for parents and F_1 s are presented in Table II. Significant F values for means of the characters in the analysis of variance table showed that the parents differed significantly among themselves.

The estimated of D, F, H_1 and H_2 have been given in Table III. Highly significant values of both D and H_1 for all the characters indicate that both additive and dominant variance are important in the material taken for this study. However, a greater magnitude of H_1 estimate in case of all the characters studied indicate greater importance of non-additive variance in the expression of these characters. Average degree of dominance was in the range of over-dominance for all characters as H_1 was much more than D.

Components H_1 and H_2 were significant for all the characters except in cocoon weight. The components F have been found to be highly significant for all the characters.

The estimates of degree of dominance (H_1/D) were higher than 1 for all the characters, suggesting over-dominance.

The estimates of the ratio $H_2/4H_1$ were not close to 0.25 for all the characters except cocoon weight, suggesting asymmetrical distribution of positive and negative alleles among the parents except for cocoon weight where the distribution of alleles seems to be symmetrical.

To estimate the proportion of dominant and recessive genes among the parents, the ratio $4DH_1 + F/4-DH_1-F$ was computed (Table III). For most of the characters, the estimates were higher than unity, suggesting an excess of dominant genes. However, the estimates were close to unity for cocoon weight indicating an equal proportion of dominant and recessive genes among the parents for this trait.

Furthermore, the correlation between order of dominance, on the basis of $WR + Vr$ values and the parental performance (Yr) (Table IV) have been found to be positive and significantly close to unity for ERR%, cocoon weight and absolute silk yield indicating that these characters are controlled by additive genes and insignificant values in shell weight and fecundity was indicative of dominant genetic control.

Both broad and narrow sense heritabilities were computed (Table IV) following the method of Mather and Jinks (Op. cit.). Broad sense heritability ranged from 57.62% to 99.63% giving highest for absolute silk yield followed by fecundity, cocoon weight and shell weight in order of merit while lowest was observed for effective rate of rearing. Earlier, Sen *et al.* (1976) and Siddiqui *et al.* (1983, 1985) had also reported high heritabilities for the cocoon character.

The estimates of narrow sense heritability ranged from 10.29% to 65.99%. Highest heritability was recorded in absolute silk yield and lowest in shell weight.

Narrow sense heritability value when employed to calculate the expected genetic advance (in percentage of mean) at 5% level it was observed that the anticipated gain was to the tune of 0.30%, 0.75%, 3.54, 15.37% and 1.08% for weight and absolute silk yield respectively.

DISCUSSION

The selection of valuable material which satisfy the assumption of the theoretical models is extremely difficult. The failure of some of these assumptions in any material is likely to give biased results which must be evaluated to draw meaningful conclusions about a selected population.

In the present material both additive and non additive type of gene actions were detected for the yield and yield component characters. Dominance component, H_1 was higher than D for all the characters indicating the degree of dominance to be in the range of over-dominance. Moreover, it indicated that additive variance was less important than dominance variance. Simultaneously non-additive components H_1 and H_2 were highly significant for all the characters. According to Hayman (1954), H_2 should be equal to or less than H_1 , the present study showed similar results.

Parent N/ <i>Parent N</i>	Inbred/ <i>Souches</i>	Main features/ <i>Caractéristiques principales</i>
1	Daba	Green larvae, grey cocoons bivoltine in nature; higher denier, with lower shell weight, poor yield. / <i>Larves vertes, cocons bivoltins gris, denier plus élevé, avec un poids de coque soyeuse plus bas, rendement pauvre.</i>
2	RF ₁	Isolated from a cross between body colour mutant and Daba eco-race high yielding, bivoltine with high shell weight / <i>Issue d'un croisement entre un mutant et l'éco-race Daba ; haut rendement, bivoltin avec un fort poids de la coque soyeuse.</i>
3	RF ₄	Moderate yielder, with maximum shell weight / <i>Producteur modéré avec un poids de coque soyeuse maximum.</i>
4	RF ₃₅	Inbred line screebed out from a cross between two eco-races; low yielder with low shell weight, lower denier / <i>Lignée issue du croisement de deux éco-races à faible rendement, avec un poids de la coque soyeuse peu élevé, faible denier.</i>
5	R.S.	Inbred line of a population raised through recurrent selection, moderate yielder with low shell weight / <i>Lignée d'une population élevée en sélection récurrente, producteur moyen avec un faible poids de coque soyeuse.</i>
6	L ₈	Derived from a Sal based eco-race, high yielder with high shell weight, bivoltine in nature / <i>Dérivé d'une éco-race Sal; haut rendement avec un fort poids de la coque soyeuse, variété bi-voltine.</i>

Table I. Parental inbreds and their main features /

Tableau I. Les races parentales et leurs caractéristiques principales

S1 N	Parents/ F1s	Absolute silk yield (g)	Fecundity (Nb)	E.R.R.%	Cocoon weight (g)	Shell weight (g)
<i>S1 N</i>	<i>Parents/ F1s</i>	<i>Rendement en soie absolu (g)</i>	<i>Fécondité (Nb're)</i>	<i>E.R.R.%</i>	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Poids de la coque soyeuse (g)</i>
1	Daba	91.88	239.33	34.88	9.32	1.27
2	RF ₁	149.10	228.00	39.49	11.23	1.68
3	RF ₄	119.70	236.33	33.73	11.65	1.75
4	RF ₃₅	101.00	253.66	34.72	9.93	1.22
5	R.S	110.23	248.83	35.87	9.90	1.23
6	L8	121.83	261.66	36.52	11.63	1.52
7	1 x 2	154.17	250.33	44.65	11.80	1.53
8	x 3	164.30	255.33	44.65	10.50	1.60
9	x 4	119.93	278.33	38.33	11.48	1.31
10	x 5	113.68	360.67	40.25	11.56	1.33
11	x 6	165.82	266.66	36.43	9.90	1.28
12	2 x 3	160.92	225.00	39.18	11.16	1.45
13	x 4	109.92	228.33	34.94	9.23	1.23
14	x 5	100.58	192.66	43.20	10.50	1.31
15	x 6	151.70	230.66	39.41	11.93	1.58
16	3 x 4	119.53	255.33	35.51	10.90	1.25
17	x 5	108.50	243.33	33.18	10.70	1.21
18	x 6	115.60	218.00	29.95	10.46	1.26
19	4 x 5	90.85	219.00	43.71	10.13	0.96
20	x 6	112.02	210.00	42.07	11.46	1.25
21	5 x 6	99.4	188.66	40.87	10.60	1.25
	Range/ <i>Amplitude</i>	90.58 - 165.82	188.66 - 360.67	29.95 - 44.65	9.23 - 11.93	0.96 - 1.75
	Mean/ <i>Moyenne</i>	122.88	242.38	38.19	10.76	1.35
	C.D. at 5%/ <i>C.D. au seuil de 5 %</i>	4.78	24.81	9.93	1.50	0.54

Table II. Mean values of parents and F1s for five characters.

Tableau II. Valeurs moyennes des parents et des générations F1 pour cinq caractères.

	Absolute silk yield/ <i>Rendement de soie absolu</i>	Fecundity/ <i>Fécondité</i>	E.R.R. %	Cocoon yield/ <i>Poids du cocon</i>	Shell weight/ <i>Poids de la coque soyeuse</i>
D	568.27**	80.33**	5.29*	0.77**	0.023*
F	2349.73**	724.31**	25.74*	0.34*	0.61**
H ₁	3780.97**	5883.16**	68.34**	1.66**	0.83**
H ₂	1188.62**	4037.81**	41.08**	1.76**	0.22**
E	2.63**	70.26**	10.06**	0.26**	0.033**
H ₁ D	2.58	8.56	3.59	1.47	5.99
H ₂ /4H ₁	0.08	0.17	0.15	0.26	0.07
4DH ₁ + F/ 4DH ₁ - F	9.08	3.23	5.24	1.36	2.66

* Significant at 0.05/
Significatif à 5%

** Significant at 0.01/
Significatif à 1%

Table III. Estimates of genetic parameters and ratios for silk yield in a 6 x 6 diallel set of *A. mylitta* D.

Tableau III. Estimation des paramètres génétiques et des taux de rendement dans un lot de A. mylitta D.

Components/ Composantes	Heritability %/ % d'hérabilité		Genetic advance in % of mean/	Coefficient of correlation (r)
	Broad sense/ Sens large	Narrow sense/ Sens étroit	Avance génétique en %	Coefficient de corrélación (r)
Absolute silk yield/ <i>Rendement de soie absolu</i>	99.63	65.99	1.08	+0.9476**
Fecundity/ <i>Fécondité</i>	95.82	35.75	0.30	+0.0772
E.E.R. %	57.62	14.35	0.75	+0.9978**
Cocoon weight/ <i>Poids du cocon</i>	70.18	19.09	3.54	+0.8584**
Shell weight/ <i>Poids de la coque</i>	66.70	10.29	15.37	-0.3486

* Significant at 0.05
Significatif à 0.05

** Significant at 0.01
Significatif à 0.01

Table IV. Estimates of heritability, genetic advance and correlation coefficient between parental performance (Yr) of absolute silk yield and its components.

Tableau IV. Estimations de l'hérabilité, de l'avance génétique et du coefficient de corrélation entre $W_r + V_r$ et les performances (Yr) de rendement absolu en soie et de ses composants.

The component F was positive and highly significant in all the characters suggesting an excess of positive genes governing the characters.

In F_1 , the ratio $(H_1/D)^{1/2}$ was more than one for all the traits indicating that non-additive components were higher as compared to the additive components.

The various analysis revealed that a majority of the characters were controlled by overdominance. The over dominance effects thus revealed may be to a certain extent be just an apparent case inflated upward. Hayman (Op. cit.) postulated that a particular combination of positive and negative genes or complementary type of gene action of simple correlation between the genes might drastically change the degree of dominance. Partial dominance may be converted to an apparent overdominance. The effect of such disturbance is maximum in F_1 s because of linkage disequilibrium.

Mather and Jinks (op. cit.) stated that in Jcs $u=v=0.5$ at each locus, i.e. symmetry between dominant and recessive alleles the ratio $(H_1/D)^{1/2}$ will not be true measure of degree of dominance. Further Hayman (Op. cit.) proposed the method of estimating whether $u=v=0.5$ or not. If $u=v=0.5$ then the ratio $H_2/4H_1$ is equal to 0.25. In the present study, this ratio was not 0.25 in most of the cases, indicating asymmetrical distribution of dominant and recessive genes in the population which might be one of the reasons for over estimation of degree of dominance in the component analysis.

The major function of heritability estimates is to provide information on the transmission of characters from the parents to the progeny. Such estimates facilitate evaluation of heritability and environmental effects in phenotypic variation and thus help in selection. All the characters in the present study exhibited low to moderate estimates of heritability (narrow sense) with very low anticipated genetic advance and such situations indicate that non-additive gene action and environmental variations contributed a major part in the expression of the characters. Greater advances are expected if the selection is cyclically accompanied with inter mating of selects. Further, genotype X environmental interaction must be removed from the phenotypic variance by testing the material over several environments for obtaining more precise estimate of heritability.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to DR. S.N. Chatterjee, Dy. Director (Research & Coordination), Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi, for supplying the lines.

REFERENCES

- BARDAIYAR V.N., JOLLY M.S., BENCHAMIN K.V. and B.R.R. Pd. SINHA (1976) Heterosis in relation to single, three way and double crosses in *Antheraea mylitta* D., Ind. J. Seri., 15, 3-8.
- HAYMAN B.I. (1954) The theory and analysis of diallel crosses. Genetics, 39, 789-809.
- JINKS J.L. (1954) The analysis of continuous variation in a diallel cross of *nicotiana-rustica* varieties. Genetics, 39, 767-788.
- JOLLY M.S., BARDAIYAR V.N., NARASIMHANNA, M.M., and RAZDAN J.L. (1969) Diallel cross analysis of quantitative characters of four races of Indian tasar silkworm *A. mylitta* D., Ind. J. Seri. 8(1), 25-33.
- JOLLY M.S. BARDAIYAR V.N., SINHA V.N. and RAZDAN J.L. (1972) Performance of the four races of *A. mylitta* D. in relation to diallel crossing system, Ind. J. Seri., 11, 58-62.
- MATHER J. & JINKS, J.L., (1971) Biometrical Genetics, 2nd edition Chapman and Hall Ltd., London Ec. 4.
- SEN S.K., SENGUPTA S.K., JOLLY M.N. (1976) Studies on genetic variability, correlation and path coefficient analysis, discriminate function, in *A. mylitta* D., Ind. J. Seri., 15, 9-14.
- SIDDIQUI A.A., DEBNATH A.K. and SENGUPTA K. (1983) A study of genetic variability of some economic traits in *A. mylitta* D., Proc. National Seminar on Silk Research & Development, 40.
- SIDDIQUI A.A., DEBNATH A.K. & SENGUPTA K. (1985) Variability and correlation studies on shell weight and their contributing traits in *A. mylitta* D., Sericologia, 25(1), 45-50.

ETUDE SUR L'ARCHITECTURE GENETIQUE ET LES ACTIONS DES GENES IMPLIQUANT LE RENDEMENT ET LES COMPOSANTS DU RENDEMENT CHEZ LES POPULATIONS DIALLELIQUES DU VER A SOIE TROPICAL TASAR ANTHERAEA MYLITTA D.

A.A. SIDDIQUI, A.K. SENGUPTA, AJIT KUMAR, D.P.D. MOHAPATRA and K.
SENGUPTA. Breeding and Genetics Laboratory, Central Tasar Research and Training
Institute, Ranchi 5, Inde.

L'analyse des composants du rendement et de ses caractéristiques chez A. mylitta D. indiquent que le composant additif (D) et les deux mesures de variances génétiques non additives (H_1 et H_2) sont significativement différentes pour tous les caractères. Le composant non additif (H_1) est plus élevé que (D) pour tous les caractères, ce qui laisse supposer que la variance additive est moins importante que la variance de dominance. Le degré de dominance (H_1/D) est plus élevé que 1, ce qui suggère une surdominance. La valeur ($H_2/4H_1$) indique une distribution asymétrique des allèles positifs et négatifs. La proportion des gènes dominants et récessifs chez les parents ($4DH_1+F/4DH_1-F$) indique un excès de gènes dominants pour une majorité des caractères. L'héritabilité dans son sens large et étroit a été analysée. Une héritabilité faible à modérée (sens étroit) avec une faible avance génétique anticipée indique une action non-additive des gènes et des variations de l'environnement. Sur ces bases, nous discutons d'un schéma de sélection.

INTRODUCTION

Une étude génétique quantitative de l'hérédité du rendement en soie et des caractères qui le composent a été conduite sur 6 lignées du ver à soie tropical tasar A. mylitta D. et leurs descendants, en utilisant la technique de l'analyse du croisement diallele de Jinks et Hayman (1954). L'article présente une tentative pour découvrir la nature de l'action des gènes impliqués dans l'expression du rendement en soie et de ses composants.

MATERIEL ET METHODES

Les croisements non réciproques dans toutes les combinaisons possibles ont été effectués avec six lignées consanguines d'A. mylitta D., à savoir Daba, RF1, RF4, RF35, RS et L8 pendant l'année 1984-1985 au Central Tasar Research & Training Institute, Basic Seed Multiplication and Training Centre, Pali, Pilaspur (M.P.) Les lignées proviennent d'une banque de souches, installée au Central Tasar Research & Training Institute, Field Laboratory, Nagri, Ranchi. Les traits distinctifs de ces lignées consanguines sont présentés dans le tableau I.

Six parents et 15 hybrides ont été élevés en 3 replicats dans un bâtiment pris au hasard. Les croisements réciproques n'ont pas été réalisés lors de cette étude car Jolly *et al* (1969, 1972) et Bardaiyar *et al* (1975) ont déjà montré que les différences réciproques ne sont pas significatives chez

A. mylitta D. Le rendement absolu en soie (poids moyen d'une coque multipliée par le nombre total de cocons récoltés) a été mesuré pour chaque lot et les facteurs de rendement, c.a.d. la fécondité, le taux effectif d'élevage (E.R.R. %), le poids du cocon et le poids de la coque ont été mesurés pour chaque replicat. Des estimations de V_r , W_r , des composants de la variation et des rapports génétiques ont été effectués selon Jinks (op. cité). L'héritabilité au sens étroit et large a été évaluée suivant la méthode de Mather et Jinks.

RESULTATS

L'amplitude, la moyenne, le degré de corrélation concernant les caractères étudiés pour les parents et les F_1 sont présentés dans le tableau II. Les valeurs de "F" pour les moyennes de ces caractères dans l'analyse de variance montre que les parents diffèrent de manière significative entre eux.

Les estimations de D, F, H_1 et H_2 sont données dans le tableau III. Les valeurs hautement significatives de D et H_1 pour tous les caractères indiquent que les variances additives et dominantes sont tout aussi importantes. Pourtant, le fait que les estimations de H_1 sont d'un ordre de grandeur supérieur dans le cas où tous les caractères sont étudiés, indique une plus grande importance de la variance non-additive dans l'expression de ces caractères. Le degré moyen de dominance est dans la fourchette de la surdominance pour l'ensemble des caractères comme H_1 est beaucoup plus élevé que D.

Les composants H_1 et H_2 sont significatifs pour tous les caractères, le poids du cocon excepté. Le composant F est hautement significatif pour tous les caractères.

Les estimations du rapport $H_2/4H_1$ sont distants de 0,25 pour tous les caractères sauf pour le poids du cocon, suggérant une distribution asymétrique des allèles positifs et négatifs parmi les parents sauf pour le poids du cocon où la distribution des allèles semble symétrique.

Nous avons analysé le rapport $4DH_1 + F/4 DH_1 - F$ pour estimer la proportion de gènes dominants et récessifs parmi les parents (tableau III). Pour la plupart des caractères, les estimations sont supérieures à l'unité, ce qui suppose un excès de gènes dominants. Pourtant, les estimations sont proches de l'unité pour le poids du cocon, suggérant une proportion égale de gènes récessifs et dominants parmi les parents, pour ce caractère.

De plus, la corrélation entre l'ordre de dominance, sur la base des valeurs $W_r + V_r$, et les performances parentales (Y_r) (tableau IV), s'est avérée positive et proche de l'unité de manière significative, pour E.R.R. %, pour le poids du cocon et le rendement absolu de soie. Ceci suggère que ces caractères sont contrôlés par les gènes additifs et les valeurs non significatives du poids de la coque et de la fécondité dénotent un contrôle génétique dominant.

L'héritabilité au sens large comme au sens étroit est analysée (tableau IV) suivant la méthode de Mather et Jinks (Op. cit.). L'héritabilité au sens large se situe entre 57,62 % et 99,63 % avec en premier le rendement absolu de soie suivi de la fécondité, du poids du cocon, du poids de la coque, alors que le taux effectif d'élevage se situe au niveau le plus bas. Auparavant, Sen *et al.* (1976) et Siddiqui *et al.* (1983-1985) ont également observé de fortes héritabilités pour les caractères du cocon.

Les estimations de l'héritabilité au sens étroit se situe entre 10,29 % et 65,99%. L'héritabilité la plus forte a été observée pour le rendement absolu de soie et le plus bas pour le poids de la coque.

Lorsque les valeurs d'héritabilité au sens étroit sont utilisées pour calculer l'avance génétique attendue (en pourcentage de la moyenne) à 5%, on observe que le gain anticipé est respectivement de 0,30 %, 0,75 %, 3,54%, 15,37 % et 1,08 % pour la fécondité, le taux effectif d'élevage, le poids du cocon, le poids de la coque et le rendement absolu de soie.

DISCUSSION

La sélection d'un matériel valable qui satisfasse aux hypothèses des modèles théoriques est extrêmement difficile. L'absence de certaines de ces hypothèses sur n'importe quel matériel, risque

de donner des résultats biaisés qui doivent être évalués pour pouvoir tirer des conclusions significatives sur une population sélectionnée.

Avec le matériel utilisé, l'action des gènes de type additif et non additif a été décelée pour les caractères de rendement et des composantes du rendement. Le composant dominant H_1 est plus élevé que D , pour tous les caractères indiquant que le degré de dominance est dans la zone de sur-dominance. De plus, il indique que la variance additive est moins importante que la variance dominante. Simultanément, les composants non additifs H_1 et H_2 sont hautement significatifs pour tous les caractères. Selon Hayman (1954), H_2 devrait être égal ou inférieur à H_1 ; la présente étude donne des résultats de ce type.

Le composant F est positif et hautement significatif pour tous les caractères suggérant un excès de gènes positifs gouvernant ces caractères.

Dans F_1 , le rapport $(H_1/D)^{1/2}$ est supérieur à un pour tous les caractères, ce qui signifie que les composants non additifs sont supérieurs aux composants additifs.

Les diverses analyses montrent qu'une majorité de caractères est contrôlée par la surdominance. Les effets de la sur-dominance ainsi révélés peuvent être jusqu'à un certain point artificiellement accrus. Hayman (op. cité) a postulé qu'une combinaison particulière des gènes positifs et négatifs ou l'action de gènes de type complémentaire ou la simple corrélation entre les gènes peut modifier de manière drastique le degré de dominance. Une dominance partielle peut se convertir en une apparente sur-dominance. L'effet d'une telle perturbation est à son maximum dans les F_1 en raison du déséquilibre de linkage.

Mather et Jinks (op. cité) affirment que en dessous de $u=v=0,5$ sur chaque locus, c.a.d. la symétrie entre allèles dominantes et récessifs, le rapport $(H_1/D)^{1/2}$ ne constituera pas une méthode fiable du degré de dominance. De plus, Hayman (op. cité) propose la méthode d'estimation, que $u=v=0,5$ ou non. Si $u=v=0,5$, le rapport $H_2/4H_1$ est égal à $0,25$. Dans l'étude présente, ce rapport n'est pas de $0,25$ dans la plupart des cas, indiquant une distribution asymétrique des gènes dominants et récessifs dans la population, ce qui peut être une des raisons de la sur-évaluation du degré de dominance dans l'analyse des composants.

La fonction majeure des mesures d'héritabilité est d'apporter des informations sur la transmission des caractères des parents aux descendants. De telles estimations permettent l'évaluation des effets héréditaires et de l'environnement dans les variations phénotypiques et ainsi favorise la sélection. Dans la présente étude, tous les caractères donnent des estimations d'héritabilité (au sens étroit) de faibles à modérées avec une avance génétique anticipée ; de telles situations indiquent que l'action des gènes non additifs et les variations de l'environnement jouent un rôle important dans l'expression des caractères. De grands progrès sont à espérer si la sélection s'accompagne cycliquement de l'inter-accouplement des éléments sélectionnés. De plus l'interaction environnement / génotype doit être éliminée de la variance phénotypique en testant le matériel dans plusieurs environnements afin d'obtenir des estimations précises d'héritabilité.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Dr. S.N. Chatterjee, Directeur Adjoint (Research and Coordination, Central Tasar Research & Training Institute, Ranchi, d'avoir suggéré les grandes lignes de cette étude.

STUDIES ON THE POPULATION OF THE GALL INSECT *TRIOZA FLETCHERI* MINOR (CRAWFORD) (PSYLLIDAE: HOMOPTERA) AT THE FIELD LABORATORY OF CENTRAL TASAR RESEARCH & TRAINING INSTITUTE, NAGRI.

R.N. SINGH, K.C. MANDAL, S.L. DHAR, S.R. BHENGRA and K. SENGUPTA. Central Tasar Research and Training Institute, Hehal, Ranchi, India.

Seasonal abundance of Trioza fletcheri minor (Crawf) was studied consecutively for 3 years. After pollarding/pruning of tasar food plant during winter months, fresh vegetative flush appeared during April - May resulting in the abundance of soft and succulent leaves. Simultaneously, a rise in psyllid population resulted from the eggs laid by the overwintering population. Nymphal population increased from June onwards and reached its peak during July - August. Peaks of infestation in 1984 and 1985 were about 26 per cent and 42 per cent in Terminalia arjuna (A & W) and 33 per cent and 45 per cent in Terminalia tomentosa (A & W). The rate of infestation in 1986 was below 10 per cent in T. arjuna and below 15 per cent in T. tomentosa. Abiotic factors like temperature and humidity appeared to play a major role in determining the insect population particularly of nymphs.

INTRODUCTION

The gall insect of *Trioza fletcheri* minor (Crawf) is a major pest of the leaves of tasar food plants. There have been reports of serious damage caused by this pest to *Terminalia arjuna* (A & W) and *Terminalia tomentosa* (A & W) leaves, Mani (1935). Current control measures rely primarily on the application of insecticides. The psyllids have been reported breeding throughout the year. Its activity, however, slowed down during the winter season (Mathur, 1935). It is axiomatic that insects grow and multiply when both their biotic and abiotic factors are satisfied, the biotic factors being influenced in turn by the abiotic factors like temperature and relative humidity (Beeson, 1941). It was thus felt that study of the seasonal incidence vis-a-vis the abiotic factors could not only indicate the peak period of activity of this pest, thereby suggesting the strategy for its control, but also provide useful information on the effect of climatic conditions on the population of *T. fletcheri* minor.

MATERIALS AND METHODS

The study was undertaken on the *T. arjuna* and *T. tomentosa* leaves, highly susceptible to gall insect attack. The study was conducted from 1984-1986 at F.L. Nagri of CTR&TI, Ranchi situated at about 20 km away from Ranchi with a latitude 23° 24', longitude 85° 18' and altitude 708 metres AMSL. Survey was conducted in randomised block design. From each of the 20 plots, ten rows of plants and from each row, one bush had been selected in randomised fashion. Ten numbers of twigs

were taken from upper, middle and lower position of each plant. Each twig was taken from each of the 4 geographical directions and different depth and height. The gall infected and uninfected leaves and number of galls in total leaves were counted with the help of a magnifying glass. The meteorological data on temperature, relative humidity rainfall, etc. were recorded throughout the observation period.

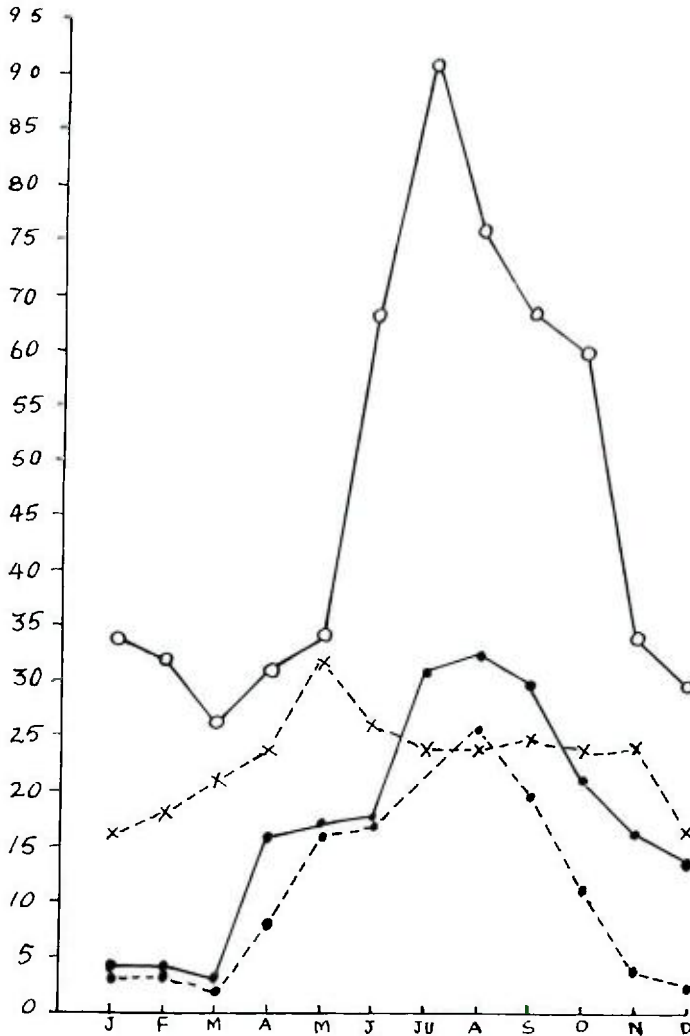


Fig. 1. Population fluctuation of gall insects in relation to abiotic factors in 1984.

Fig. 1. Fluctuation de la population des insectes parasites par rapport aux facteurs abiotiques en 1984

----- Infestation in *T. arjuna* (%) / infestation chez *T. arjuna* (%)
 — Infestation in *T. tomentosa* (%) / infestation chez *T. tomentosa* (%)
 — Average relative humidity (%) / humidité relative moyenne (%)
 x----x Average temperature (°C) / température moyenne (°C).

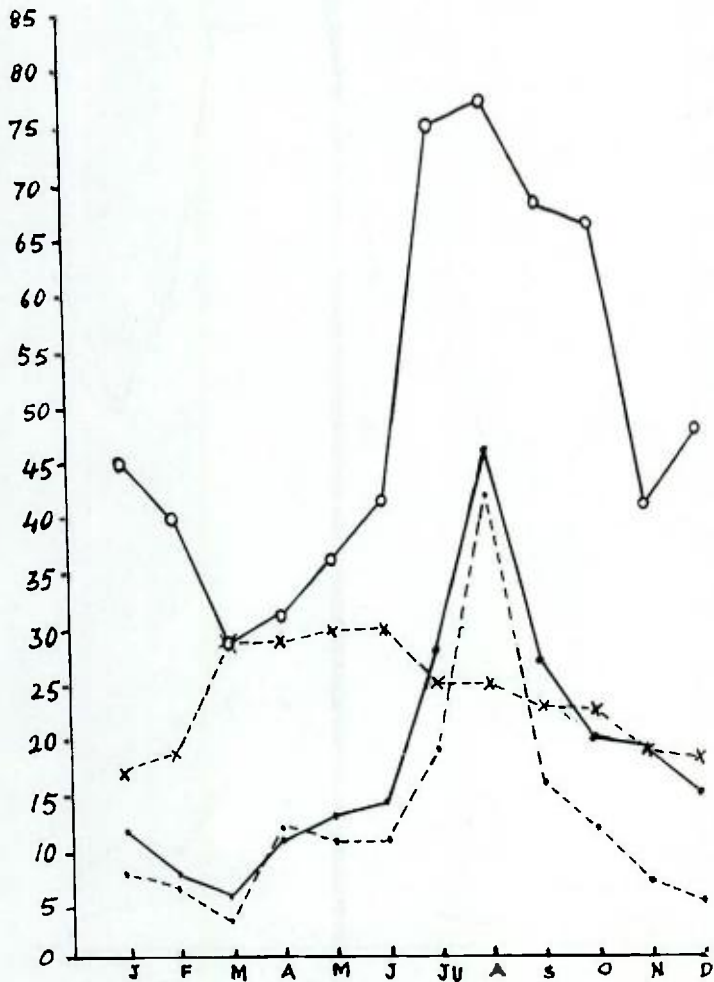


Fig. 2. Population fluctuation of gall insects in relation to abiotic factors in 1985.

Fig. 2. Fluctuation de la population des insectes parasites par rapport aux facteurs abiotiques en 1985

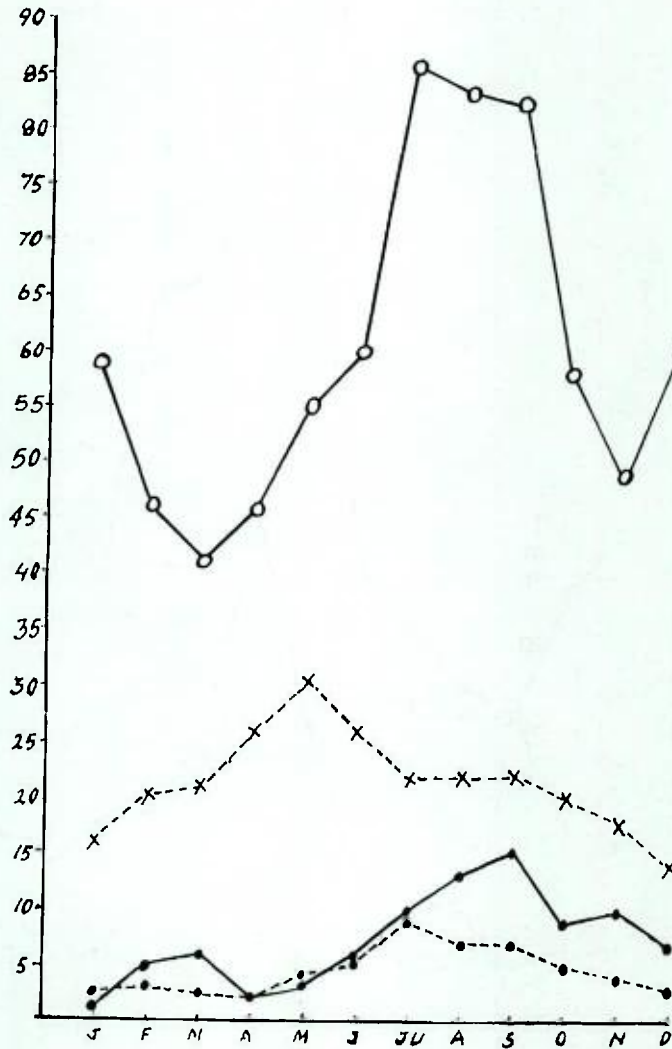


Fig. 3. Population fluctuation of gall insects in relation to abiotic factors in 1986.

Fig. 3. Fluctuation de la population des insectes parasites par rapport aux facteurs abiotiques en 1986.

Month/ Mois	T. tomentosa			T. arjuna		
	1984	1985	1986	1984	1985	1986
January/janvier	3.80	12.10	1.11	3.00	8.30	2.79
February/février	3.90	8.10	5.03	3.30	7.10	2.90
March/mars	2.50	6.30	5.50	2.20	3.80	2.78
April/avril	16.47	10.50	1.96	7.91	11.61	2.53
May/mai	16.90	12.78	2.90	16.30	11.15	4.08
June/juin	16.80	14.28	5.42	16.70	11.25	4.93
July/juillet	31.00	28.00	9.54	31.00	18.84	9.18
August/août	33.30	45.82	12.65	26.50	42.02	7.34
September/septembre	29.80	27.29	15.23	19.80	15.95	7.15
October/octobre	21.60	19.85	9.32	12.30	11.66	5.23
November/novembre	17.20	18.67	9.97	4.3	6.71	4.48
December/décembre	14.20	14.65	7.22	3.90	5.14	3.70

C.D. at 5% = 4.6835 ; C.D. at 1% = 6.6092.

Table I. Seasonal variation of *Trioza fletcheri* minor Crawford infestation in *T. tomentosa* (A & W) and *T. arjuna* (A & W) leaves with gall (%).

Tableau I. Variations saisonnières de l'infestation (%) des feuilles de *T. tomentosa* et *T. arjuna* par *Trioza fletcheri* minor Crawford.

RESULTS AND DISCUSSION

The seasonal populations of gall insect, *Trioza fletcheri* minor on the leaves of *T. arjuna* and *T. tomentosa* during the period from 1984 to 1986 are presented in figures (1-3). It was observed that it remained active practically throughout the year. The population of psyllids varied from year to year. There was maximum fluctuation during pre and post monsoon season. Although there were variations in every season and year, they followed a more or less similar trend. Each year after pruning or pollarding of the tasar food plants a fresh vegetative flush occurred during April-May, resulting into abundance of soft and succulent leaves. A steep rise of the psyllid population resulted during the period from the egg laid by overwintering adult population. Nymphal population increased from June onwards and reached its peak during July-August. It was recorded that infestation of *Trioza fletcheri* minor was significantly more on the leaves of *T. tomentosa* in comparison to *T. arjuna*. The peak period of seasonal abundance was August in *T. tomentosa* and July in *T. arjuna*. At the end of rainy season, psyllid population gradually declined and during winter from November to February it decreased below 5%. Nevertheless, all stages of *T. fletcheri* minor were present throughout the year. Very few adults were observed during the winter season when temperature fell below 10°C. Clark (1962) reported similar observation on the fluctuation of nymphal population in psyllids. A rapid resurgence in the nymphal population was from mid week of July which led to second peak in mid week of August (see Table I). The results are in agreement with the work of Mani (1973), Ananthakrishnan (1984). This other revealed that the climatic conditions of June-July and August proved conducive for the growth and development of the nymphal population on the leaves of tasar food plants. During this period, mean minimum and maximum temperature ranged between 25°C to 28°C with the relative humidity ranging from 54 to 73%. The occurrence of rains also coincided with the most active periods of the psyllids population. Catling (1971) pointed out that main upsurge in insect population might be stimulated by the rain fall. The impact of extremes of weather appeared to be more pronounced against nymphs than the adults. Nymphal population was recorded continuously during and after the rains. But the occurrence of rains for a few days followed by bright sunny days during July-August appeared to favour the development of nymphs. It resulted in the peak period of infestation. The lowering of temperature and humidity coupled with less vegetative flush reduced the nymphal population. Their population thus remained low from October-November till March next year.

REFERENCES

- ANANTHAKRISHNAN T. (1984) Gall insects, Oxford and I.B. publication.
 BEESON C.F.C. (1941), The ecology and control of the forest insects of India and the neighbouring countries, Vasant Press Dehradun, 775-782.
 CLARK L.R. (1962), The general biology of *Cardiaspina albifextura* (Psyllidae) and its abundance in relating to weather and parasitism, Aust. Jour. Zool., 10, 537-586.
 CATLING H.D. (1971), The bionomics of the South African citrus psylla *Trioza erythraea* (Delguercio) Homoptera : Psyllidae 5. The influence of host plant quality, Jour. Ent. Soc. Sth. Afr., 33, 341-348.
 HODKINSON I.D. (1978) : The psyllids (Homoptera: Psylloidea) of Alaska Sys. Ent. 3, 333-360.
 MANI M.S. (1935), Notes on some Indian gall forming psyllidae (Homoptera) J.L. R. Asiat. Soc. Beng. 1(2), 99-108.
 MANI M.S. (1973), Plant Galls of India. Macmillan India.
 MATHUR R.N. (1935), On the biology of psyllidae. Indian forest REC. 1(2), 35-70.

**ETUDES SUR LA POPULATION DE L'INSECTE PARASITE
TRIOZA FLETCHERI MINOR (CRAWFORD) (PSYLLIDAE :
HOMOPTERA) AU LABORATOIRE DE RECHERCHE DU
CENTRAL TASAR RESEARCH AND TRAINING INSTITUTE,
NAGRI**

**R.N. SINGH, K.C. MANDAL, S.L. DHAR S.R. BHENGRA et K. SENGUPTA. Central
Tasar Research and Training Institute, Hehal, Ranchi, Inde.**

*L'importance saisonnière du *Trioza fletcheri minor* (Crawf) a été étudiée pendant trois années consécutives. Après l'écimage / taille des plantes nourricières tasar pendant les mois d'hiver, de nouvelles pousses sont apparues pendant le mois d'avril - mai, donnant une abondance de feuilles tendres et succulentes. Simultanément, on observe une augmentation de la population de psyllides, conséquence des œufs pondus par la population ayant survécu à l'hiver. La population de chrysalides a augmenté à partir de juin et a atteint son maximum en juillet - août. Le maximum de l'infestation en 1984 et 1985 était d'environ 26 pour cent et 42 pour cent chez *Terminalia arjuna* (A et W) et de 33 et 45 pour cent chez *Terminalia tomentosa* (A et W). Le taux d'infestation en 1986 était en dessous de 10% chez *T. arjuna* et en dessous de 15% chez *T. tomentosa*. Les facteurs abiotiques tels que la température et l'humidité semblent jouer un rôle déterminant pour la population des insectes, et en particulier des nymphes.*

INTRODUCTION

L'insecte parasite *Trioza fletcheri minor* (Crawft) est un parasite important des feuilles des plantes tasar. Plusieurs rapports ont été faits sur les sérieux dommages causés par ce parasite sur les feuilles de *Terminalia arjuna* (A et W) et *Terminalia tomentosa* (A et W), (Mani, 1935). L'application de pesticide constitue actuellement la principale mesure de lutte. On dit que les psyllides se reproduisent pendant toute l'année. Leur activité diminue néanmoins pendant l'hiver (Mathur, 1935). Il est trivial de dire que les insectes se développent et se multiplient au moment où les facteurs biotiques et abiotiques sont satisfaisants, les facteurs biotiques étant eux-mêmes influencés par les facteurs abiotiques tels que la température et le taux d'humidité relative (Beeson, 1941). Nous avons donc pensé qu'une étude de l'incidence saisonnière par rapport aux facteurs abiotiques ne pouvait qu'indiquer la période d'activité maximum de ce parasite, suggérant ainsi un moyen

de lutte, mais donnant également des informations utiles sur les effets des conditions climatiques sur la population de *T. fletcheri minor*.

MATERIEL ET METHODES

L'étude a été entreprise sur les feuilles de *T. arjuna* et *T. tomentosa*, très sensibles aux attaques de cet insecte parasite. L'étude a été conduite de 1984 à 1986 à F.L. Nagri, CTR&TI, Ranchi, situé à environ 20 km de Ranchi, à une latitude de 23° 24', longitude 85° 18' et une altitude de 708 mètres AMSL.

Des bâtiments non spécifiques ont été utilisés. Les quartiers de terrain ont été sélectionnés au hasard suivant un calcul statistique. La sélection s'est faite au hasard : à partir de ces 20 quartiers, 10 rangées de plantes ont été sélectionnées et une plante a été sélectionnée dans chaque rangée. Dix petites branches ont été prises en haut au milieu et en bas de chaque plante. Chaque branche a été prise dans les quatre directions géographiques à différentes profondeurs et hauteurs. Les feuilles infectées et saines et le nombre des insectes sur toutes les feuilles ont été comptés à l'aide d'une loupe. Les données météorologiques, telles que la température ont été enregistrées pendant toute la période d'observation.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les populations saisonnières de l'insecte *Trioza fletcheri minor* sur les feuilles de *T. arjuna* et *T. tomentosa* pendant la période allant de 1984 à 1986 sont présentées sur les figures 1 à 3. On a remarqué qu'il reste actif pendant pratiquement toute l'année. La population des psyllides varie d'année en année. La fluctuation maximum se situe pendant et après la mousson. Malgré les écarts enregistrés chaque saison et chaque année, elles suivent une tendance plus ou moins similaire. Chaque année, après la taille ou l'écimage des plantes, des poussées nouvelles apparaissent en avril-mai donnant une importante quantité de feuilles tendres et abondantes. Il en résulte une agmentation rapide de la population de psyllides provenant des oeufs pondus par la population adulte ayant survécu à l'hiver. Le nombre de nymphes augmente à partir de juin et atteint un maximum pendant juillet - août. On a constaté que l'infestation par *Trioza fletcheri minor* est significativement plus importante sur les feuilles de *T. tomentosa* que sur celles de *T. arjuna*. La période maximale est août chez *T. tomentosa* et juillet chez *T. arjuna*. A la fin de la saison des pluies, la population de psyllides décline progressivement et pendant l'hiver, de novembre à février, elle tombe en deçà de 5%. Tous les stades de *T. fletcheri minor* peuvent malgré tout être observés tout au long de l'année. On observe peu d'adultes pendant l'hiver lorsque la température descend en dessous de 10°C. Clark (1962) a fait des observations similaires sur la fluctuation de la population nymphale chez les psyllides. Une reprise rapide de la population nymphale a eu lieu à partir de la mi-juillet, laquelle a amené un deuxième pic à la mi-août (cf. tableau I). Les résultats concordent avec l'étude de Mani (1973), Ananthakrishnan *et al.* (1984). Ce dernier montre que les conditions climatiques de juin-juillet et août s'avèrent favorables à la croissance et au développement de la population nymphale sur les feuilles et les plantes nourricières. Pendant cette période, la température moyenne minimum et maximum se situe de 25°C à 28°C avec une humidité relative se situant de 54 à 73%. Les pluies coïncident également avec les périodes les plus actives de la population de psyllides. Caling (1971) a remarqué que le principal regain d'activité des insectes pourrait être stimulé par les chutes de pluies. Les nymphes semblent plus sensibles que les adultes aux différences extrêmes du temps. La population nymphale a été enregistrée continuellement pendant et après les pluies. Mais l'apparition de pluies pendant quelques jours, suivies de journées ensoleillées pendant juillet - août favorise le développement des nymphes. D'où la deuxième poussée de la mi-août (cf. tableau I). L'abaissement de la température et du taux d'humidité avec parallèlement une poussée végétative plus réduite conduisent à une diminution de la population nymphale. Cette population demeure faible depuis octobre-novembre jusqu'en mars de l'année suivante.

A COMPARATIVE BIOCHEMICAL STUDY OF THE HAEMOLYMPH IN BIVOLTINE AND TRIVOLTINE PUPAE OF THE TASAR SILKWORM *ANTHRAEA MYLITTA* DRURY, DURING DEVELOPMENT

A.K. MOHANTY and A. MITTRA Laboratory of Physiology and Biochemistry, School of
Life Sciences, Sambalpur University, Jyoti Vihar 768019, Sambalpur, Orissa, India

A comparative study of the changing pattern of total protein, total free amino acid, total soluble carbohydrate, cholesterol and free ascorbic acid concentration of the haemolymph in bivoltine and trivoltine varieties of the tasar silkworm (Antheraea mylitta D.) has been done on day 90, 75, 60, 45 and 30 prior to eclosion (Preecllosion age of pupae). The total protein content, cholesterol level and ascorbic acid concentration showed a gradual decreasing trend during this period; whereas the total free amino acid and total soluble carbohydrate concentration showed an increasing pattern. The difference in all the above biochemical parameters mentioned between bivoltine and trivoltine pupae were not statistically significant. It seems evident that the pattern of biochemical changes follow a common trend irrespective of voltinism in A. mylitta.

INTRODUCTION

Voltinism is of common occurrence in the life history of the tasar silkworm (*Antheraea mylitta*) i.e. the same species has different varieties, like mono, bi, tri and multivoltine, depending on the number of life cycles it passes through in a year. Consequently, the total duration of the various stages in the life history are different, even though the ultimate eclosion time of all the varieties are very close to each other. It was felt necessary to investigate some of the biochemical parameters during this stage of development with a view to compare the patterns between the two voltine varieties.

There are several reports on the qualitative and quantitative changes in haemolymph protein during insect development (Laufer, 1960; Pant & Sharma, 1968; Chippendale & Beck, 1966 and Sinha et al., 1985). Similarly there are several reports on amino acid estimation in insect haemolymph in relation to development (Jolly et al., 1972 and Pant & Unni, 1978). Changing pattern in concentration and types of carbohydrates in haemolymph of insect during the life cycle have also been reported (Wyatt & Kalf, 1957 and Kim et al., 1983). Investigation on the levels and turnover of cholesterol have also been done by several workers in different insect species during development (Gilbert, 1964, Goodfellow & Gilbert, 1967 and Pant, 1984). Less is known about the ascorbic acid biosynthesis in insects though several roles have been ascribed to this vitamin in insect growth, development, metabolism and pathology (Pant & Pandey, 1978 and Navon et al, 1985).

Any comparative account on biochemical changes in relation to voltinism are relatively rare. Therefore a comparative sequential investigation of these biochemical parameters, simultaneously in haemolymph of late pupal stages of both bivoltine and trivoltine variety of *A. mylitta* have been done in this study. Such comparative investigations may give some clue to

understand the metabolic pattern and concomittant biochemical changes undergone by different voltine variety of tasar silkworms and thereby enable us to manipulate their developmental duration for commercial exploitation.

MATERIALS AND METHODS

Live cocoons of bivoltine and bivoltine variety of *Antheraea mylitta* D., the tasar silkworm, of known age were procured from State Tasar Research Farm, Durgapur, Mayurbhanja, Orissa for culture and analysis. Pupae in batches irrespective of sex from both the varieties were sacrificed for biochemical analysis at an interval of 15 days from February 1986 i.e. at the preecclosion age of day 90 (this batch of pupae will emerge after 90 days) to preecclosion age of day 30. The assay was perused upto the preecclosion age of day 30. Pupal haemolymph was pulled by puncturing the lower abdominal portion of the pupae for different biochemical estimations. After collection of haemolymph it was centrifuged at 2000 rpm for 5 minutes and the supernatant haemolymph was transferred to another test tube and preserved in refrigerator at 6C to 8C which served as the stock.

Total protein estimation from haemolymph was done following the method of Lowry et al., (1951) & the extinction was measured at 750 nm.

Total free aminoacids estimation was done according to the method described by Yem and Cocking (1955) using ninhydrin reagent and measured at 550 nm.

Total soluble carbohydrate was estimated following the method of Yem & Willis (1954) with anthrone reagent and extinction measured at 620 nm.

Cholesterol estimation was done by Libermann - Buchard reaction, the procedure was adopted from Plummer (1982) and the extinction measured at 680 nm

Ascorbic acid estimation was carried out according to the method given by Roe (1967); except that the time and temperature of incubation were modified as per Tewari & Pandey (1964).

The extinction was measured spectrophotometrically using a spekol-10 and all the values were calculated from their respective standard graphs.

RESULTS AND DISCUSSION

The pupal phase in any holometabolous insect is a stage of slow and gradual biochemical as well as morphogenetic change. Both synthesis and degradation of several cellular and molecular components continue during this period, solely from the reserve materials which are already present; although it appears to be a quiescent stage. Since haemolymph is the main reservoir and serves as the pool for exchange of materials between the tissues during histogenesis and histolysis, analysis of different biochemical constituents in haemolymph during this stage of development at regular intervals may indicate the metabolic pattern rate of utilization and degradation of these constituents.

The changes in the protein content in the haemolymph of both bivoltine and trivoltine pupae of *A. mylitta* at regular age intervals have been shown in Fig.1. The total protein content in bivoltine variety was 51.4 mg/ml haemolymph and fell to 35 mg/ml; haemolymph at the PED 30; whereas in trivoltine it fell from 46.3mg/ml.H. to 31.9 mg/ml.

The changing profile of protein concentration in both the varieties between PED 90 and 60, PED 90 and 30 and PED 60 and 30 was highly significant (P.05 & .001). However, the differences in this parameter between the two varieties for any given day was found to be non significant.

The changing pattern of protein concentration in both the varieties shows a similar trend as reported in *Bombyx mori* (Wyatt et al., 1956), in *Philosamia ricini* (Pant et al., 1968) in *Phorima regina* (Chen and Levenbook, 1966) and in this species by Sinha et al., (1985). The gradual decline in protein concentration towards late pupal development is perhaps due to its mobilisation and participation in the synthesis of adult structure i.e. histogenesis for which this serves as an important source (Chen & Lebenbook, 1966).

The total free aminoacid content gradually increased from PED 90 towards PED 30 in the haemolymph of both bi and trivoltine pupae (Fig. 2). It increased from 2.1 mg/ml.H. to 16.067 mg/ml.h. in bivoltine and from 1.87 mg/ml.h to 16.44 mg/ml.H. in trivoltine variety. There was

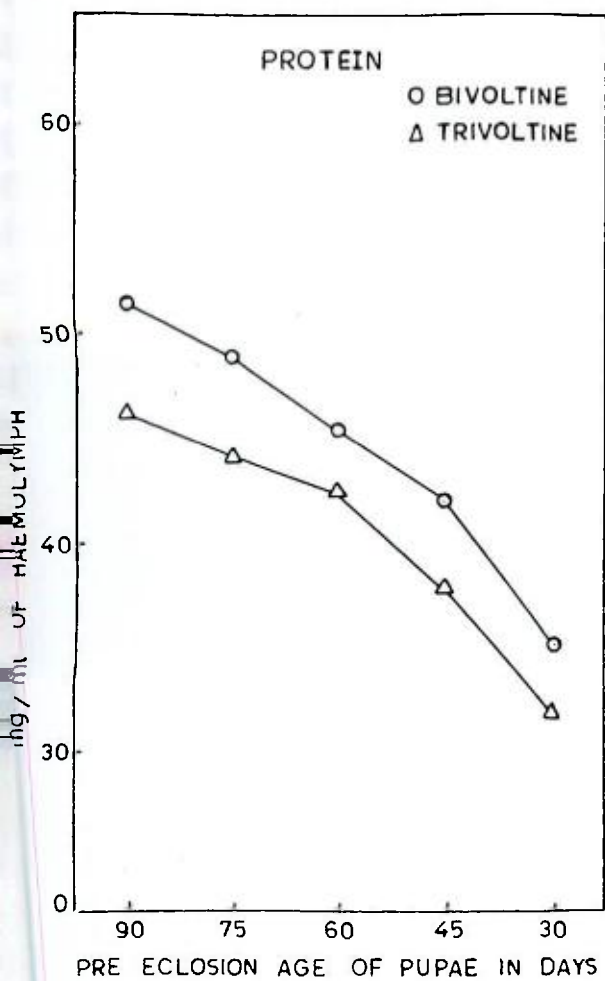


FIG. 1

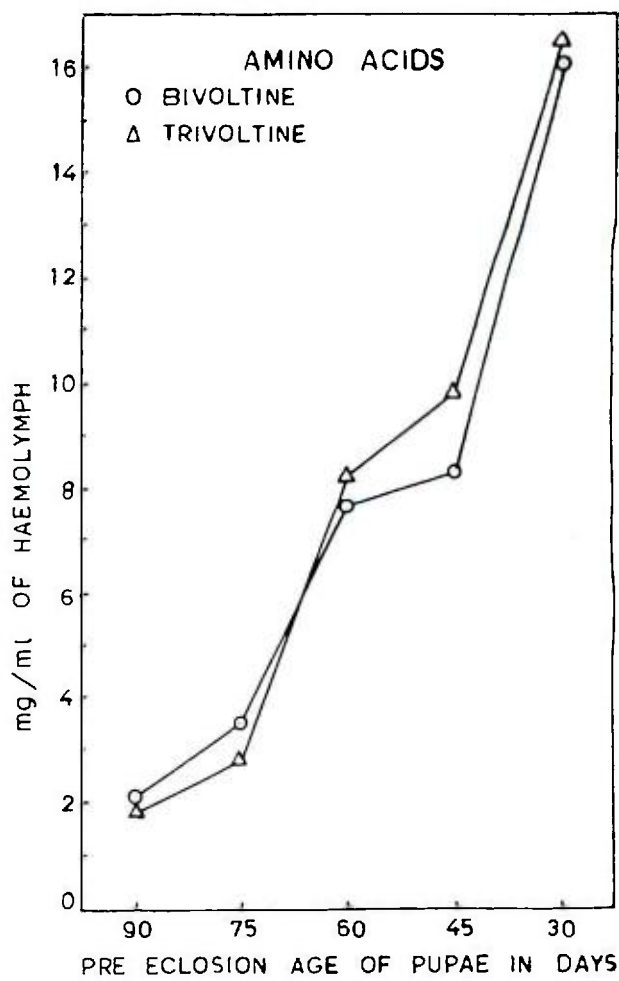
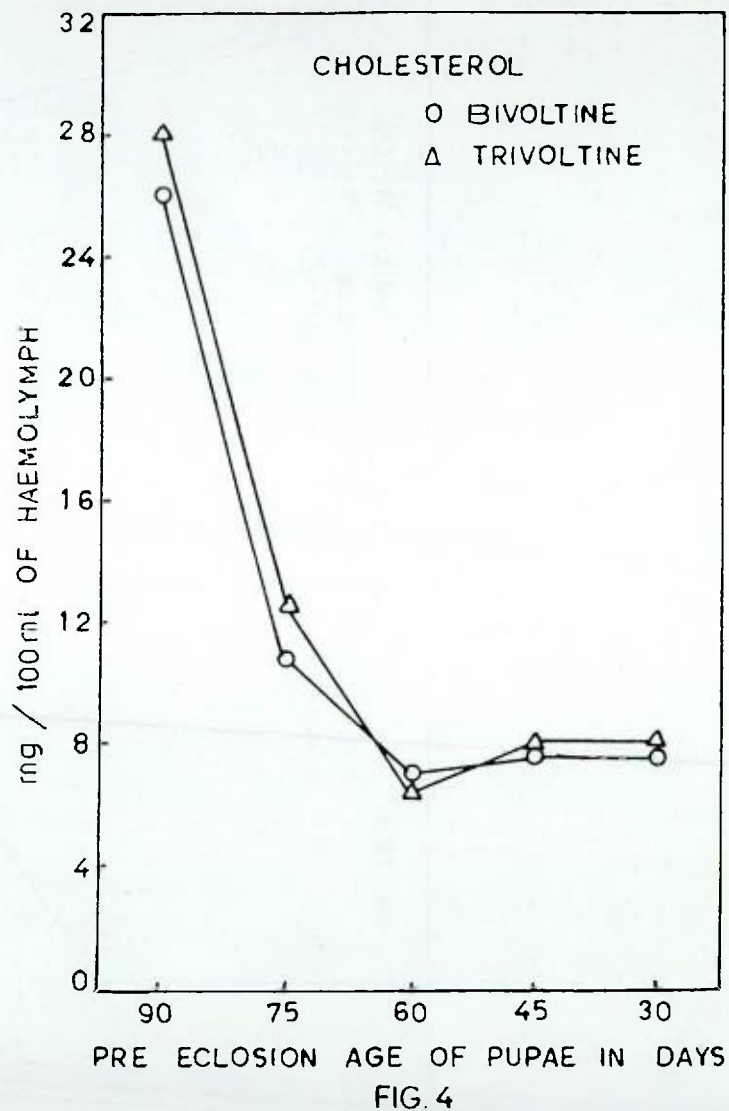
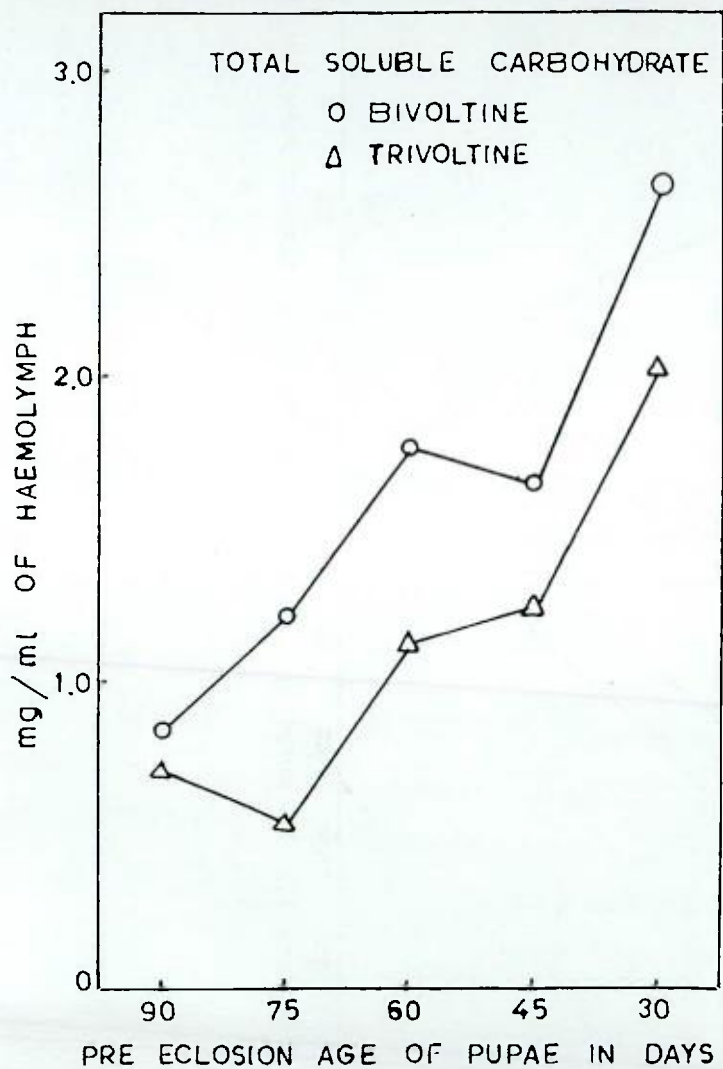


FIG. 2



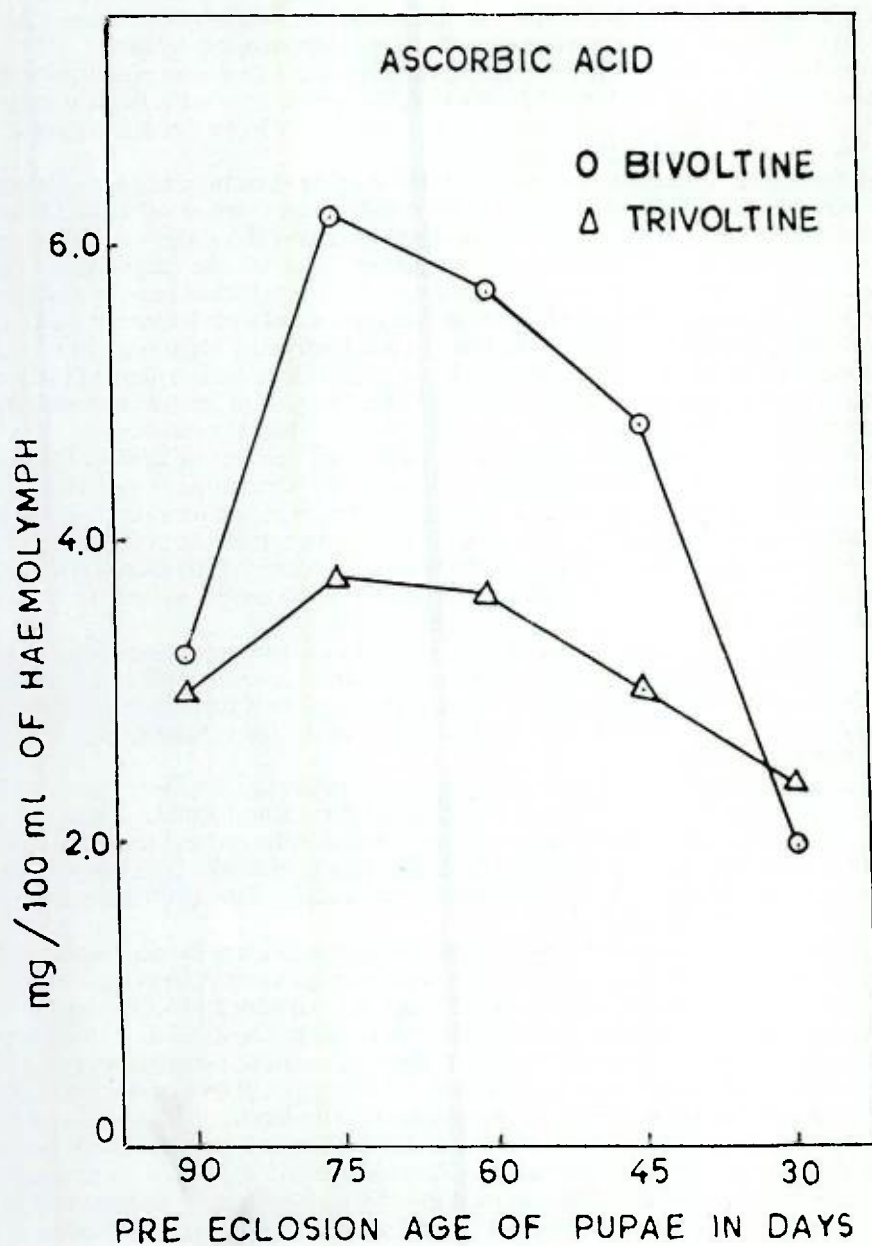


FIG. 5

no statistically significant difference in biochemical parameters between bi and trivoltine, however the differences between different preecllosion ages were significant (P.001).

The total free aminoacid (FAA) concentration profile in the late pupal stages in both bi and tri voltine variety showed a reverse trend in comparison to that of protein concentration i.e. a slow but steady rise over entire period. Similar trend in *P. ricini* has been reported by Pant (1984). Since pupae do not feed, perhaps this rise in aminoacid concentration is due to histolysis of pupal tissue for histogenesis of adult structures. In trivoltine the accumulation of total FAA is higher indicating a faster rate of histolysis or slower rate of transport and conversion for histogenesis.

Total soluble carbohydrate (TSC) level follows the same increasing trend in both the voltines as it approached eclosion, though a slightly different rising trend is seen in both, this is not significant statistically (Fig 3). In bivoltine, it increased from 0.846 mg/ml.h. to 2.628.h. mg/ml.h. and in trivoltine from 0.698 mg/ml.h. to 2.035 mg/ml.h.

In both the voltine the changing pattern of TSC followed the same trend and agrees with similar findings in recent studies on *B. mori* (Kim *et al.*, 1983) and *P. ricini* (Pant *et al.* 1984). Since there is no extraneous supply of carbohydrate vide nutrition during this stage, such an increase in carbohydrate concentration in haemolymph is perhaps due to the degradation of stored carbohydrate in different tissues of the last larval stage which is sufficient to serve as the suitable substrate to fulfil the energy demand till eclosion. The presence of carbohydrate in the fat body of late larvae in high amount and drastic reduction to a low level in the pupal stage of *B. mori* also suggest the same (Kim *et al.*, 1983). The results on total soluble carbohydrates (TSC) indicate that the rate of degradation of storage carbohydrates, the rate of uptake and utilization i.e. carbohydrate metabolism on the whole is not much different in both the varieties.

As the animal approached eclosion, the total cholesterol content fell rapidly i.e. on the PED 90 the total content in bi voltine was 26 mg/100ml.h. and in trivoltine it was 28 mg/100ml.h., which fell to 10.6 and 12.5 mg/100ml.h. on the PED 75 itself and then decreased further to 7 & 6.5 mg/100 ml.h. in bi and tri voltine respectively, after which it followed a constant level (Fig 4). The falling pattern of cholesterol during this period in both the varieties between PED 90 and 60 and PED 90 and 30 were highly significant (P.001), where as between PED 60 and 30 as well as between the two voltines were not significant.

The depletion of cholesterol level in haemolymph during late pupal development is perhaps due to active uptake and utilisation during histogenesis, in membrane assembly in a general and by steroidogenic tissue in particular for which it serves as the precursor (Chapman, 1980). The findings on cholesterol in *P. ricini* (Pant & Nautiyal, 1974) and *B. mori* (Saito *et al.*, 1963) are in agreement with our findings.

The free ascorbic acid content in haemolymph of both varieties were very low. At PED 75, ascorbic acid concentration increased from 3.2 to 6.2 and 3.0 to 3.8mg/100ml.h. in bi and tri voltine respectively. This value fell slowly as the animal approached eclosion and reached a level of 2 mg/100 ml.h. in bivoltine and 2.4 mg/100ml.h. in trivoltine at PED 30. The changing pattern of free ascorbic acid in and between both the varieties were not statistically significant except between PED 60 and 30 of bivoltine (P.05), (Fig 5).

Various roles have been ascribed to this vitamin in insects; such as the deprivation of dietary ascorbic acid in phytophagous insects maximise morbidity at the moult (Chippendale *et al.*, 1965; Navon, 1978). The hydroxylation of both prolyl peptides and cuticle lipid in insects require ascorbate as cofactor, though vit-C dependent collagenesis has not been verified in lepidopterans (Blomquist & Jackson, 1979; Franois, 1980). A declined growthrate, elimination of drier faecal pellets, accumulation of tissue water and increased food consumption as a result of immediate withdrawal of ascorbic acid from the diet, has been reported in the larvae of *Menduca sexta* (Navon, 1985). The depletion towards eclosion may be due to its mobilisation into specific cells and tissues for participation in several biochemical reactions. Pant and Pandey (1978) have also shown similar trend in *P. ricini*. Same type of changing pattern of ascorbic acid content in haemolymph of both the variety suggests similar pattern of mobilisation and utilisation of this vitamin during late pupal development.

The analysis of the results do not indicate any significant difference in the gross metabolic pattern with respect to the biochemical parameters investigated during this period (i.e. PED 90 to PED 30) between bi and trivoltine pupae. It therefore seems that the type of volinism is

a species specific, genetically determined phenomenon. It can show adaptive flexibility, under the influence of environmental factors like photoperiod, temperature humidity etc., which may affect the various rate processes without changing the gross metabolic pattern. The role of hormones/neurosecretions and the possible presence activation of Isozymes in modulating voltinism in this species remain to be investigated.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are thankful to Prof. M.C. Dash, Head, School of Life Sciences, Sambalpur University, for the laboratory facilities and to Mr. B.K. Nayak, Research Officer, State Sericultural research Station, Baripada, Orissa for his help.

REFERENCES

- BLOMQUIST G.J., JACKSON L.L. (1979) Chemistry and biochemistry of insect waxes. *Prog. Lipid Res.*, 17, 319-345
- CLES J.S. EVANS D.R. (1961) Blood trehaloses and flight metabolism in the blowfly, *Science*, N.Y., 134, 54-55.
- CHIPPENDALE G.M., BECK S.D., STRONG F.J. (1965) Nutrition of the cabbage looper *Trichoplusia ni* (Hüb.). 1. Some requirements for larval growth and wing development. *J. Insect Physiol.*, 11, 211-223.
- CHEN P.S., LEVENBOOK L. (1966) Studies on the haemolymph proteins of the blowfly *Phorimia regina*. II Synthesis and breakdown as revealed by isotopic labelling, *J. Insect Physiol.*, 12, 1611-1627.
- CHIPPENDALE G.M., BECK S.D. (1966), Haemolymph proteins of *Ostrinia nubilalis* during diapause and prepupal differentiation, *J. Insect Physiol.*, 12, 1629.
- CHAPMAN R.F. (1980), The insects: Structure and Function, ELBS Edition, Great Britain, 819.
- DUVE H. (1977), Changes in the amount of carbohydrates during larval development of the blowfly *Calliphora erythrocephala*, *Insect Biochem.* 7, 223-238
- FRANCOIS J. (1980), Secretion of collagen by insects: Autoradiographic study of L. Proline 3H-5 incorporation by the fibreblast in *Thermobia domestica*, *J. Insect Physiol.*, 26, 125-133.
- GILBERT L.I. 1964, *Physiology of Insects*, Acad. Press Inc Ltd., N.Y., 1, 149.
- GOODFELLOW R.D., GILBERT L.I., 1967, *Advances in Insect Physiology*, Acad. Press Inc. N.Y., 4, 69.
- JOLLY M.S., SINHA A.K., AGRAWAL S.C. (1972), Free aminoacids in the larval and pupal haemolymph of *Antheraea mylitta* D. reared on *Terminalia tomentosa*, *Ind. J. Sericult.*, 11, 63-67.
- KIM, RYUL H., YOE S.M., YU J.H., KUM K.M. (1983), Carbohydrates and inorganic ions in haemolymph and fat body during metamorphosis of the silkworm, *Bombyx mori* L., *The Korean J. of Entomology*, 13(2), 55-59.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.F. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- LAUFFER H. (1960) Blood proteins in Insect development *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 89, 490-515
- NAVON A., 1978, Effects of dietary ascorbic acid on larvae of the Egyptian cotton leafworm *Spodoptera littoralis*, *J. Insect Physiol.*, 24, 39-44
- NAVON A., NESBITT J., HENZEL W., LIPKE H. (1985) Effects of ascorbic acid deficiency on growth and cuticle composition of *Manduca sexta* and *Spodoptera littoralis*. *Insect Biochem.* 15(2), 285-291.
- PANT R., SHARMA S.C. (1968), *Ind. J. Biochem.*, 5, 69 (Original not seen).
- PANT R., NAUTIYAL G.C. (1974), Cholesterol turnover in *Philosamia ricini* during development *Ind. J. Biochem. Biophys.* 11, 156-158.
- PANT R., PANDEY K.N. (1978), On the occurrence of ascorbic acid in *Philosamia ricini* fat body, *Ind. J. Exp. Biol.*, 16(12), 1312-1313.

- PANT R., UNNIB. (1978), Some Biochemical studies on *Philosamia ricini* during fifth instar development and spinning period. Ind. J. Exp. Biol. 16(6) 705-706
- PLUMMER D.T., 1982, An introduction to practical biochemistry. Tata Mc. Graw-Hill, New Dehli, 362.
- PANT R. (1984), Some biochemical aspect of the eri silkworm *Philosamia ricini*, Sericologia, 24(1), 53-91.
- ROE J.H. (1967) Methods of biochemical analysis (edited by Glick D.), Interscience, N.Y., 1, 115.
- SAITO S. (1963), Trehalose in the body fluid of the silkworm, *Bombyx mori* L. J. Insect Physiol., 9, 509-519
- SINHA A.K., CHAUDHURY S.K., SENGUPTA K. (1985), Changes in protein content in the larval and pupal haemolymph of *Antheraea mylitta* D. Sericologia, 25(1), 39-43.
- TEWARIC.P., PANDEY V.C. (1964), Ind. J. Biochem., 1, 171.
- WYATT G.R., LOUGHHERD T.C., WYATT S.S. (1956), The chemistry of Insect haemolymph. Organic compounds of the haemolymph of silkworm *Bombyx mori* and two other species, J. Gen. Physiol., 39, 853-858.
- WYATT G.R., KALF G.F., 1957, The Chemistry of Insect haemolymph II Trehalose and other carbohydrates, J. Gen. Physiol., 40, 833-847.
- WIMER L.T. (1969) A composition of the carbohydrate composition of the haemolymph and fat body of *Phorima regina* during larval development, Comp. Biochem. Physiol., 29, 1055-1062.
- YEMM E.W., WILLIS A.J., 1954, The estimation of carbohydrates in Plants extracts by anthrone, Biochem. J., 57, 508-514.
- YEMM E.W., COKKING E.C., (1955), The determination of aminoacids with ninhydrin, Analyst, 80, 209-212.

UNE ETUDE BIOCHIMIQUE COMPARATIVE DE L'HEMOLYPHE DES CHRYSALIDES BIVOLTINES ET TRIVOLTINES DU VER A SOIE TASAR *ANTHERAEA MYLITTA* DRURY AU COURS DU DEVELOPPEMENT

A.K. MOHANTY and A. MITTRA Laboratory of Physiology and Biochemistry, School of
Life Sciences, Sambalpur University, Jyoti Vihar 768019, Sambalpur, Orissa, Inde.

*Une étude comparative de l'évolution des protéines, des acides aminés libres, des hydrates de carbone solubles, du cholestérol et de la concentration en acide ascorbique libre de l'hémolymph chez les variétés bivoltines et trivoltines du ver à soie tassar (*Antheraea mylitta* D.) a été faite au 90, 75, 60, 45 et 30 jour avant l'émergence (période de pré-émergence de la chrysalide). Le contenu en protéines totales, le niveau de cholestérol et la concentration en acide ascorbique baissent pendant toute cette période, alors que les acides aminés libres totaux et la concentration en hydrate de carbone soluble total sont en hausse. Les résultats obtenus entre bivoltins et trivoltins concernant tous les paramètres biochimiques cités plus haut ne sont pas statistiquement différents. Il semble évident que les variations biochimiques suivent une même tendance quel que soit le voltinisme chez *A. mylitta*.*

INTRODUCTION

Le voltinisme est un phénomène fréquent commun à tout ver à soie tassar (*Antheraea mylitta*), c'est à dire que chez la même espèce, différentes variétés existent, mono, bi, tri, et polyvoltines selon le nombre de cycles par année. En conséquence, la durée totale des différents stades de vie est différente, même si les époques d'émergence finales de toutes ces variétés sont très proches l'une de l'autre. Il semble nécessaire de faire des recherches sur les paramètres biochimiques au cours de ce stade du développement avec pour objectif la comparaison entre des variétés différentes.

Plusieurs rapports ont été faits sur les changements qualitatifs et quantitatifs des protéines de l'hémolymph au cours du développement de l'insecte (Laufer, 1960; Pant et Sharma, 1968; Chippendale et Berk, 1966 et Sinha *et al.*, 1985). De même, il existe plusieurs rapports sur l'évaluation des acides aminés dans l'hémolymph des insectes pendant le cycle de vie (Wyatt et Kalf, 1957, Cleg et Evans, 1961, Saito, 1963, Wimer, 1969, Duve, 1977 et Kim *et al.*, 1983). Des recherches ont également été faites par plusieurs chercheurs sur le niveau et le renouvellement du cholestérol chez différentes espèces d'insectes pendant le développement (Gilbert, 1964; Goodfellow et Gilbert, 1967 et Pant, 1984). Les connaissances sur la biosynthèse de l'acide ascorbique des insectes sont moins

avancées, bien qu'on ait pu imputer à cette vitamine plusieurs rôles dans la croissance, le développement, le métabolisme et la pathologie chez les insectes (Pant et Pandey, 1978 et Navon *et al.*, 1985).

Les études comparatives sur les modifications biochimiques en liaison avec le voltinisme sont relativement rares. Aussi dans cette étude, nous avons entrepris une recherche comparative séquentielle au cours de la nymphose tardive chez les variétés bivoltines et trivoltines de *A. mylitta*. Une telle recherche comparative peut faciliter la compréhension du métabolisme et des modifications biochimiques concomitantes subies par les variétés à voltinisme différent chez les vers à soie tasar et permettre ainsi de jouer sur la durée de leur développement, ceci en vue d'une exploitation commerciale.

MATERIELS ET METHODES

Les cocons vivants de ver à soie tasar *A. mylitta* bivoltins et trivoltins d'âge connu nous ont été fourni pour nos recherches par le State Tasar Research Farm, Durgapur, Mayurbhanja, Orissa. Des lots de chrysalides des deux sexes et des deux variétés ont été sacrifiés pour l'analyse biochimique à quinze jours d'intervalle, en février 1986 du 90 jour jusqu'au 30 jour avant l'émergence de la période de pré-éclosion. L'hémolymph des chrysalides est ponctionnée à partir de la partie abdominale basse.

L'hémolymph est ensuite centrifugée à 2000 tpm, pendant cinq minutes et le surnageant est transféré dans un tube à essai et conservé au réfrigérateur entre 6°C et 8°C.

L'évaluation en protéine totale de l'hémolymph est faite selon la méthode de Lowry *et al.* (1951) et l'absorption est mesurée à 750 nm.

Le dosage des acides aminés libres totaux est fait suivant la méthode décrite par Yem et Cocking (1955) avec la ninhydrine comme réactif, à 550 nm.

Les hydrates de carbone solubles totaux sont évalués selon la méthode de Yem et Willis (1954) avec l'anthrone comme réactif. L'absorption optique est mesurée à 620 nm.

Le dosage du cholestérol est fait suivant la réaction Libermann-Burchard, la méthode est celle de Plummer (1962) et l'absorption optique mesurée à 680 nm.

Le dosage de l'acide ascorbique a été mené suivant la méthode de Roe (1967) avec modification du temps et de la température d'incubation selon Tewari et Pandey (1964).

L'absorption optique est mesurée avec un spectrophomètre spekol-10 et toutes les valeurs sont calculées à partir des courbes étalons.

RESULTATS ET DISCUSSION

La phase nymphale de n'importe quel insecte holométabole est une phase de changement biochimique et morphogénétique lent et progressif. La synthèse et la dégradation de plusieurs composés cellulaires et moléculaires continuent pendant cette période, uniquement à partir des matériaux de réserve déjà présents, bien que ce stade paraisse être un stade de repos. Puisque l'hémolymph est le réservoir principal et sert de réserve pour les échanges de matériaux entre les tissus pendant l'histogenèse et l'histolyse, l'analyse des différents constituants biochimiques de l'hémolymph pendant cette étape du développement effectuée à intervalle régulier peut révéler les circuits métaboliques, le taux d'utilisation et la dégradation de ces constituants.

Les modifications du contenu en protéines dans l'hémolymph des chrysalides, aussi bien bivoltines que trivoltines, de *A. mylitta*, à différents âges sont indiquées Fig. 1. Le contenu en protéines totales dans les variétés bivoltines est de 51,4 mg/ml d'hémolymph et tombe à 35 mg/ml d'hémolymph au 30 jour avant l'émergence; alors que chez les trivoltins, il passe de 46,3 mg/ml h à 31,9 mg/ml.h.

Les variations de la concentration en protéines dans les deux variétés entre le jour de pré-émergence 90 et le jour 60, entre 90 et 30 et entre 60 et 30, sont hautement significatives (P,5 et .0,01). Pourtant, les différences entre les deux variétés, un jour donné, ne sont pas significatives.

Dans les deux variétés, la variation de concentration en protéines montre une tendance identique à celle observée chez *Bombyx mori* (Wyatt *et al.*, 1966), *Philosamia ricini* (Pant *et al.*, 1968) *Phorima regina* (Chen et Levenbook, 1966) et chez ces espèces (Sinha *et al.*, 1985). La baisse progressive de

la concentration en protéines au fur et à mesure que l'on approche de la fin de la nymphose peut être due à leur mobilisation et leur participation à la synthèse des structures adultes, c.a.d. l'histogénèse pour laquelle elles jouent un rôle très important (Chen et Levenbook, 1966).

Le contenu en acides aminés libres totaux augmente progressivement depuis PED 90 jusqu'au PED 30 dans l'hémolymphe des chrysalides bi et trivoltines (Fig 2). Il augmente de 2,1 mg/ml.h. à 16,067 mg/ml.h. dans la variété bivoltine et de 1,87 mg/ml.h. à 16,44 mg/ml.h. dans la variété trivoltine. Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les variétés bi et trivoltines; les différences entre les âges de pré-émergence sont significatives (P.001). L'évolution de la concentration en acides aminés libres totaux (FAA) en fin de nymphose dans les variétés bi et trivoltines montre une tendance inverse à celle de la concentration en protéines, c.a.d. une augmentation lente mais régulière pendant toute la période. Une tendance identique a été observée chez *P. ricini* (Pant, 1984). Puisque les chrysalides ne se nourrissent pas, cette augmentation de la concentration en acides aminés est peut être due à l'histolyse du tissu nymphal pour l'histogénèse des structures adultes. Chez les trivoltins, l'accumulation totale des acides aminés libres plus élevée, indiquant un taux plus rapide d'histolyse ou un taux plus lent du transport et de la conversion pour l'histogénèse.

Le niveau d'hydrates de carbone solubles totaux (TSC) suit la même tendance à la hausse dans les deux variétés à mesure que l'on se rapproche de l'émergence; bien qu'une légère tendance à la hausse soit observée dans les deux variétés, cela n'est pas statistiquement significatif (Fig 3). Chez les bivoltins, l'augmentation est de 0,846mg/ml à 2,628 mg/ml et chez les trivoltins de 0,698 mg/ml à 2,035 mg/ml.

Chez les deux variétés, l'évolution des hydrates de carbone suit la même tendance et corrobore les résultats d'études récentes sur *Bombyx mori* (Kim *et al.*, 1983) et *P. ricini* (Pant *et al.*, 1984).

Puisqu'il n'y a pas à ce stade, d'apport d'hydrates de carbone par la nourriture, une telle augmentation de la concentration en hydrates de carbone dans l'hémolymphe peut être due à la dégradation des hydrates de carbone stockés dans les différents tissus au dernier stade larvaire, ce qui donnerait un substrat adéquat qui répondrait à la demande d'énergie nécessaire jusqu'à l'émergence. La présence chez *Bombyx mori* d'hydrates de carbone en grande quantité dans les corps gras des larves du dernier âge et sa réduction drastique pendant la nymphose renforce cette supposition (Kim *et al.*, 1983). Les résultats sur les hydrates de carbone solubles totaux (TSC) indiquent que le taux de dégradation des hydrates de carbone stockés, la vitesse de pompage et d'utilisation, c.a.d. le métabolisme des hydrates de carbone en général, ne diffèrent pas beaucoup selon les variétés.

A mesure qu'on approche de l'émergence, le contenu en cholestérol total tombe rapidement; au PED 90, le contenu total chez les bivoltins est de 26 mg/100 ml et chez les trivoltins, il est de 28 mg/100 ml; il tombe à 10,6 et 12,5mg/100ml au PED 75 et diminue ensuite jusqu'à 7 et 6,5 mg/100 ml respectivement chez les bi et les trivoltins, après quoi un niveau constant se maintient (Fig. 4). Dans ces deux variétés, la courbe descendante du cholestérol pendant cette période, entre le PED 90 et 60 et le PED 90 et 30 est hautement significative (P.0,001), alors qu'entre le PED 60 et 30 elle n'est pas significative.

La baisse du niveau de cholestérol dans l'hémolymphe pendant la nymphose peut être due au pompage actif et à l'utilisation pendant l'histogénèse pour la formation des membranes en général et par les tissus stéroïdogéniques en particulier, pour lesquels il sert de précurseur (Chapman, 1987). Les résultats concernant le cholestérol chez *P. ricini* (Pant et Nautiyal, 1974) et chez *B. mori* (Saito *et al.*, 1963) concordent avec nos résultats.

Le contenu en acide ascorbique libre dans l'hémolymphe des deux variétés sont très bas. Au PED 75, la concentration en acide ascorbique a augmenté de 3,2 à 6,2 et de 3 à 3,8 mg/100 ml. chez les bi et trivoltins respectivement. Cette valeur tombe lentement à l'approche de l'émergence et atteint le niveau de 2 mg/ 100 ml chez les bivoltins et 2,4 mg/10 ml chez les trivoltins au PED 30. Les variations en acide ascorbique libre chez et entre les variétés ne sont pas statistiquement significatives, sauf entre PED 60 et 30 chez les bivoltins (P.0,5), (Fig. 5).

Chez les insectes, on a attribué à cette vitamine des rôles divers; ainsi, le manque d'acide ascorbique dans l'alimentation chez les insectes phytophages augmente la morbidité à l'époque de la mue (Chippendale *et al.*, 1965; Navon, 1978). L'hydroxylation des peptides (prolyl) et des lipides de la cuticule chez les insectes nécessite l'ascorbate comme cofacteur, bien qu'une dépendance de la

collagenèse vis à vis de la vitamine C n'ait pas été démontrée chez les lépidoptères (Blomquist et Jackson, 1979 ; François, 1980). On a observé chez les larves de *Menduca sexta* (Navon, 1985) un taux de croissance en diminution, l'élimination des pétoles fécales sèches, l'accumulation de l'eau dans les tissus et une consommation de nourriture accrue comme conséquence du retrait de l'acide ascorbique de l'alimentation. La baisse à l'approche de l'émergence peut être due à la mobilisation dans certaines cellules et tissus spécifiques pour préparer plusieurs réactions biochimiques. Pant et Pandey (1978) ont également observé une tendance identique chez *P. ricini*. Un même type de changement du contenu en acide ascorbique de l'hémolymph, chez les deux variétés suggère un schéma identique de mobilisation et d'utilisation de cette vitamine pendant le dernier stade de développement nymphal.

L'analyse des résultats n'indique pas de différences significatives dans le schéma métabolique général, en rapport avec les paramètres biochimiques étudiés pendant cette période, (c.a.d. PED 90 à PED 30) entre les chrysalides bi et trivoltines. Il semble donc que chaque type de voltinisme constitue une propriété spécifique déterminée par un phénomène génétique. Il peut s'adapter sous l'influence des facteurs d'environnement comme la photopériode, le taux d'humidité, etc., qui peuvent affecter les vitesses de divers processus sans modifier le schéma métabolique général. Le rôle des hormones / neurosecrétions et la présence possible / activation d'isozymes dans la modulation du voltinisme de ces espèces reste à étudier.

REMERCIEMENTS

les auteurs remercient Professeur M.C. Dash, Directeur, School of life Sciences, Lampalpur University, pour la mise à disposition des laboratoires, et Mr. B.K. Nayak, Research Officer, State Sericultural Research Station, Baripada, Orissa, pour son aide.

STUDIES ON THE ACTIVITY OF GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE IN SILKWORM EGGS

Geetha BALI and P.M. CHANDRASHEKAR Department of Zoology, Bangalore University, Bangalore 560 056, India.

The activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase which is known to be a key enzyme involved in pentose-phosphate pathway was examined in non-diapause eggs of silkworm. The activity of the enzyme was considerably higher in diapause eggs compared to the other two types of eggs, especially around the onset of diapause. It has been discussed that the pentose-phosphate pathway not only operates in diapause eggs but it may also be acting as an important source of reduced coenzymes needed for the formation of polyols at the onset of diapause.

Key words: Glucose-6-phosphate dehydrogenase, silkworm eggs, polyol, pentose-phosphate pathway.

INTRODUCTION

Glycogen is known to be converted into polyols at the onset of diapause in silkworm eggs (Chino, 1958). It has also been shown that polyol formation requires reduced coenzymes (Chino, 1960). Interestingly, the levels of reduced coenzymes were shown to increase with the onset of diapause (Chino, 1960; Ishikawa, 1966). Chino (1963) proposed that a temporary inactivation of the electron transport system is responsible for the accumulation of reduced coenzymes as well as for directing the formation of polyols. However, studies on respiratory enzymes (Ishikawa, 1966) have not yielded any positive evidence towards this hypothesis.

One important source of reduced coenzymes is the pentose-phosphate pathway which is known to operate in a number of insects (Cherfurka *et al.*, 1970). Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and 6-phosphogluconate dehydrogenase are the two key enzymes involved in this pathway. It has been observed that G6PDH activity is high wherever pentose-phosphate pathway is active and that active pentose-phosphate pathway is linked with reduced coenzyme requiring processes (Cherfurka, 1957). The operation of pentose-phosphate pathway in silkworm eggs has been demonstrated indirectly by measuring C6/C1 ratios and $^{14}\text{CO}_2$ released (Kageyama, 1976). Other than the studies of Kageyama and Ohnishi (1971) who discussed that pentose phosphate pathway operates during the early embryonic stages of non-diapause eggs, there have been no studies on the enzymes involved in this pathway. During the present studies, the activity of G6PDH has been examined as a measure of the pentose-phosphate pathway in both diapause and non-diapause eggs and the possibility of the involvement of this pathway in polyol formation examined to add to our knowledge on polyol formation in silkworm eggs at the onset of diapause.

MATERIAL AND METHODS

Bivoltine (NB4D2) and multivoltine (Pure Mysore) races of silkworm *Bombyx mori* L. maintained in the laboratory were used for the studies. Eggs laid on polythene sheets were used. To

prevent diapause, the eggs were treated with acid as described by Chandrashekar *et al.* (1987). The eggs were kept at $25 \pm 2^\circ \text{C}$ with relative humidity of 75%.

Enzyme preparation: A 10% W/V homogenate of the eggs was prepared in ice cold distilled water, centrifuged at 5500g at 0°C , filtered and the filtrate was used as the enzyme solution.

Determination of enzyme activity: the enzyme activity was determined according to Bergmayer (1963) using a Beckman Spectrophotometer (Model DU2). One ml of the assay mixture contained 0.05 M Triethanolamine hydrochloride buffer (pH 7.5), 0.2 M MgCl_2 , 0.025 M Glucose-6-phosphate substrate 0.02 M NADP and 0.1 ml of the enzyme extract. One unit of the enzyme activity was defined as that causing a change of 0.01 in the optical density at 340 nm per min. Protein concentration was determined by the method of Lowry *et al.* (1951)

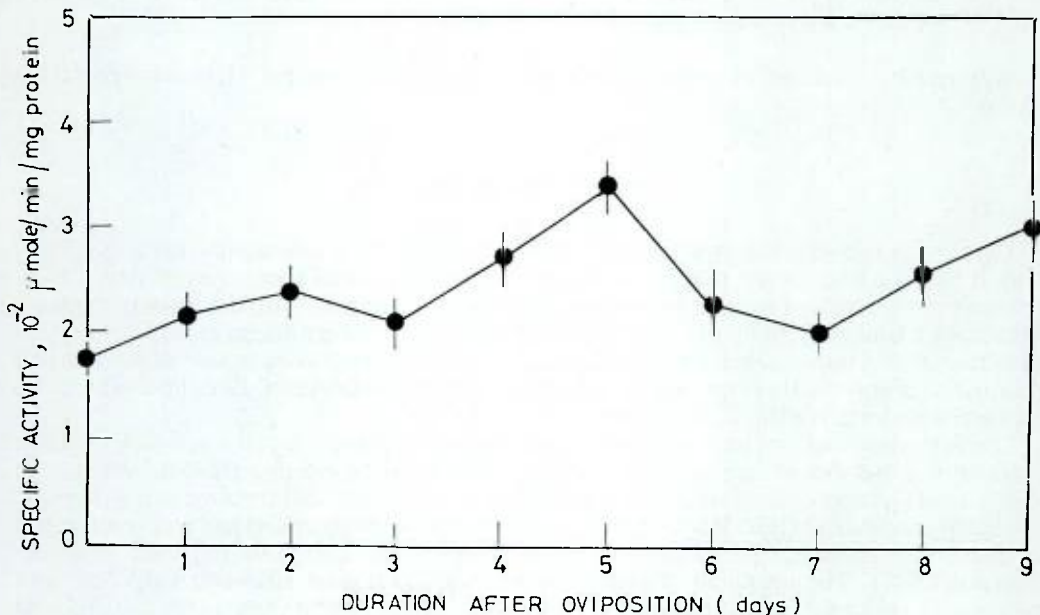


Fig. 1. G6PDH activity in non-diapause eggs. Mean values with standard deviations are presented. *Fig. 1. Activité G6PDH chez les oeufs non-diapausants. Les valeurs moyennes sont données avec les écarts-type.*

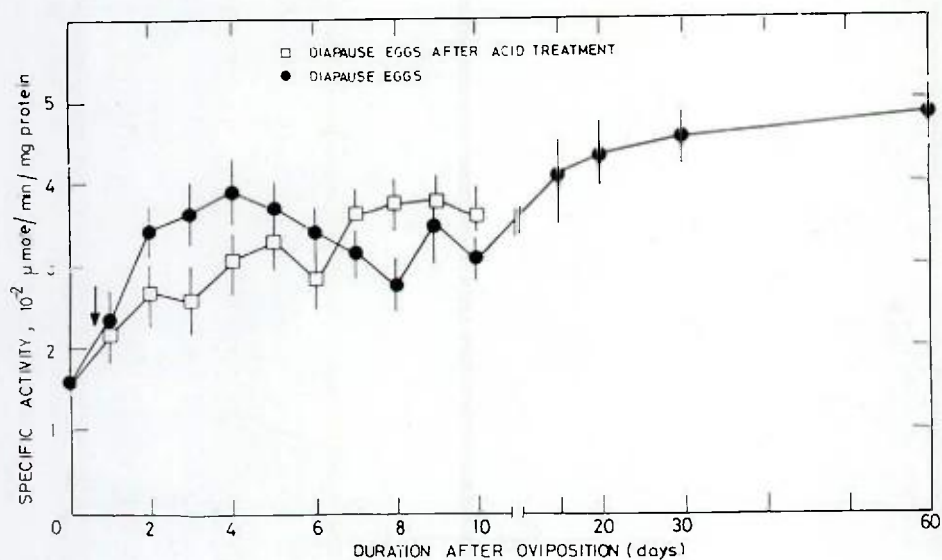


Fig. 2. G6PDH activity in diapause eggs and acid treated artificial non-diapause eggs. Mean values with standard deviations are presented. Number of samples tested: 4. Arrow indicates acid-treatment.

Fig. 2. Activité G6PDH chez les oeufs diapausants et chez les oeufs artificiellement non-diapausants traités à l'acide. Les valeurs moyennes sont données avec les écarts-type. Nombre d'échantillons testés : 4. La flèche indique le traitement à l'acide.

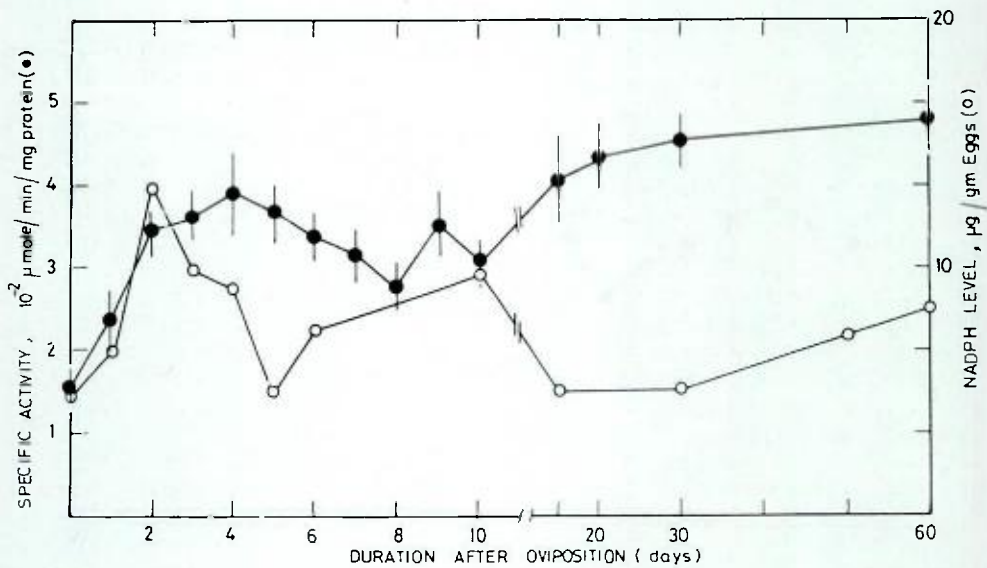


Fig. 3. G6PDH activity and levels of NADPH in diapause eggs. The results on NADPH levels are plotted from Ishikawa (1966).

Fig. 3. Activité G6PDH et niveaux NADPH chez les oeufs diapausants. Les résultats concernant les niveaux NADPH proviennent des travaux d'Ishikawa (1966).

RESULTS

The activity of G6PDH was quite high ranging between 0.02 to 0.03 moles throughout embryonic development in non-diapause eggs. The activity further increased during the 4th and 5th days following oviposition, decreasing on the 6th day and increasing again just prior to hatching (Fig. 1).

The activity of the enzyme in diapause eggs was nearly the same as that observed in non-diapause eggs at the time of oviposition. But soon after oviposition, the activity increased significantly attaining a high level (0.035 moles) on the 2nd day (Fig. 2.). The activity remained high upto the 5th day following which it decreased to some extent. After the 10th day, the activity started increasing progressively and on the 60th day, the activity was found to be more than 3 times of the activity observed at the time of oviposition.

In acid-treated artificial non-diapause eggs, though the activity increased as the embryonic development progressed, the striking increase seen in diapause eggs immediately following oviposition was not observed.

DISCUSSION

It is evident from the present results that the enzyme G6PDH is quite active in both non-diapause and diapause eggs. In non-diapause eggs, the pentose-phosphate pathway appears to be actively operating throughout embryonic development. The increase in the enzyme activity between 4th and 6th days of embryogenesis may be associated with increased rate of nucleic acid synthesis during the period, as discussed by Chippendale (1978). The increase in G6PDH activity just prior to hatching and also the observations of Kageyama and Ohnishi (1971) wherein the activities of several citric acid cycle enzymes increased prior to hatching indicate that there is a general increase in several glucose degrading processes during this period.

In diapause eggs, significant increase in G6PDH activity was seen following oviposition coinciding with the onset of diapause and polyol formation. This increase was suppressed following acid treatment since 24 hours later, the activity was much lesser than that observed in diapause eggs around this time, suggesting that the increase in the enzyme activity is associated with the onset of diapause. Further, when we compare the activity of G6PDH with the levels of NADPH demonstrated by Ishikawa (1966), it is seen that the two are complementary. The NADPH levels increased following oviposition remaining high during the first 4 days and again after 20 days (Fig. 3).

The present results thus lend support to the view expressed by Chino (1960) that reduced coenzymes accumulate during the initiation of diapause when polyols accumulate and that reduced coenzymes needed for the polyols arise from pentose-phosphate pathway. However, the significance of accumulation of reduced coenzymes in regulating polyol formation is not clear at the moment.

The enzyme activity was much higher in diapause eggs compared to non-diapause eggs and acid-treated artificial non-diapause eggs during the first 5 days following oviposition suggesting that pentose-phosphate pathway may be contributing in some way to the metabolism during the onset of diapause.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank the University Grants Commission, New Delhi, for financial assistance.

REFERENCES

- BERGMAYER H.U. (1963) Methods of enzymatic analysis. Academic Press, p. 736-743.
 CHANDRASHEKAR P.M., GEETHA BALI, SARANGI S.K. (1984) Diapause related changes in pyruvate level and lactic acid dehydrogenase activity in silkworm eggs. *Sericologia*, 24(4), 559-564.

CHEFURKA W. (1957) Oxidative metabolism of carbohydrates in insects. II. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in the house fly, *Musca domestica* L. *Enzymologia*, 18, 209-227.

CHINO H. (1958) Carbohydrate metabolism in the diapause egg of the silkworm *Bombyx mori*. II. Conversion of glycogen to sorbitol and glycerol during diapause. *J. Insect Physiol.*, 2, 1-12.

CHINO H. (1960) Enzymatic pathways in the formation of sorbitol and glycerol in the diapause egg of the silkworm *Bombyx mori* L. I. On the polyol dehydrogenase. *J. Insect Physiol.*, 5, 1-15.

CHINO H. (1963) Respiratory enzyme system of the *Bombyx* silkworm eggs in relation to the mechanism of the formation of sugar alcohols. *Arch. Biochem. Biophys.*, 102, 400-415.

CHIPPENDALE G.M. (1978) The functions of carbohydrates in insect life processes. In: "Biochemistry of Insects", ed. Rockstein M., Academic Press, New York, p. 1-55.

ISHIKAWA H. (1966) The level of nicotinamide nucleotide coenzyme in relation to diapause and development of the *Bombyx* silkworm egg. *J. Fac. Sci. Univ. Tokyo*, 11, 97-108.

KAGEYAMA T. (1976) Pathways of carbohydrate metabolism in the eggs of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*, 6, 507-511.

KAGEYAMA T., OHNISHI O. (1971) Carbohydrate metabolism in the eggs of the silkworm *Bombyx mori*. 1. Absence of phosphofructokinase in the diapausing egg. *Devel. Growth and Differentiation*, 13, 97-106.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N., FARR A., RANDALL R. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.

ETUDES SUR L'ACTIVITE DE LA GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE CHEZ LES OEUF DE VER A SOIE

Geetha BALI et P.M. CHANDRASHEKAR Department of Zoology, Bangalore University,
Bangalore 560 056, Inde.

L'activité glucose-6-phosphate déhydrogénase que l'on sait être une enzyme déterminante impliquée dans la voie des pentoses-phosphate, a été examinée chez des oeufs de ver à soie non-diapausants, diapausants et artificiellement non-diapausants par le traitement à l'acide. L'activité de l'enzyme est considérablement plus élevée chez les oeufs diapausants que chez les deux autres types d'oeufs, en particulier au démarrage de diapause. La voie des pentoses-phosphate pourrait agir non seulement chez les oeufs diapausants, mais aussi comme source importante de co-enzymes réduites nécessaires à la formation des polyols au moment du démarrage de la diapause.

INTRODUCTION

On sait que le glycogène est transformé en polyols au moment du démarrage de la diapause chez les oeufs de ver à soie (Chino, 1958) et que la formation de polyols nécessite des co-enzymes réduites (Chino, 1960). Il a été montré que les niveaux de co-enzymes réduites augmentent avec le démarrage de la diapause (Chino, 1960; Ishikawa, 1966). Chino (1963) a suggéré qu'une inactivation temporaire du système de transport des électrons soit à l'origine de l'accumulation des co-enzymes réduites et contrôle également la formation des polyols. Cependant, des études sur les enzymes respiratoires (Ishikawa, 1966) n'ont amené aucune preuve confirmant cette hypothèse.

La voie des pentoses-phosphate que l'on sait active chez un certain nombre d'insectes (Chefurka et al., 1970) est une source importante de co-enzymes réduites. La glucose-6-phosphate déhydrogénase (G6PDH) et la 6-phosphogluconate déhydrogénase sont les deux enzymes clés impliquées dans cette voie. On a observé que l'activité G6PDH est élevée partout où la voie des pentoses-phosphate est active et que la voie des pentoses-phosphate est liée aux processus nécessitant des enzymes co-réduites (Chefurka, 1957). Le fonctionnement de la voie des pentoses-phosphate chez les oeufs du ver à soie a été démontré indirectement en mesurant les rapports C_6/C_1 et le $^{14}CO_2$ libéré (Kageyama, 1976). A l'exception des études de Kageyama et Ohnishi (1971) qui ont discuté du fait que la voie des pentoses-phosphate est opérationnelle au cours des premiers stades embryonnaires des oeufs non-diapausants, aucune étude n'a été faite sur les enzymes impliquées dans cette voie. Nous avons étudié l'activité G6PDH comme mesure de l'activité de la voie des pentoses-phosphate chez les oeufs diapausants et non diapausants et la possibilité que cette voie soit impliquée dans la formation des polyols afin d'ajouter à nos connaissances sur la formation des polyols chez les oeufs du ver à soie au démarrage de la diapause.

MATERIEL ET METHODES

Nous avons utilisé pour ces études une race bivoltine (NB4D2) et une race polyvoltine (Pure Mysore) du ver à soie *Bombyx mori*, maintenues dans notre laboratoire. Nous avons employé des oeufs pondus sur des feuilles de polyéthylène. Pour éviter la diapause, les oeufs ont été traités à l'acide selon la méthode décrite par Chandrashekar et al. (1987). Les oeufs ont été maintenus à $25 \pm 2^\circ C$ avec une humidité relative de 75 %.

Préparation des enzymes : Un homogénat des oeufs à 10 % poids/volume est préparé dans de l'eau distillée glacée, centrifugé à 5 500 g à 0°C, filtré; le filtrat est utilisé comme solution d'enzymes.

Détermination de l'activité enzymatique : L'activité enzymatique est déterminée en suivant la méthode de Bergmayer (1963) au moyen d'un spectrophotomètre Beckman (modèle DU2). Un ml du mélange de dosage contient 0,05 M de solution tampon d'hydrochlorure de Triethanolamine (pH 7,5), 0,2 M de $MgCl_2$, 0,025 M de substrat (glucose-6-phosphate), 0,02 M de NADP et 0,1 ml de l'extrait d'enzyme. On définit comme une unité d'activité enzymatique ce qui provoque une variation de 0,01 de la densité optique à 340 nm par minute. La concentration en protéines est déterminée par la méthode de Lowry *et al.* (1951).

RESULTATS

L'activité de G6PDH est assez élevée et varie de 0,02 à 0,03 moles pendant le développement embryonnaire chez les oeufs non-diapausants. L'activité augmente ensuite pendant le 4^{ème} et le 5^{ème} jours suivant la ponte, diminue le 6^{ème} jour et diminue encore juste avant l'éclosion (Fig. 1).

L'activité de l'enzyme chez les oeufs diapausants est pratiquement la même que celle observée chez les oeufs non-diapausants au moment de la ponte. Mais aussitôt après la ponte, l'activité augmente de manière significative et atteint un niveau élevé (0,035 moles) le 2^{ème} jour (Fig. 2). L'activité reste élevée jusqu'au 5^{ème} jour puis elle diminue. Après le 10^{ème} jour, l'activité recommence à augmenter progressivement et au 60^{ème} jour, l'activité est trois fois plus importante que celle observée au moment de la ponte.

Chez les oeufs artificiellement non-diapausants traités à l'acide, bien que l'activité augmente au fur et à mesure du développement embryonnaire, on n'observe pas de très forte augmentation immédiatement après la ponte comme c'est le cas chez les oeufs diapausants.

DISCUSSION

Ces résultats montrent que l'enzyme G6PDH est assez active chez les oeufs non-diapausants comme chez les oeufs diapausants. Chez les oeufs non-diapausants, la voie des pentoses-phosphate apparaît très opérationnelle pendant tout le développement embryonnaire. L'augmentation de l'activité de l'enzyme entre le 4^{ème} et le 6^{ème} jour de l'embryogénèse est peut-être associée à l'augmentation du taux de synthèse des acides nucléiques pendant cette période, comme le suggère Chippendale (1978).

L'augmentation de l'activité G6PDH juste avant l'éclosion et aussi les observations de Kageyama et Ohnishi (1971) selon lesquelles l'activité de plusieurs enzymes du cycle de l'acide citrique augmente juste avant l'éclosion, montrent qu'il y a une augmentation générale de plusieurs processus de dégradation du glucose pendant cette période.

Chez les oeufs diapausants, l'augmentation significative de l'activité G6PDH observée après la ponte coïncide avec le démarrage de la diapause et la formation des polyols. Cette augmentation est supprimée par le traitement à l'acide car 24 heures après, l'activité est bien moins importante que celle observée chez les oeufs diapausants à ce moment-là. Ceci suggère que l'activité de l'enzyme est associée au démarrage de la diapause. De plus, quand on compare l'activité G6PDH avec les niveaux de NADPH observés par Ishikawa (1966), on voit que les deux sont complémentaires. Les niveaux NADPH augmentent après la ponte, restent élevés pendant les quatre premiers jours et augmentent de nouveau après 20 jours (Fig. 3).

Nos résultats confirment donc le point de vue exprimé par Chino (1960) selon lequel les co-enzymes réduites s'accroissent au début de la diapause quand les polyols s'accroissent et que les co-enzymes réduites nécessaires pour les polyols proviennent de la voie des pentoses-phosphate. Cependant le rôle joué par l'accumulation des co-enzymes réduites dans la régulation de la formation des polyols n'est pas clair pour le moment.

L'activité de l'enzyme est beaucoup plus élevée chez les oeufs diapausants que chez les oeufs non-diapausants et les oeufs artificiellement traités à l'acide pendant les cinq premiers jours qui suivent la ponte. Ceci suggère que la voie des pentoses-phosphate pourrait contribuer d'une certaine manière au métabolisme pendant le démarrage de la diapause.

REVUE SIGNALÉTIQUE

BIBLIOGRAPHY

INDICATIFS DES LANGUES UTILISÉES

LANGUAGE SYMBOLS USED

(Bg) Bulgare, Bulgarian.

(D) Allemand, German.

(F) Français, French.

(K) Coréen, Korean.

(Pt) Portugais, Portuguese.

(Ro) Roumain, Rumanian.

(C) Chinois, Chinese.

(E) Anglais, English.

(J) Japonais, Japanese.

(Pl) Polonais, Polish.

(R) Russe, Russian

(S) Espagnol, Spanish.

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

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

Sériciculture générale

General Sericulture

Le Bombyx mori . Partie 1 : il était une soie... Partie 2 : son architecture.

Bombyx mori. Part 1: history. Part 2: architecture.

ATOF M.

1988 Ecole d'Architecture de Nantes, travail fin d'études. (F)

Proceedings of the meeting on prospects of sericulture in tea and coffee plantations. 9-10 October 1987

Actes de la réunion sur les perspectives de la sériciculture intégrée aux plantations de thé et de café. (9-10 octobre 1987).

An.

1987 C.S.R.T.I. Mysore, 35 p. (E)

Mulberry silk production in Bangladesh.

La production de soie mûrier au Bangladesh.

BARMAN A.C., SARKER A.A.

Bangladesh Sericulture Research & Training Institute, Rajshahi, BANGLADESH.

1987 Indian Silk, 26(7), 10. (e)

Les Invertébrés, modèles en recherches biologiques : exemples du Ver à soie, des Rotifères, de la Daphnie.

Invertebrates used as model systems in biological research: the Silkworm, the Rotiferes, the Daphnia.

BUATOIS A.

Dpt de Biologie, I.U.T. 1, 69100 Villeurbanne, FRANCE.

1987 C.I.A.L., rapport 21ème stage, 36 p.

Amelioration of rural poverty through sericulture. A study of scheduled castes in Karnataka.

Amélioration du revenu des agriculteurs par la sériciculture Étude d'un programme au Karnataka.

GOVINDAIAH T.

Institute for Research in Social Sciences, Bangalore, INDIA.

1987 Indian Silk, 26(7), 7. (E)

Organisation of industrial bivoltine grainage for tropics.

Organisation du grainage industriel des races bivoltines en région tropicale.

JOLLY M.S.

C.S.R.T.I., Mysore 570 008, INDIA.

1986 C.S.R.T.I. Mysore, Project no. 3, 36 p. (E)

No export sans quality.

Pas d'exportation sans qualité.

KOSHY T.D.

1987 Indian Silk, 26(7), 27. (E)

Crop losses in West Bengal - Reasons and remedies.

Pertes de production au West Bengal - Causes et remèdes.

MATHUR S.K., JAYASWAL K.P.

Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore, INDIA.

1987 Indian Silk, 26(7), 17. (E)

Sericulture practices for the hilly areas of South India.

Manuel de sériciculture pour les régions montagneuses du sud de l'Inde.

NARASIMHANNA M.N., KANYADI N.M., RAVIKUMAR C., BASAVARAJU H.K.

National Silkworm Seed Project, Bangalore, INDIA.

1987 Central Silk Board, Bangalore, 32 p. (E)

Scope for sericulture in Karnataka.

Perspectives pour la production de soie cri au Karnataka.

REDDY D.N.R., KOTIKAL Y.K., NAGALAKSHMAMMA K.

Dpt of Sericulture, University of Agricultural Sciences, G.K.V.K., Bangalore, INDIA.

1987 Indian Silk, 26(7), 34. (E)

Studies on the consultation for an engineer of filature. I. On the extreme analysis.

Etudes sur le rôle de conseil de l'ingénieur en filature. I. Analyse extrême.

SHIMIZU S., KATSUNO M., SHIMAZAKI A.

1987 Rep. Silk Sci. Res. Inst. (Japan), 35, 89-98. (J,e)

Chemistry and sericulture.

La chimie et la sériciculture.

SINGHVI N.R., et al.

Central Sericultural Research & Training Institute, Mysore, INDIA.

1987 Indian Silk, 26(7), 24. (E)

Cocoon crop results of bivoltine hybrids reared with local mulberry variety and raised under rainfed conditions.

Résultats obtenus pour la récolte de cocons d'hybrides bivoltins élevés sur une variété locale de mûrier en culture non-irriguée.

VENUGOPALA PILLAI S., RAJAN M.V., SINDAGI S.S.

Central Sericultural Research & Training Institute, Mysore, INDIA.

1987 Indian Silk, 26(7), 12. (E)

Studies on correlation between the production of silkworm and mulberry and the meteorological factors. 1.

Etudes sur les relations entre la production séricicole et les facteurs météorologiques. 1.

YE C., et al.

1987 Canye Kexue, 13(3), 169. (C)

Mûrier

Mulberry

Collection, conservation and evaluation of mulberry (*Morus* spp.) germplasm.

Collection, conservation et estimation de la banque de gènes de mûrier (*Morus*).

An.

1986 *C.S.R.T.I., Mysore*, 43 p. (E)

The studies on cytogenetics of *Morus* L. plants. 2. Karyotype analysis of four varieties (species) of *Morus* L.

Etudes cytogénétiques de *Morus* L. 2. Analyse du caryotype de quatre variétés (espèces) de *Morus* L.

CHU R., et al.

1987 *Canye Kexue*, 13(3), 129. (C,e)

Studies on the constituents of the water extract of the root of mulberry tree (*Morus bombycis*).

Etudes sur les composants de l'extrait aqueux de la racine du mûrier (*Morus bombycis*).

DAIGO K., INAMORI Y., TAKEMOTO T.

1986 *Chem. Pharm. Bull.*, 34, 2243-2246. (E)

Natural and artificial mulberry hybrids comparison.

Comparaison des hybrides naturels et artificiels du mûrier.

FONSECA, A. da Silveira, FONSECA, T. Canto, SCHAMMASS, E.

Aparecida Instituto de Zootecnia, C.P. 60, 13460 Nova Odessa, SP, BRAZIL.

1986 *B. Industr. anim., Nova Odessa, SP*, 43(2), 367-373. (Pt,e)

Absolute configuration of Diels-Alder type adducts from the *Morus* root bark.

Configuration absolue des adduits de type Diels-Alder provenant de l'écorce de la racine de mûrier.

HANA Y., KOHNO H., FUKAI T., NOMURA T.

1986 *Tennen Yuki Kagobutsu toronkai Koen Yoshishu* 28th, 1-8. (J)

Development of a program for the estimation of light-interception in mulberry fields.

Mise au point d'un programme pour évaluer l'interception de la lumière dans les plantations de mûrier.

ITO D.

Sericultural Exp. Station, Tsukuba, Ibaraki 305, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(6), 474-482. (J,e)

Package of practices for mulberry cultivation in West Bengal.

Méthodes de culture du mûrier au West Bengal.

KABIR N.E.

Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore, INDIA.

1987 *Indian Silk*, 26(7), 19. (E)

Comparison of the growth characteristics of some mulberry species (*Morus* spp.) grown in Payakumbuh, West Sumatra.

Comparaison des critères de croissance chez quelques espèces de mûrier (*Morus*) cultivées à Payakumbuh, Sumatra ouest.

KAOMINI, SAMSIJAH.

Pusat Penelitian dan Pengembangan Hutan, Bogor, INDONESIA.

1986 *Buletin Penelitian Hutan (Indonesia)*, 480, 27-35. (In,e)

Effects of nickel on the growth rate of mulberry seedling and a few crop in the serpentine soil. Effets du nickel sur le taux de croissance des plants de mûrier et d'autres plants dans un sol de serpentine.

KITANO M.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(6), 531-532. (J)

Use of winter buds as scion collected from mulberry (*Morus alba* L.) graftages.

Emploi des bourgeons d'hiver pris sur des mûriers greffés (*Morus alba* L.) pour former des scions.

LEE J.H., KIM D.I., JEONG H.J., LEE W.C.

Chungbuk Provincial Sericultural Experiment Station, KOREA.

1987 *Korean J. Seric. Sci.*, 29(2), 1-6. (K,e)

The lesions formation of mulberry dieback on different burying by the artificial infection.

Formation des lésions dues à la maladie du dépérissement du mûrier obtenues par infection artificielle sur différents enfouissements.

MATSUNO M., DOI N., NISHINA S.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(4), 353-354. (J)

Increase in yield of mulberry protoplasts by treatment with chemical substance.

Augmentation de la productivité des protoplastes du mûrier par un traitement chimique.

OHNISHI T., KIYAMA S.

Fac. of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Kyoto 606, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(5), 407-410. (J,e)

Effect of changes of the temperature, pH and Ca ion concentration of the solutions used for protoplast fusion on the improvement of the fusion ability of mulberry population.

Effet des variations de température, de pH et de concentration d'ions Calcium dans les solutions utilisées pour la fusion des protoplastes sur l'amélioration de la capacité de fusion d'une population de mûrier.

OHNISHI T., KIYAMA S.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(5), 418-421. (J,e)

On the soil compaction with tractor traffic in mulberry field.

Compaction du sol par le passage du tracteur dans les plantations de mûrier.

SUZUKI M.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(5), 445-446. (J)

Spring burst of dormant buds on low-pruned stems of mulberry.

Débourrement au printemps des bourgeons en sommeil sur les troncs de mûrier en taille basse.

SUZUKI T., FUJIBAYASHI H., KOHNO K.

Fac. of Textile Science, Kyoto Kogei-Sen-i University, Kyoto 606, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(6), 505-510. (J,e)

Effects of pinching and defoliation on lateral bud growth of mulberry shoots.

Effets de la cueillette et de la défoliation sur la croissance du bourgeon latéral des branches de mûrier.

SUZUKI T., KOHNO K.

Fac. of Textile Science, Kyoto Kogei-Sen-i University Matsugasaki, Kyoto 606, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(4), 318-322. (J,e)

Coupled transport of picrate through CA-solvent polymer membrane made from mulberry xylem.

Transport couplé du picrate à travers la membrane de polymère fabriquée à partir du xylème du mûrier.

URITA S., IKEDA S., SUGIURA M.

Fukushima Sericultural Experiment Station, Date-gun, Fukushima 960 07, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(4), 313-317. (J,e)

Studies on the physical properties of cellulose acetate membranes made from mulberry xylem.

Etudes sur les propriétés physiques des membranes d'acétate de cellulose fabriquées à partir du xylème de mûrier.

URITA S., KITAMURA A., SHIBAMOTO A.

Fukushima Sericultural Experiment Station, Date-gun, Fukushima 960 07, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(4), 292-299. (J,e)

The ionic permeability through the cellulose membrane made from mulberry xylem.

Perméabilité ionique à travers la membrane de cellulose formée à partir du xylème de mûrier.

URITA S., OTA T., SUGIURA M.

Fukushima Sericultural Exp. Station, Yamagawa-machi, Date-gun, Fukushima 960-07, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(5), 364-368. (J,e)

Discussion on law of fluoride absorption and accumulation in different mulberry varieties.

Discussion sur la loi d'absorption et d'accumulation des fluorures chez différentes variétés de mûrier.

WANG J., et al.

1987 *Canye Kexue*, 13(3), 133. (C)

Dormancy of winter buds of the Japanese mainland-mulberries planted in Irimote Island (Okinawa Prefecture).

Dormance des bourgeons d'hiver des mûriers japonais plantés dans l'Ile d'Irimote (Préfecture d'Okinawa).

YAHIRO M., SHINJO T.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(6), 537-538. (J)

Relationship between the growth of axillary buds and the content of cytokinins in the leaves after cutting in mulberry.

Relation entre la croissance des bourgeons axillaires et le contenu en cytoquinines chez les feuilles après la taille.

YANAGISAWA Y., SHIOIRI H.

Fac. of Textile Science & Technology, Shinshu University, Ueda 386, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(5), 390-393. (J,e)

Response of each days after emergence of yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris* Pascoe to the attractant from mulberry stumps.

Réponse du scarabée *Psacotha hilaris* Pascoe déterminée pour chaque jour après l'émergence envers la substance attractive provenant des souches de mûrier.

YOKOIN., YOSHI T.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(6), 527-528. (J)

MULBERRY

Enzymatic-chemical pulping of bast fibers of paper mulberry by alkaline pectolytic enzyme from *Erwinia aroideae*.

Réduction en pâte des fibres du liber du mûrier à papier par une enzyme pectolytique alcaline provenant de *Erwinia aroideae*.

YOO T., HAN S., CHOI W.

1987 Palpu Chongi Gisul, 19(1), 9-17. (E)

B.mori: élevage, nutrition, pathologie

B.mori: rearing, feeding, pathology

Genetical relationship between nonsusceptibilities of the silkworm, *Bombyx mori*, to two densovirus nucleosis viruses.

Relations génétiques entre la non-sensibilité du ver à soie *Bombyx mori* à deux virus de la densovirus nucléose.

ABE H., WATANABE H., EGUCHI R.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(5), 443-444. (J)

In vitro encystation of *Leptomonas* sp., an entomopathogenic flagellate of the silkworm, *Bombyx mori* L.

Enkystement in vitro de *Leptomonas* sp., un flagellé du ver à soie *Bombyx mori* L.

ABE Y.

Tropical Agriculture Research Center, Yatabe, Ibaraki 305, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(5), 428-430. (J,e)

Studies on the application of an aseptic rearing method for cocoon production using a pure line of silkworms.

Etudes sur l'application d'une méthode d'élevage aseptique pour la production de cocons en utilisant une lignée pure de ver à soie.

AZUMA M., MATSUBARA F.

Dpt of Biology, Fac. of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Kyoto, JAPAN.

1987 *Bull. Apparel Science Res. Center (Kyoto)*, 6, 15-21. (J,e)

Immunoperoxidase-staining methods for discrimination of microsporidian spores in the pebrine inspection of silkworm mother moths.

Méthodes de marquage par immunopéroxydase pour la discrimination des spores de microsporidiens lors du contrôle de la pébrine chez le papillon femelle du ver à soie.

HAN M., WATANABE H.

Fac. of Agriculture, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(5), 431-435. (J,e)

Preliminary investigation on pathogenic species of fungous diseases of the silkworm (*Bombyx mori*) in environment.

Recherche préliminaire sur les espèces de champignons pathogènes du ver à soie (*Bombyx mori*) dans l'environnement.

HUANG K., et al.

1987 *Canye Kexue*, 13(3), 155. (C)

Toxic effect of crystal protein from *Bacillus thuringiensis* on *Bombyx mori* and *Mamestra brassicae*.

Effets toxiques de la protéine cristalline provenant de *Bacillus thuringiensis* sur *Bombyx mori* et *Mamestra brassicae*.

IIZUKA T., GOTO C.

Lab. of Sericology, Fac. of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(5), 379-384. (E)

Histopathology of silkworm larvae affected with dietary arsenete.

Histopathologie des larves de ver à soie traitées avec de l'arséniate dans leur alimentation.

IMAI S., YOSHII S.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(6), 511-515. (J)

Experiment of the formulation for the viral pesticide of nuclear polyhedrosis virus of the fall webworm, *Hyphantria cunea* Drury.

Expérience de formulation d'un pesticide viral contre le virus de la polyédrose de la tisseuse *Hyphantria cunea* Drury.

JIN B.R., KIM K.Y., KANG S.K.

College of Agriculture, Seoul National University, KOREA.

1987 *Korean J. Seric. Sci.*, 29(2), 51-57. (K,e)

Elimination of contaminating infectious flacherie virus from the purified preparations of *Bombyx densonucleosis* virus.

Elimination du virus de la flacherie infectieuse dans les préparations purifiées du virus de la denso-nucléose de *Bombyx*.

KAWASE S., SEKI H.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(4), 355-356. (J)

Inhibitory effect of high temperature on the multiplication of flacherie virus in the silkworm, *Bombyx mori* L.

Effet inhibiteur des températures élevées sur la multiplication du virus de la flacherie chez le ver à soie *Bombyx mori* L.

KIM K.Y., KANG S.K.

Sericultural Experiment Station, Suwon 170, KOREA.

1987 *Korean J. Seric. Sci.*, 29(2), 44-50. (K,e)

Improved method of purification of the infectious flacherie virus and the *Bombyx densonucleosis* virus.

Méthode améliorée de purification du virus de la flacherie infectieuse et du virus de la denso-nucléose de *Bombyx*.

NAKAGAKI M., TAKEI R., NAGASHIMA E.

Fac. of Textile Science, Shinshu University, Ueda 386, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(4), 338-342. (J,e)

Stifling methods suited to our cocoons and reelers.

Méthodes pour l'étouffage des cocons adaptées aux conditions indiennes.

SHAMACHARY

Central Sericultural Research & Training Institute, Mysore, INDIA.

1987 *Indian Silk*, 26(7), 22. (E)

Measurements of digestivity and metabolic energy of artificial diets of the silkworm, *Bombyx mori*.

Mesures de la digestibilité et de l'énergie métabolique des aliments artificiels du ver à soie *Bombyx mori*.

SHIMOGORI Y., URANO M.

1987 J. Seric. Sci. Jpn., 56(4), 330-337. (J)

Egg transmission in silkworm larvae treated with insecticides.

Transmission dans les oeufs d'insecticides administrés aux larves de ver à soie.

YAMANOI F.

Matsumoto Branch, Sericultural Exp. Station, Matsumoto, Nagano 390, JAPAN.

1987 J. Seric. Sci. Jpn., 56(6), 463-466. (J,e)

Studies on oral infection of larvae of the silkworm, Bombyx mori, with Beauveria bassiana.

Etudes sur l'infection par la voie orale avec Beauveria bassiana des larves du ver à soie Bombyx mori.

YANAGITA T.

Saitama-ken Sericultural Experiment Station, Kumagaya 360, JAPAN.

1987 J. Seric. Sci. Jpn., 56(4), 279-284. (J,e)

Histological observation of larvae of the silkworm, Bombyx mori, orally infected with Beauveria bassiana.

Observation histologique des larves du ver à soie Bombyx mori infectées par la voie orale avec Beauveria bassiana.

YANAGITA T., IWASHITA Y.

1987 J. Seric. Sci. Jpn., 56(4), 285-291. (J,e)

Séricigènes non-mûrier: élevage, nutrition, pathologie

Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology

Effect of host plant on the cocoon weight in *Samia cynthia ricini* (Lepidoptera, Saturniidae).
Effets de la plante hôte sur le poids du cocon chez *Samia cynthia ricini* (Lepidoptera, Saturniidae).
HOQUE, A.A.M. Musaddarul, KHAN, Aatur Rahman
Dpt of Zoology, Rajshahi University, Rajshahi, BANGLADESH.
1987 *Acta Entomol. Bohemoslov.*, 84(5), 397-398. (E)

Artificial rearing oak silkworm stems from the central and southern mountain areas of Shangdong Province.
Elevage sur aliment artificiel de souches de ver à soie du chêne dans les zones de montagne du sud et du centre de la Province de Shangdong.
HUA D.
1987 *Canye Kexue*, 13(3), 180. (C)

Inhibition effects of antibacterial peptide D from the Chinese oak silkworm (*Antheraea pernyi*) pupae.
Effets inhibiteurs du peptide D antibactérien provenant des chrysalides du ver à soie du chêne chinois (*Antheraea pernyi*).
HUANG Z., ZHENG T., LIANG Y., QU X.
1987 *Kexue Tongbao (Foreign Lang. Ed.)*, 32(9), 629-632. (E)

Carboxyl ester hydrolase (E.C.3.1.1.1) in *Antheraea mylitta* larval tissues.
La carboxyl ester hydrolase (E.C.3.1.1.1) dans les tissus larvaires chez *Antheraea mylitta*.
MEHROTRA K.N., PHOKELA A.
1987 *Curr. Sci.*, 56(11), 553-555. (E)

The number of chromosomes of wild mulberry silkworm, *Bombyx mandarina*, in Korea.
Nombre de chromosomes chez le ver à soie sauvage du mûrier, *Bombyx mandarina*, en Corée.
SEONG S., KIM K.M., KIM S.E., LEE S.M.
Suwon University, KOREA.
1987 *Korean J. Seric. Sci.*, 29(2), 82-83. (K,e)

Vers à soie: génétique

Silkworms: genetics

Characterisation of Bombyx and related insect cell lines by gel electrophoresis.

Caractérisation des lignées cellulaires de Bombyx et d'insectes de même famille par électrophorèse sur gel.

ASAOKA K.

Matsumoto Branch, Sericultural Exp. Station, Matsumoto, Nagano 390, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(5), 411-417. (J,e)

Selective recombination system in Bombyx mori. 1) Chromosome specificity of the modification effect.

Système de recombinaison sélectif chez Bombyx mori. 1) Spécificité chromosomique de l'effet de modification.

EBINUMA H.

1987 *Genetics*, 117, 521-532.

Components of silk proteins and their gene loci in the silkworm.

Composants des protéines de soie et locus de leurs gènes chez le ver à soie.

GAMO T.

Dpt of Mol. Biology, Institute of Agrobiological Resources, Yatabe, Ibaraki 305, JAPAN.

1987 *JARQ*, 21(1), 53-58. (E)

Breeding to improve some of the economic characters of the sex-limited dark egg color strains.

Croisement pour améliorer quelques caractères économiques des souches à oeufs de couleur foncée (caractère lié au sexe).

LEE S.M., KIM S.E., KIM K.M., PARK N.S.

1987 *Korean J. Seric. Sci.*, 29(2), 24-30. (K,e)

Genetical studies on the dominant spherule-cell minus mutation in the silkworm, Bombyx mori.

Etudes génétiques sur la mutation dominante cellule sphérule chez le ver à soie Bombyx mori.

NINAKI O., DOIRA H., CHIKUSHI H.

Sericultural Exp. Station, Yatabe, Ibaraki 305, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(5), 374-378. (J,e)

Further studies on non-preference mutations in the silkworm. (6) Determination of the locus of a sex-linked non-preference mutant gene, Bt.

Etudes complémentaires sur les mutations non-préférentielles chez le ver à soie. (6) Détermination du locus d'un gène mutant non-préférentiel lié au sexe, Bt.

OHNUMA A., TAZIMA Y.

Institute of Silkworm Genetics & Breeding, JAPAN.

1987 Rep. Silk Sci. Res. Inst. (Japan), 35, 17-22. (J,e)

Genetical studies on the oe translucent mutant in the silkworm.

Etudes génétiques sur le mutant translucide oe chez le ver à soie.

QIN J.

1987 Canye Kexue, 13(3), 183. (C,e)

The genetic analysis of quantitative characters in the silkworm by diallel cross of four inbred lines differing in silk yield.

Analyse génétique des caractères quantitatifs chez le ver à soie par croisement diallétique de quatre lignées consanguines ayant une productivité de soie différente.

SOHN K.W., et al.

Sericultural Experiment Station, Rural Development Administration, KOREA.

1987 Korean J. Seric. Sci., 29(2), 7-14. (K,e)

Genetics and selection of silkworm in the USSR.

Génétique et sélection du ver à soie en URSS.

STRUNNIKOV V.A.

1987 Genetika, 23, 1770. (R)

Further studies on non-preference mutations in the silkworm. (4) A non-preference mutant strain, D5, which is presumably controlled by cytoplasmic factor(s).

Etudes complémentaires sur les mutations non-préférentielles chez le ver à soie. (4) Une souche mutante non-préférentielle, D5, probablement contrôlée par un(des) facteur(s) cytoplasmique(s).

TAZIMA Y., OHNUMA A.

Institute of Silkworm Breeding & Genetics, JAPAN.

1987 Rep. Silk Sci. Res. Inst. (Japan), 35, 1-6. (J,e)

Further studies on non-preference mutations in the silkworm. (5) Modifiers that affect the expression of non-preference character.

Etudes complémentaires sur les mutations non-préférentielles chez le ver à soie. (5) Modificateurs qui affectent l'expression d'un caractère non-préférentiel.

TAZIMA Y., OHNUMA A., TANAKA Y.

Institute of Silkworm Genetics & Breeding, JAPAN.

1987 Rep. of Silk Sci. Res. Inst. (Japan), 35, 7-16. (J,e)

Breeding of new double hybrid race (Chun.Lei x Zhen.Zhu). of silkworm.

Sélection d'une nouvelle race bihybride (Chun. Lei x Zhen.Zhu) du ver à soie.

WU Y., et al.

1987 Canye Kexue, 13(3), 150. (C,e)

Origin and differentiation of Bombyx mori.

Origine et différenciation de Bombyx mori.

YOSHITAKE N., JIANG Y.

1987 Canye Kexue, 13(3), 182. (C)

Vers à soie: physiologie, biochimie

Silkworms: physiology, biochemistry

Comparison of U-small nuclear RNA levels in tissues of the silkmoth *Bombyx mori*.

Comparaison des niveaux du petit ARN nucléaire U chez les tissus du papillon de *Bombyx mori*.

ADAMS D.S., HERRERA R.J.

1987 *Comp. Biochem. Physiol.*, 88, 415. (E)

Protein and glycogen contents of the accessory reproductive glands of the male and female silk moths *Bombyx mori* before and after mating.

Contenu en protéines et glycogène des glandes sexuelles secondaires des papillons mâle et femelle de *Bombyx mori* avant et après l'accouplement.

BHOSALE S.H., KALLAPUR V.L., VENKATESH K.

1987 *Entomon.*, 12(1), 7-11. (E)

Ecdysteroids during embryonic development of the oak silkworm (*Antheraea pernyi*).

Les ecdystéroïdes pendant le développement embryonnaire du ver à soie du chêne (*Antheraea pernyi*).

CHEN E., et al.

1987 *Kexue Tongbao (Foreign Lang. Ed.)*, 32(2), 141-142. (E)

Some biochemical changes of the fluorosis silkworm, *Bombyx mori*.

Quelques changements biochimiques dus à la fluorose chez le ver à soie *Bombyx mori*.

CHEN Z.

1987 *Canye Kexue*, 13(3), 164. (C)

Studies on the effect of cadmium on the physiology of silkworm, *Bombyx mori* L. II. With reference to the change of total proteins

and activities of GOT and GPT in haemolymph of fifth instar silkworm larvae.

Etudes sur l'effet du cadmium sur la physiologie du ver à soie *Bombyx mori* L. II. Variations des protéines totales et activité GOT et GPT chez l'hémolymph des larves au 5ème âge.

CHOI J.S.

1987 *Korean J. Seric. Sci.*, 29(2), 38-43. (K,e)

Studies on the effect of cadmium on the physiology of silkworm, *Bombyx mori* L. I. With reference to the development of the various organs and tissues.

Etudes sur l'effet du cadmium sur la physiologie du ver à soie *Bombyx mori* L. I. Développement des divers organes et tissus.

CHOI J.S.

Dpt of Sericulture, College of Agriculture, Dong-A University, KOREA.

1987 *Korean J. Seric. Sci.*, 29(2), 31-37. (K,e)

Partial purification of glycoprotein from heads of adults of the silkworm, *Bombyx mori* and their physiological activity.

Purification partielle des glycoprotéines provenant des têtes d'adultes du ver à soie *Bombyx mori* et leur activité physiologique.

FUGO H.

1987 *Nippon Oyo Dobutsu Konchu Gakkaishi*, 31, 194-200. (J)

Prothoracicotropic hormone has an insulin like tertiary structure.

L'hormone prothoracicotrope a une structure tertiaire ressemblant à l'insuline.

JHOTI H., et al.

1987 *FEBS Letters*, 219, 419-425. (E)

Anti-ecdysteroid action of some imidazole derivatives on pupal-adult development of the silkworm *Bombyx mori*.

Action anti-ecdystéroïde de certains dérivés d'imidazole sur le développement nympho-adulte du ver à soie *Bombyx mori*.

KADONO-OKUDA K., KUWANO E., ETO M., YAMASHITA O.

1987 *Appl. Entomol. Zool.*, 22, 370-379. (E)

Inhibitory action of an imidazole compound on ecdysone synthesis in prothoracic glands of the silkworm *Bombyx mori*.

Action inhibitrice d'un composé imidazole sur la synthèse de l'ecdysone chez les glandes prothoraciques du ver à soie *Bombyx mori*.

KADONO-OKUDA K., KUWANO E., ETO M., YAMASHITA O.

1987 *Dev. Growth & Diff.*, 29, 527. (E)

Induction of dauer larvae by a juvenile hormone analogue and their response to ecdysteroids in the silkworm, *Bombyx mori*.

Induction de larves décérébrées par un analogue de l'hormone juvénile chez le ver à soie *Bombyx mori* et leur réponse aux ecdystéroïdes.

KAJIURA Z., KADONO-OKUDA K., YAMASHITA O.

Fac. of Agriculture, Nagoya University, Chikusu, Nagoya 464, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(5), 398-406. (E)

Ecdysteroid titer and wing development during the pupal-adult transformation of *Bombyx mori*.

Titre en ecdystéroïdes et développement des ailes au cours de la transformation nympho-adulte de *Bombyx mori*.

KAWASAKI H., KIGUCHI K., AGUI N., IWASHITA Y.

Fac. of Agriculture, Utsunomiya University, Mine, Utsunomiya 321, JAPAN.

1986 *Zoological Science*, 3, 301-308. (E)

Structure of isolated sensilla and sensory neurons in vitro: observations on developing silkworm antennae.

Structure de sensilles et de neurones sensoriels isolés in vitro : observations sur les antennes du papillon au cours du développement.

KEIL T.A.

1987 *Cell and Tissue Research*, 250, 543-549. (E)

The index kinetics of H-3-thymidine labeled nuclei in developing muscle fibers of the silkworm *Bombyx mori* L.

Cinétiques des noyaux marqués à la H-3-thymidine chez les fibres musculaires en développement du ver à soie *Bombyx mori* L.

KOMAROV S.A.

1987 *Tsitologiya SSSR*, 29, 845. (R)

Electron microscope study of developing muscle fibers of the silkworm *Bombyx mori*.

Etude au microscope électronique des fibres musculaires du ver à soie *Bombyx mori* au cours du développement.

KOMAROV S.A.

1987 *Tsitologiya*, 29, 884. (R)

Recent topics on antijuvenile hormone agents.

Résultats récents sur les agents de type hormone antijuvenile.

KUWANO E.

1987 *Shokubutsu Boeki*, 41(8), 392-397. (J)

Study on the DNA polymerase isolated from the midguts of NPV infected silkworm, *Bombyx mori*.

Etude sur l'ADN polymérase isolée à partir de l'appareil digestif du ver à soie *Bombyx mori* infecté par le virus de la polyédrose nucléaire.

LIN L., WU A., WANG M., SUN Y.

1985 *Bingdu Xuebao*, 1(2), 165-170. (C)

Hyperproduction of polyhedrin-IGF II fusion protein in silkworm larvae infected with recombinant *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus.

Hyperproduction de protéine de fusion polyhédrine-IGF II chez les larves du ver à soie infectées avec le virus de la polyédrose nucléaire recombinant de *Bombyx mori*.

MARUMOTO Y., et al.

Res. Instit., Daiichi Seiyaku Co Ltd, 16-13 Kitakasai, 1-chome, Edogawa-ku, Tokyo 134.

1987 *J. General Virology*, 68, 2599-2606. (E)

Use of the silkworm, *Bombyx mori*, and an insect baculovirus vector for high level expression and secretion of biologically active mouse interleukin 3.

Utilisation du ver à soie *Bombyx mori* et d'un vecteur baculovirus d'insecte pour l'expression à haut niveau et la sécrétion d'interleukine 3 de souris biologiquement active.

MIYAJIMA A., et al.

1987 *Gene*, 58, 273-281. (E)

Effect of thyroxine on the growth and development of the silkworm, *Bombyx mori*.

Effet de la thyroxine sur la croissance et le développement du ver à soie *Bombyx mori*.

NARASIMHA MURTHY C.V., HURKADLI H.K., THYGARAJA B.S.

Central Sericulture Research & Training Institute, Mysore 570 08, INDIA.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(4), 351-352. (E)

An energy supplying pathway for sperm maturation arginine degradation cascade.

Un voie fournissant de l'énergie pour la maturation du sperme lors de la dégradation en cascade de l'arginine.

OSANAI M.

1987 *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 32(5), 417-430. (J)

Sex-chromatin observation in cell nuclei of tissues of the silkworm moth, *Bombyx mori*.

Observation de la chromatine sexuelle chez les noyaux de cellules du papillon du ver à soie *Bombyx mori*.

PAN Q., SUGAI E., OSHIKI T.

Fac. of Agriculture, Tokyo University of Agriculture, Fuchu, Tokyo 183, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(5), 436-439. (J,e)

Studies on the behavioral response in silkworm larvae, *Bombyx mori*. II. Strain difference on walking distance.

Etudes sur le comportement des larves du ver à soie *Bombyx mori*. II. Différences selon les souches sur les distances parcourues.

PARK Y.K.

Milryang National Junior College of Agriculture & Sericulture, KOREA.

1987 *Korean J. Seric. Sci.*, 29(2), 15-23. (K,e)

Alkaline DNase of silkworm-moth caterpillar testes. 3) Molecular weight of the DNase and characterization of DNA hydrolysis by the enzyme.

DNase alcaline des testicules du papillon du ver à soie. 3) Poids moléculaire de la DNase et caractérisation de l'hydrolyse d'ADN par l'enzyme.

SAILOV M.D., LEBEDEVA L.G.

1986 *Izv. Akad. Nauk. Az.SSR, Ser. Biol. Nauk*, (5), 89-95. (R)

Fluctuations of the eclosion hormone activity during the hatching of the silkmoth, *Samia cynthia ricini*.

Fluctuations de l'activité de l'hormone d'émergence au cours de l'émergence chez le papillon séricigène *Samia cynthia ricini*.

SAITO H., FUGO H., NAKAJIMA M., MUKAIYAMA F.

Tokyo University of Agriculture & Technology, Fuchu, Tokyo 183, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(4), 273-278. (J,e)

Effect of dimethoate on glycogen content of certain tissues of silkmoth, *Bombyx mori*.

Effet du diméthoate sur le contenu en glycogène de certains tissus du papillon du ver à soie *Bombyx mori*.

SRINIVAS P., MURTHY M.R., RAO A.P.

1986 *Indim. J. Comp. Anim. Physiol.*, 4(2), 119-121. (E)

Total synthesis of lepidopteran A, self defense substance produced by silkworm.

Synthèse totale du Lépidoptéran A, substance d'auto-défense produite par le ver à soie.

TESHIMA T., NAKAI T., KITAZAWA M., SHIBA T.

1987 *Tetrahedron Lett.*, 28, 4705.

Structure determination of Lepidopteran C, self-defense substance produced by silkworm (*B. mori*).

Détermination de la structure du Lépidoptéran C, substance d'auto-défense produite par le ver à soie (*B. mori*).

TESHIMA T., NAKAI T., UEKI Y., SHIBA T.

1987 *Tetrahedron*, 43, 4513.

In vitro synthesis of alpha and beta ecdysones by prothoracic glands of *Bombyx mori*.

Synthèse in vitro des ecdysones alpha et beta par les glandes prothoraciques de *Bombyx mori*.

WANG Z., et al.

1987 *Kexue Tongbao (Foreign Lang. Ed.)*, 32(3), 192-195. (E)

Morphological studies of the Filippi's glands in several lepidopterous insects.

Etudes morphologiques des glandes de Filippi chez plusieurs Lépidoptères.

ZHANG Y., HAMANO K., MUKAIYAMA F.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(6), 449-456. (J)

Vers à soie: oeufs, embryologie

Silkworms: eggs, embryology

Studies on some aspects of carbohydrate metabolism in the eggs of silkworm *Bombyx mori* L.
Etudes sur certains aspects du métabolisme des hydrates de carbone chez les oeufs du ver à soie *Bombyx mori* L.

CHANDRASHEKAR P.M.

Bangalore University, INDIA.

1987 *Thesis PhD, Bangalore University*, 79 p. (E)

Quantitative and qualitative changes of polypeptides of egg-specific protein and vitellin depending on the diapause state of *Bombyx* eggs exposed to lower temperatures.

Changements quantitatifs et qualitatifs des polypeptides des protéines spécifiques de l'oeuf et de la vitelline selon le stade de la diapause chez des oeufs de *Bombyx* exposés à basse température.

FURUSAWA T., INDRASITH L.S.

Dpt of Applied Biology, Fac. of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(6), 467-473. (E)

Cloning of a cDNA coding for egg-specific protein of the silkworm, *Bombyx mori*, using an *Escherichia coli* expression vector.

Clonage d'un ADNc codant pour la protéine spécifique de l'oeuf du ver à soie *Bombyx mori*, en utilisant *Escherichia coli* comme vecteur d'expression.

INAGAKI S., NAKAMURA K., KOBAYASHI M., YAMASHITA O.

Fac. of Agriculture, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(5), 394-397. (E)

Inhibition of oogenesis by trypan blue in *Bombyx mori*.

Inhibition de l'ovogenèse chez *Bombyx mori* par le bleu trypan.

KAWAGUCHI Y., DOIRA H., FUJII H.

Fac. of Agriculture, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(4), 305-312. (J,e)

A short 5' flanking DNA region is sufficient for developmentally correct expression of moth chorion genes in *Drosophila*.

Une courte région d'ADN flanquante en 5' est suffisante pour l'expression correcte des gènes du chorion du papillon chez la *Drosophila*.

MITSIALIS S.A., SPOEREL N., LEVITEN M., KAFATOS F.C.

1987 *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 84, 7987-7991. (E)

Studies on voltinism in *Bombyx* with special reference to extra-embryonic membranes.

Etudes sur le voltinisme chez Bombyx : les membranes extra-embryonnaires.

MURAKAMI A.

National Institute of Genetics, Misima, Suzuoka-ken, JAPAN.

1986 *Nat. Inst. Gene. Japan, Ann. Rep.*, 37, 50. (E)

Genetic studies on voltinisms of a tropical race in Bombyx.

Etudes génétiques du voltinisme d'une race tropicale chez Bombyx.

MURAKAMI A.

National Institute of Genetics, Misima, Suzuoka-ken, JAPAN.

1986 *Nat. Inst. Gene. Japan, Ann. Rep.*, 37, 51. (E)

Studies on the voltinism gene, pnd, in a tropical race of Bombyx.

Etudes sur le gène du voltinisme, pnd, chez une race tropicale de Bombyx.

MURAKAMI A.

National Institute of Genetics, Misima, Suzuoka-ken, JAPAN.

1986 *Nat. Inst. Gene. Japan, Ann. Rep.*, 37, 53. (E)

Whole embryonic culture of spontaneous parthenogenetic diapausing-eggs in Bombyx mori.

Culture d'embryons totaux à partir d'oeufs diapausants parthénogénétiques spontanés chez Bombyx mori.

MURAKAMI A., OHITSUKI Y., KITAZAWA T.

National Institute of Genetics, Misima, Suzuoka-ken, JAPAN.

1986 *Nat. Inst. Gene. Japan, Ann. Rep.*, 37, 49. (E)

Death of haploid androgenetic eggs in the silkworm, Bombyx mori.

Mort d'oeufs androgénétiques haploïdes chez le ver à soie Bombyx mori.

SUGAI E., YOKOYAMA T., MINO T.

Fac. of Agriculture, Tokyo University of Agriculture, Tokyo 183, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(5), 385-389. (J,e)

Regulatory role of phytohormones in diapause in the oak silkworm (Antheraea pernyi).

Rôle régulateur des phytohormones dans la diapause chez le ver à soie du chêne Antheraea pernyi.

VITITNEV I.V., DROZDA V.F., SHKARUBA N.G.

1987 *Dokl. Akad. Nauk Ukr. SSR, Ser. B Geol. Khim. Biol. Nauki*, (1), 84-87. (R)

Preservation effect of soaking in the NaCl solution on the silkworm eggs during a refrigeration after common acid-treatment.

Effet du trempage dans une solution NaCl sur la conservation des oeufs de ver à soie pendant la réfrigération après traitement habituel à l'acide.

YOKOYAMA T., SUGAI E.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(6), 529-530. (J)

Effect of hot water treatment on early development of eggs of the silkworm, Bombyx mori.

Effet du traitement à l'eau chaude sur le développement précoce des oeufs du ver à soie Bombyx mori.

YOKOYAMA T., SUGAI E.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(5), 441-442. (J)

Effect of acid treatment on early development of eggs of the silkworm, Bombyx mori.

Effet du traitement à l'acide sur le développement précoce des oeufs du ver à soie Bombyx mori.

YOKOYAMA T., SUGAI E., OSHIKI T.

Fac. of Agriculture, Tokyo University of Agriculture, Fuchu, Tokyo 183, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(5), 369-373. (J,e)

Vers à soie: glandes séricigènes

Silkworms: silk glands

Developmental switches of sericin mRNA splicing in individual cells of Bombyx mori silk gland.
Variations de l'épissage du mRNA de la sérécine chez chaque cellule de la glande séricigène de Bombyx mori au cours du développement.

COUBLE P., et al.

Laboratoire de Biologie cellulaire, Université C. Bernard, 69622 Villeurbanne, FRANCE.

1987 *Developmental Biology*, 124, 431-440. (E)

Effect of trimolting silkworm inducer SM-1 on the regulation mechanisms of the silk fibroin synthesis of silkworm. 1.

Effet de l'inducteur de ver à soie trimuant SM-1 sur les mécanismes de régulation de la synthèse de la fibroïne chez le ver à soie. 1.

DAI Z., et al.

1987 *Canye Kexue*, 13(3), 138. (C)

Molting hormone and silk protein synthesis: Effect of ecdysone on the incorporation activity of 3H-glycine into proteins in the silk gland of the silkworm, Bombyx mori.

Hormone de mue et synthèse des protéines de la soie : Effet de l'ecdysone sur l'activité d'incorporation de la glycine 3H dans les protéines chez les glandes séricigènes du ver à soie Bombyx mori.

DAI, Y., YAO X., XIA H.

Suzhou Institute of Sericulture, CHINA.

1987 *Acta Entomol. Sinica*, 30(3), 233-238. (C,e)

DNA supercoiling enhances in vitro transcription of fibroin gene.

Le super-enroulement de l'ADN favorise la transcription in vitro du gène de la fibroïne.

HIROSE S., TABUCHI H., SUZUKI Y.

National Institute of Genetics, Misima, Suzuoka-ken, JAPAN.

1986 *Nat. Inst. Gene. Japan, Ann. Rep.*, 37, 31. (E)

Changes of DNase I sensitivity of the fibroin and sericin genes during the silkworm development.

Variations de la sensibilité à la DNase I des gènes de la fibroïne et de la séricine au cours du développement du ver à soie.

KOGA-BAN Y., SUZUKI Y.

1987 *Dev. Growth Diff.*, 29, 363. (E)

Participation of the upstream region of the fibroin gene in the formation of transcription complex in vitro.

Participation de la région en amont du gène de la fibroïne dans la formation du complexe de transcription in vitro.

TSUDA M.

National Institute of Genetics, Misima, Suzuoka-ken, JAPAN.

1986 *Nat. Inst. Gene. Japan, Ann. Rep.*, 37, 32. (E)

Transposable genetic element found in the 5'-flanking region of the fibroin H-chain gene in a genomic clone from the silkworm *Bombyx mori*.

Élément génétique transposable trouvé dans la région flanquante en 5' du gène de la chaîne lourde de la fibroïne chez un clone génomique du ver à soie *Bombyx mori*.

UEDA H., MIZUNO S., SHIMURA K.

Lab. of Biochemistry, Dpt of Agricultural Chemistry, Tohoku University, Sendai 980, JAPAN.

1986 *J. Mol. Biol.*, 190, 319-327. (E)

Seryl-tRNA synthetase from *Bombyx mori*.

La séryl-tRNA synthétase de *Bombyx mori*.

VISWANATHAN S., DIGNAM J.D.

Dpt of Biochemistry, Univ. of Mississippi Medical Center, Jackson, M-39216-4505, U.S.A.

1988 *J. Biol. Chem.*, 263(1), 535-541. (E)

Effects of juvenile hormone analogue on RNA components in posterior silk gland cells of the silkworm.

Effets d'un analogue de l'hormone juvénile sur les composants de l'ARN chez les cellules de la partie postérieure de la glande séricigène du ver à soie.

ZOU B., et al.

1987 *Canye Kexue*, 13(3), 158. (C)

Soie

Silk

Proposal of new model for Silk I structure of Bombyx mori silk fibroin.

Proposition d'un nouveau modèle pour la structure Soie I de la fibroïne de Bombyx mori.

ASAKURA T., YAMAGUCHI T.

Fac. of Technology, Tokyo University of Agriculture & Technology, Tokyo 184, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(4), 300-304. (E)

The relation between wrinkle and reelability of cocon.

Relation entre le froissage et la dévidabilité du cocon.

FENG J., et al.

1987 *Canye Kexue*, 13(3), 185. (C)

Charge organique de la soie par greffage.

Silk treatment by grafting of weighting agent.

GAVET L., AMBROISE G., GIORGIO A.

Institut textile de France, B.P. 60, 69132 Ecully Cédex, FRANCE.

1986 *L'Industrie textile*, 1166, 475-477. (F)

Dyeing for silk fabrics with aqueous extract from raw leaves of Ilex pedunculosa Miquel.

Teinture des tissus de soie avec un extrait aqueux provenant des feuilles de Ilex pedunculosa Miquel.

HAGIWARA M., TAKIZAWA K.

Fac. of Education, Shinshu University, Nagano 380, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(6), 500-504. (J,e)

Effect of copper ion on the formation of alpha-form crystal in silk crystalline part.

Effet de l'ion cuivre sur la formation de cristal de forme alpha dans la partie cristalline de la soie.

HIEI S., SAKABE H., YAMADA E., KONISHI T.

1987 *Sen'i Gakkaishi*, 43(9), 456-461. (J)

Viscoelastic properties of silk fibers irradiated with UV rays.

Propriétés de viscoélasticité des fibres de soie soumises aux rayons ultraviolets.

HU W., et al.

Fac. of Agriculture, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(6), 516-521. (J,e)

Studies on the relation between reeling results and cocoon cooking condition.

Etudes sur la relation existant entre les résultats obtenus au dévidage et les conditions de cuisson des cocons.

KATSUNO M.

1987 *Rep. Silk Sci. Res. Inst.*, 35, 71-79. (J)

Degumming characteristics and fabric properties by Papain degumming.

Caractéristiques de décreusage et propriétés des tissus décreusés avec de la Papaïne.

KIM J.H., NAHM J.H.

Graduate School, Sookmyung Women's University, KOREA.

1987 *Korean J. Seric. Sci.*, 29(2), 58-66. (K,e)

Sizing effect of water soluble polymer on the raw silk composed of the cocoon filament with different character.

Effet de colle de polymères solubles à l'eau sur la soie grège composée de filaments de cocons ayant différents caractères.

KUWAHARA A., MASUJIMA H.

Shizuoka Women's University, Shizuoka 422, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(5), 359-363. (J,e)

A study on the handle of the silk fabric degummed with enzyme. Effect of the predegumming degrees on the handle of the silk fabric degummed with protease.

Etude sur le toucher des tissus de soie décreusée avec des enzymes. Effet du prédécreusage sur le toucher des tissus de soie décreusée avec des protéases.

LEE Y.W., et al.

Sericultural Experiment Station, Suwon 170, KOREA.

1987 *Korean J. Seric. Sci.*, 29(2), 67-72. (K,e)

Studies on the reelability of trimolting cocoons induced by SM-1 and the physical properties of its filament in Bombyx mori.

Etudes sur la dévidabilité des cocons de trimuants induits par SM-1 et propriétés physiques de leur filament chez Bombyx mori.

LIU G., et al.

1987 *Canye Kexue*, 13(3), 144. (C,e)

Fine structure of the cocoon filaments of the silkworm differing relative amounts of sericin.

Structure fine des filaments du cocon du ver à soie différant entre eux par leur contenu relatif en sérécine.

MACHIDA Y., MORI T.

Kinjo Gakuin University, Moriyama-ku, Nagoya 463, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(4), 343-349. (J,e)

On the weaving of silk taffeta by thick size of cocoon filament.

Le tissage du taffetas de soie avec des cocons à filament épais.

MASAGO Y.

1987 *Rep. Silk Sci. Res. Inst.*, 35, 99-104. (J)

On the project symposium of swelling treatment of the raw silk and raw silk fabrics.

Projet de symposium sur le traitement de gonflage de la soie grège et des tissus de soie grège.

MATSUMOTO T., MASAGO Y.

1987 *Rep. Silk Sci. Res. Inst. (Japan)*, 35, 111-135. (J)

Scouring effects of raw silk in composite spun silk yarns.

Effets du lavage de la soie grège dans les fils de soie mélangés.

MATSUMOTO Y., TSUCHIYA I., KYUMA H.

Fac. of Textile Science, Shinshu University, Ueda 386, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(6), 483-488. (J,e)

Studies on the preliminary treatment in cocoon cooking. 7. Tests on the raw silk reeling concerning the preliminary treatment of cocoon cooking with the chemicals.

Etudes sur le traitement préalable à la cuisson des cocons. 7.

Tests sur la filature de la soie grège après cuisson préalable des cocons avec des produits chimiques.
MATSUZAKI H., MATSUOI Y.

1987 *Rep. Silk Sci. Res. Inst. (Japan)*, 35, 59-69. (J,e)

On the union cloth by swelling of tussar silk and spun silkyarn.

Tissu mélangé de soie tussah gonflée et de filé de soie.

MATSUMOTO T., MASAGO Y.

1987 *Rep. Silk Sci. Res. Inst. (Japan)*, 35, 105-109. (J)

Kinetic study of dyeing of silk with a mixture of acid dyes.

Etude cinétique de la teinture de la soie avec un mélange de colorants acides.

MITSUISHI M., YAGI T., ISHIWATARI T.

Fac. of Textile Science, Shinshu University, Ueda 386, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(6), 457-462. (J,e)

Microsegregated structure in the regenerated silk fibroin film from Bombyx mori.

Structure microséparée dans un film régénéré de fibroïne provenant de Bombyx mori.

NAGURA M., et al.

1987 *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.*, 25, 2567-2571. (E)

Differences in dyeing properties of acid dyes depending on the silkworm varieties.

Différences des propriétés tinctoriales des colorants acides selon les variétés de ver à soie.

NAKAJIMA T., SHIMIZU Y., SHIKATA M., KIMURA M.

Koka Women's Junior College, Ukyo-ku, Kyoto 615, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(5), 422-427. (J,e)

Influence of degumming reagents on the rate of dyeing with acid dye.

Influence des réactifs de décreusage sur la vitesse de teinture avec des colorants acides.

NAKAJIMA T., et al.

Koka Women's Junior College, Ukyo-ku, Kyoto 615, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 1987, 56(6), 522-526. (J,e)

Attack of dermestid beetles on raw silk treated with glutaraldehyde.

Attaque des scarabées dermestides sur de la soie grège traitée avec de la glutaraldéhyde.

NAKAMOTO N.

1987 *Kiito Kensa Kenkyu Hokoku*, 40, 157-162. (J)

Growth and development of the larva of an endoparasitoid, Exorista sorbillans in the larva of Bombyx mori.

Croissance et développement de la larve d'un endoparasite, Exorista sorbillans, chez la larve de Bombyx mori.

OSHIKI T., NAKAZAWA K.

Fac. of Agriculture, Tokyo University of Agriculture, Tokyo 183, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(6), 494-499. (J,e)

Method of manufacture of the hand spun silk yarn by the GAIDO yarn.(2)

Méthode de fabrication de filé de soie par le fil GAIDO. (2)

SAIJO M.

1987 *Rep. Silk Sci. Res. Inst. (Japan)*, 35, 137-141. (J)

Relation between the aggregate-state structure of silk and the properties of silkworm cocoons.

Relation entre la structure de la soie à l'état d'agrégat et les propriétés des cocons de ver à soie.

SHENG J.

1987 *Fangzhi Xuebao*, 8(1), 25-28. (C)

Initial sericin dissolving speed of cocoon layer in different media.

Vitesse initiale de dissolution de la sérécine du cocon dans différents milieux.

SHENG J., LI M.

1987 *Fangzhi Xuebao*, 8(4), 241-242. (C)

Studies on the relation of silkworm rearing results and silk reeling results.

Etudes sur la relation entre les résultats d'élevage du ver à soie et les résultats obtenus en filature.

SHIMIZU S., KOBAYASHI M., KUROKAWA T.

1987 *Rep. Silk Sci. Res. Inst. (Japan)*, 35, 81-88. (J)

Survey of raw silk reeling water in Korea.

Enquête sur les qualités de l'eau utilisée pour le dévidage de la soie grège en Corée.

SUNG J.C., et al.

National Silk Inspection Office, KOREA.

1987 *Korean J. Seric. Sci.*, 29(2), 73-81. (K,e)

Mechanical properties of silk fabrics composed of methacrylamide-grafted silk fibers.

Propriétés mécaniques des tissus de soie composés de fibres de soie greffées avec du méthacrylamide.

TSUKADA M., KANDA C., TAKAHASHI T., AOKI A.

Sericultural Exp. Station, Tsukuba, Ibaraki 305, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(6), 489-493. (J,e)

Structural changes of Bombyx mori silk fibroin in the course of drawing.

Changements de structure de la fibroïne de Bombyx mori au cours du tirage.

TSUKADA M., KASAI N.

1987 *Sen'i Gakkaishi*, 43(9), 451-455. (J)

Mechanical and structural properties of silk fibroin fibers modified by various kinds of epoxides.

Propriétés mécaniques et structurales des fibres de fibroïne modifiées par diverses sortes d'époxydes.

TSUKADA M., SHIOZAKI H., NAGURA M.

Sericultural Experiment Station, Yatabe, Ibaraki 305, JAPAN.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(4), 323-329. (J,e)

Thermomechanical properties of methacryl amide-grafted silk fibers containing different amounts of water.

Propriétés thermomécaniques des fibres de soie greffées avec du méthacrylamide et contenant différentes quantités d'eau.

TSUKADA M., YAMAGUCHI Y.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(6), 533-534. (J)

Studies on DS84-10 type cocoon filament testing machine.

Etudes sur la machine pour tester le filament du cocon DS84-10.

XIA J., et al.

1987 *Canye Kexue*, 13(3), 174. (C)

On the relations between water and filature. II. Utilitarian technics of water qualities in filature.

Relations entre l'eau et la filature. II. Techniques utilitaires des qualités de l'eau en filature.

YAMADA A.

1987 *Rep. Silk Sci. Res. Inst. (Japan)*, 35, 23-57. (J)

Reducing of photoyellowing of resin finished silk fabrics.

Diminution du jaunissement à la lumière des tissus de soie apprêtés avec de la résine.

YAMAGUCHI Y.

1987 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 56(6), 535-536. (J)

ERRATUM

Dans l'article "Epidemiology of leaf spot disease of mulberry. II Leaf age and disease susceptibility" publié dans *Sericologia* 27(4), il faut lire ligne 7 : "However, Sukumar and Ramalingam (1987) have showed that young leaves are **susceptible** to leaf spot infection" et non "...young leaves are **resistant** to leaf spot infection".

ERRATUM

In the article "Epidemiology of leaf spot disease of mulberry . II Leaf age and disease suceptibility" published in *Sericologia* 27(4), line 7 must be read "...young leaves are **susceptible** to leaf spot infection" et not "... **resistant** to leaf spot infection".