

sericologia

Journal of 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
Chief Editor
Deputy Editor

H. BOUVIER
G. CHAVANCY
A. FOURNIER

Directeur Gérant
Rédacteur en Chef
Rédacteur Adjoint

COMITE DE REDACTION **EDITORIAL BOARD**

BEAULATON J. (France)
BOSQUET G. (France)
CANTO FONSECA T. (Brésil/Brazil)
CHIANG Y-L. (Chine/China)
COUBLE P. (France)
DATTA R.K. (Inde/India)
DOIRA H. (Japon/Japan)
FOURCHE J. (France)
FUKUDA T. (Japon/Japon)
GOLDSMITH M.R. (USA)
HAZAMA K. (Japon/Japan)
IATROU K. (Canada)
JOLLY M.S. (Inde/India)
KOBAYASHI M. (Japon/Japan)

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

Secrétariat et Documentation
C. PERCEVEAUX - N. LORiot

THE STRUCTURE, SYNTHESIS AND SECRETION OF FIBROIN IN THE SILKWORM, *BOMBYX MORI*

Kensuke SHIMURA

Department of Agricultural Chemistry, Tohoku University, Sendai 980, Japan.

The fibroin of Bombyx mori is composed of one heavy chain (H chain, 350 kD) and one light chain (L chain, 25 kD) which are connected by disulfide bond(s). Hereditary variants of the H and L chains were detected and linkage analyses of the H and L chain genes were performed, using silkworms carrying variant genes of the H or L chain. The two chain genes were found to be linked with different chromosomes, that is, the H chain gene is linked with the Nd gene locating on the 25th chromosome, and the L chain gene does with the Nd-s gene locating on the 14th chromosome, respectively. The posterior silk glands of Nd(2), one of the Nd-type strains, are extremely short in size and secrete only a small amount of fibroin into the lumen of the gland. It was found that the Nd(2) fibroin secreted does not contain L chain, although L chain mRNA is present and L chain is synthesized in the posterior silk gland cells of the mutant. The Nd(2) mutation is not segregatable from the structure gene of H chain. Thus, it is most likely that the H chain of Nd(2) has some structural abnormality that interferes with the formation of disulfide bond(s) with the L chain, resulting in a great reduction of fibroin secreting activity of the posterior silk gland cells. Similar observations were obtained with Nd-s mutant strain. A locus responsible for the Nd-s mutation was mapped very close to or within the L chain gene on the 14th chromosome. The small amount of fibroin secreted into the lumen of the posterior silk gland of Nd-s also consists of the H chain only and lacks the L chain. All the results presented here strongly suggest that the H-L subunit combination of silk fibroin is essential for its efficient secretion. The physiological function of the L chain in the processes of intracellular transport and secretion of fibroin in the silk glands is discussed.

INTRODUCTION

In the middle of 1950s, the silkworm, *Bombyx mori*, was first utilized in the field of molecular biology as a model system for studies on the biosynthesis of protein in eukaryotes. Since then, many intensive works concerning the biosynthesis of silk proteins have been accumulated. Reviews dealing with the attempt to construct a cell-free system of fibroin synthesis (1), the isolation of fibroin mRNA (2,3), a comprehensive survey of silkworm researchs including egg development, endocrinological regulation, and the adaptive tRNA synthesis (4), the physiology and biology of spinning in *Bombyx mori* (5), and the ultrastructural studies of the silk gland cells of *Bombyx mori* (6), have been published.

The purpose of this review is to present a noble proposal that the fibroin molecule is composed of heavy and light chains linked by disulfide bond and this feature of subunit structure is greatly advantageous to efficient synthesis and secretion of fibroin in the silk gland cells of *Bombyx mori*, presumably making the fibroin molecules stable and transportable in a cellular milieu.

I. SUBUNIT STRUCTURE OF FIBROIN

Silk fibroin of *Bombyx mori* has been thought to consist of single long polypeptide chains for a long time. Recently, it has become more likely that the fibroin has a subunit structure. Tashiro and Otsuki (7-10) first demonstrated that native liquid fibroin prepared directly from the middle silk gland

of *B. mori* is composed of major homogeneous component and minor heterogenous low molecular weight components connected together by disulfide bonds. Molecular weights of the native fibroin and the major component of reduced fibroin in 6.0 M guanidine HCl were determined as about $M_R 3.7 \times 10^5$ and $M_R 3.0 \times 10^5$, respectively, by sedimentation equilibrium analysis. Similar result was also obtained by Sasaki and Noda (11, 12) with sedimentation analysis that the fibroin molecule ($M_R 3.6 \times 10^5$) was composed of three small components of $M_R 2.6 \times 10^4$ and one large component of $M_R 2.8 \times 10^5$. During the course of these experiments, however, the degradation of fibroin preparation by some serine proteases possibly derived from wounded cells of the gut and/or the silk glands of the larva became apparent by N-terminal analysis, gel electrophoresis and sedimentation analysis (13). Thus the exact sizes of the small subunits and the number of the subunit linked with the large subunit remained to be solved.

To avoid such proteolytic degradation during the solubilization of fibroin, we used a fibroin preparation from the posterior silk glands of the silkworm (14). Briefly, the posterior silk glands at the fifth day of the fifth instar were dissected out, washed shortly in ice-cold 1.15% KCl and immersed immediately in ice-cold 30% ethanol, and stood overnight at 4°C. The coagulated fibroin in the lumen of the silk glands is easily distinguishable from the tissue proteins by its string-shape and glassy look. The fibroin was separated with a small forceps from the gland tissue which surrounds the coagulated fibroin. The fibroin obtained was washed several times with deionized water, then with 50% ethanol, absolute ethanol and ether, successively, and kept in a coloured desiccator. This method has an advantage in eliminating the possibility of degradation of fibroin molecules by tissue proteases and/or exposing the fibroin to an alkaline condition.

The fibroin obtained above was dissolved in 10-15 volumes (V/W) of 60% LiSCN (pH 7.0), added 2-mercaptoethanol and carboxymethylated with monoiodoacetate in 5 M urea-0.02 M Tris HCl, pH 8.0. The carboxymethylated fibroin gave two distinct peaks in an elution pattern on Sephadex G-200. The main and minor peaks were proved to contain heavy and light chains of fibroin molecules, respectively, by SDS-gel electrophoresis. The ratio of the areas of the two elution bands was about 92:8, based on absorbance at 280nm.

Although the subunit structure model for silk fibroin has been almost established, there remained still a question whether the small component of fibroin is a contaminant rather than an integral part of fibroin (15). One reason for arising such ambiguity may be that all the studies performed so far concerning the occurrence of the small component in fibroin were carried out by use of so-called "native fibroin" prepared directly from the posterior region of the middle silk glands, and therefore, the question as to the contamination with tissue proteins still remained. This question was settled by isolation of the small component from cocoon proteins of *Bombyx mori*, which was completely identical to that from the posterior silk gland fibroin with respect to amino acid composition and SDS polyacrylamide gel electrophoretic profiles (16, 17).

Furthermore, a semi-quantitative experiment to prepare the small and large components of cocoon was carried out. By starting with 1.0 g cocoon proteins, about 35 mg of small component and 503 mg of large component were obtained, indicating that the content of the small component in the cocoon fibroin is about 7% in weight (16).

These results lead us to the estimation that the fibroin molecule is composed of each one mole of large and small subunits connected with disulfide bond(s), if we assume the molecular weights of the large and small subunits are 3.5×10^5 and 2.5×10^4 , respectively. Sasaki and Noda (12) suggested that the fibroin molecule is composed of one large component of molecular weight 2.8×10^5 and three small components of molecular weight 2.6×10^4 . This proposal is not in accord with our data. This discrepancy seems to arise principally from the following reasons. They estimated the number of small component at three by assuming that the contents of the small component is 20% (W/W) and the molecular weights of non-reduced fibroin and the small component are 3.65×10^5 and 2.6×10^4 , respectively. In contrast to their data, we obtained always experimental results showing that the contents of the small component in the fibroin is about 7%, close to a value of $(2.5 \times 10^4 / 3.7 \times 10^5) \times 100$ (16, 18). This may suggest the ratio of the large and small components in the fibroin to be one to one. Although a final conclusion on the structure of fibroin is still remained unsolved, its subunit structure consisting of heavy and light chains is now undoubtfull. Therefore, the author calls thereafter the large and small components heavy (H chain) and light chain (L chain), respectively (Fig. 1).

Amino acid <i>Acide aminé</i>	Cocoon fibroin ^b <i>Fibroïne du cocon</i>	Posterior silk gland fibroin ^c <i>Fibroïne du sécréteur</i>			Sericin <i>Séricine</i> Whole ^d <i>Total</i>
		Whole <i>Total</i>	Large subunit <i>Grande ss-unité</i>	Small subunit <i>Petite ss-unité</i>	
Glycine	43.7	42.9	49.4	10.0	13.5
Alanine	28.8	30.0	29.8	16.9	6.0
Serine	11.9	12.2	11.3	7.9	33.4
Tyrosine	5.1	4.8	4.6	3.4	2.6
Valine	2.2	2.5	2.0	7.4	2.8
Aspartic acid	1.3	1.9	0.65	15.4	16.7
Glutamic acid	1.0	1.4	0.70	8.4	4.4
Threonine	0.90	0.92	0.45	2.8	0.53
Phenylalanine	0.61	0.67	0.39	2.7	0.53
Methionine	-	-	-	0.37	0.04
Isoleucine	0.71	0.64	0.14	7.3	0.72
Leucine	0.51	0.55	0.09	7.2	1.1
Proline	0.31	0.45	0.31	3.0	0.68
Arginine	0.46	0.51	0.18	3.8	3.1
Histidine	0.16	0.19	0.09	1.6	1.3
Lysine	0.31	0.38	0.06	1.5	3.3
Cysteine	-	-	-	-	0.15
CM-cysteine				1.6	

a: Data are expressed as mol %/ *Les valeurs sont exprimées en % mol.* b: Lucas *et al.* (1960) J. Mol. Biol., 2, 339.
c: Shimura *et al.* (1982) J. Seric. Sci. Jpn., 51, 20. d: Komatsu (1975) Bull. Seric. Exp. Stn. Jpn., 26, 170.

Table I. Amino acid composition of silk proteins of *Bombyx mori*.

Tableau I. Composition en acides aminés des protéines de la soie de *Bombyx mori*.

Amino acid composition of the H and L chains are shown in Table I. H chain exhibits a typical amino acid composition of so-called fibroin type, that is, it abounds in glycine and alanine, and the glycine:alanine ratio is almost exactly 3:2. On the other hand, the composition of L chain is evidently different from such a fibroin type. It is noteworthy that the contents of glycine and alanine in H chain is higher than those of intact fibroin and, on the contrary, the remaining amino acid contents in H chain are all lower than those in intact fibroin. These data indicate that a considerable amount of amino acids which have been considered to exist in the amorphous regions of fibroin molecules should be transferred to the L chain amino acid family. Katagata *et al.* (19) have demonstrated that almost all amorphous-region peptides obtained by chymotryptic digestion of H chain had principally an amino acid sequence of crystalline-region type, that is, glycine residues occurred alternately throughout the peptide chains so far examined, whereas the chain length of the peptides were much shorter than that of the crystalline-region peptides obtained as a precipitate during chymotryptic digestion of H chain. Therefore, it seems acceptable to assume that glycine residues occupy alternate positions throughout H-chain. If so, long-adopted usage of "crystalline" and "amorphous" regions in fibroin molecules must be reinvestigated because it becomes questionable whether the supernatant peptides from the chymotryptic digest of H chain really exist as an amorphous state in a fibroin fibre.



Fig. 1. Analysis of subunit structure of fibroin.

Fig. 1. Analyse des sous-unités de la fibroïne.

Fibroin in the posterior silk gland of J-131 parent strain was subjected to SDS-12.5% PAGE in the absence (lane 1) and presence (lane 2) of 2-mercaptoethanol. Stained with Coomassie Brilliant Blue.

La fibroïne du sécréteur de la glande séricigène de la souche parentale J-131 a été soumise à électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 12,5 % en présence de SDS (SDS-PAGE), en l'absence (colonne 1) et en présence (colonne 2) de 2-mercaptoéthanol. Coloration au Bleu de Coomassie.

II. BIOSYNTHESIS OF FIBROIN

During the larval life of *Bombyx mori*, silk gland cells undergo a cyclic development related to the hormonally controlled alternation of molt and intermolts. After the 4th molt, the metabolic activities of the larvae are markedly elevated toward massive production of silk proteins, and the silk gland grows almost exponentially until about the 6th day of the 5th instar. In the posterior silk gland, rapid synthesis of DNA and RNA takes place in the first half of the 5th instar. Their maximal increments per day were observed on the 3rd day, while the synthesis of fibroin reaches its maximum on the 6th day (5). The bulk RNA comprises rRNA, tRNA and mRNA. Among them, rRNA and tRNA exhibit almost the same changes as the total RNA in contrast to continuous increment of fibroin mRNA (24) up to the 6th day of the 5th instar. Although these data were obtained in a preliminary study (20, 21), there has been accumulated enough evidence to suspect that a sequential expression of genes concerned in protein-synthesizing machinery is precisely regulated in the silk gland at the 5th instar stage (22, 23, 25, 26, 27, 28, 29).

As the subunit structure of fibroin has been established, further problems concerning the biosynthesis of L chain as well as that of H chain, and formation of disulfide linkage between the two subunits have come up. Ohmachi and Shimura (30) demonstrated that the poly A containing RNA fraction prepared from the posterior silk gland gave an additional RNA fraction, which was smaller in molecular size than the fibroin mRNA reported by Suzuki and Brown (31). The new RNA was proposed to be the messenger RNA coding for the L chain of fibroin by analyzing its translation product with gel electrophoresis and an immunological method. Couble *et al.* (32, 33) also isolated a poly A containing RNA from the posterior silk gland, encoding for a 25-kD silk protein (P25). A narrow parallelism of the cellular pools of P25 mRNA and fibroin mRNA during the last larval intermolt has been demonstrated, indicating a strict adjustment of the transcription rate of their genes.

Judging from the data presented by Couble *et al.* (33), the P25 mRNA seemed at first to be identical to the L chain mRNA isolated by Ohmachi and Shimura (30). Recently, however, it has become apparent that the amino acid composition of P25, deduced from its genomic sequence (34), is significantly different from those of the fibroin L chain isolated from posterior silk glands and cocoons: particularly in the contents of Gly, Ala, Phe, Thr, Pro, Lys, His, Arg and Cys. It was reported that small polypeptides associated with fibroin consist of one major and at least one minor component (16, 35) that have a slightly different electrophoretic mobilities. Thus, we presume at present that the P25 may correspond to a minor component. Functional and evolutionary relationships between the L chain and the P25 have not been yet elucidated.

Biosynthesis of fibroin in a cell-free system has been extensively studied during last two decades (36-41). In these works, attention has been paid exclusively to the synthesis of the H chain and, therefore, no information on the synthesis of the L chain is available until quite recently. Oyama *et al.* (42, 43) has made a reinvestigation on the intracellular site of synthesis and assembly of the two subunits in the posterior silk gland. Both the H and L chains were synthesized as major products on the membrane-bound polysomes prepared by centrifuging a homogenate of the posterior silk glands at $17,000 \times g$ for 30 min. in 20 mM Tris HCl buffer (pH 8.0) containing 50 mM KCl-5 mM Mg-0.4 M sucrose. A substantial part of the L chain peptides synthesized on the membrane-bound polysomes was demonstrated to be bound to the nascent H chain polypeptides by disulfide bond. These nascent H and L chain peptides on the membrane-bound polysomes were protected from the protease digestion in the absence of Triton X-100, whereas they were totally digested in the presence of Triton X-100. This indicates that most of the newly synthesized H and L chains in the cell-free system were enclosed within microsomal membrane vesicles. The formation of disulfide linkage between the H and L chains seems to take place at a relatively early stage of synthesis of both chains on the membrane-bound polysomes. However, the exact timing and location of the disulfide bond formation, that is, whether it is formed between the growing chains on the polysome, immediately after completion of the synthesis of both or either chain, or in the endoplasmic reticulum, remain to be elucidated. As shown in the following section, the H-L subunit combination is now demonstrated to be an important step for efficient synthesis and secretion of fibroin.

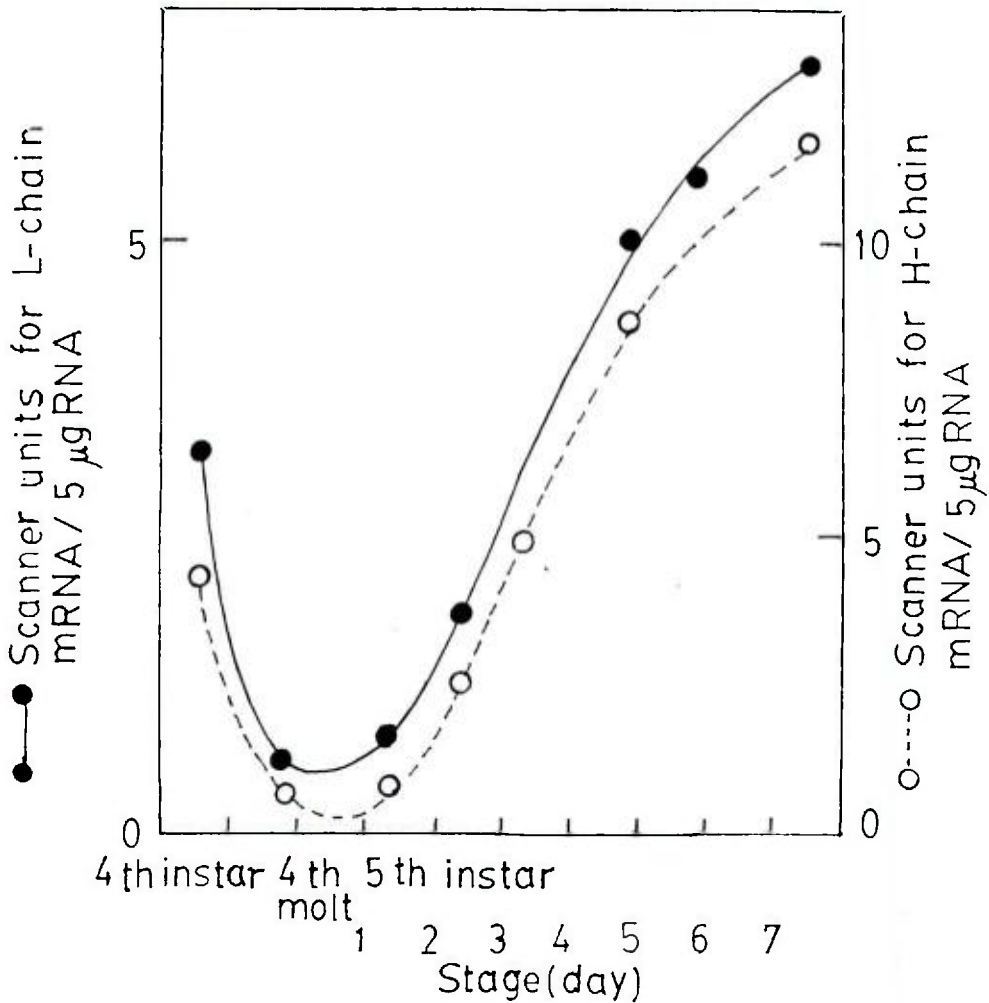


Fig. 2. Quantitative changes of the fibroin H and L chain mRNAs during the late larval development.

Fig. 2. Changements quantitatifs des ARNm des chaînes H et L de la fibroïne en fin de développement larvaire.

Relative concentrations of the H chain (o) and L chain (•) were determined by the dot blot hybridization of the posterior silk gland RNA from different stages with excess probes for the H chain mRNA (^{32}P -pJ9HPE 1) and the L chain mRNA (^{32}P -pLA 23), respectively (44).

Les concentrations relatives de la chaîne H (o) et de la chaîne L (•) ont été déterminées par hybridation des ARN du sécréteur de la glande séricigène à différents stades avec un excès de sondes pour l'ARNm de la chaîne H (^{32}P -pJ9HPE 1) et pour l'ARNm de la chaîne L (^{32}P -pLA 23) (44).

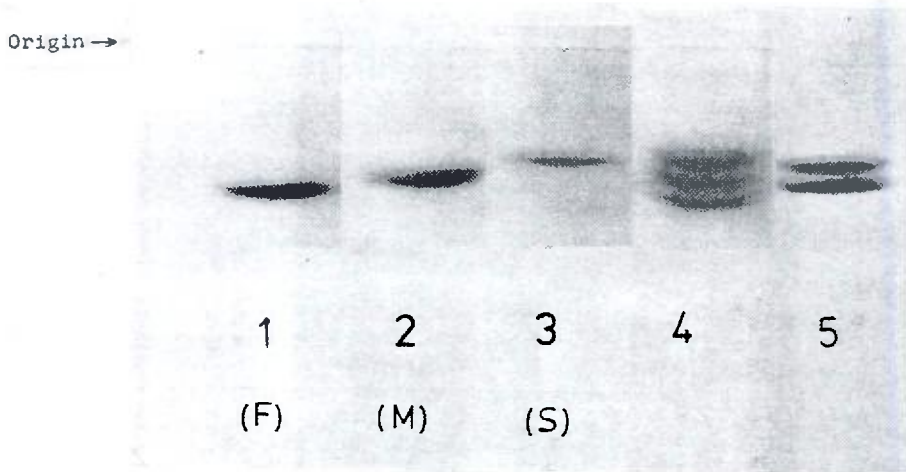
Kimura *et al.* (44) compared the changes of the concentration of the L chain mRNA in the posterior silk gland during the late larval development with those of the H chain mRNA by a dot blot hybridization method with excess ^{32}P -labeled probes specific for the L chain and the H chain mRNAs, respectively. As shown in Fig. 2, the concentration of the L-chain mRNA on the last day of the 4th instar was almost equal to that on the 4th day of the 5th instar, whereas the concentration decreased to a very low level during the 4th molting. The concentration began increase again from the 2nd day of the 5th instar, and this continued until the 7th day. It is noteworthy that the concentrations of both L- and H-chain mRNAs followed a similar pattern. This indicates that the expression of the L-chain gene is coordinated with the expression of the H-chain gene during the late larval development. It is attractive to elucidate how the two genes, located on different chromosomes, are expressed coordinately. A similar result was reported by Couble *et al.* (33) for the concentration changes of the P25 mRNA and fibroin mRNA in the posterior silk gland cells at the end of the larval life. They suggested that the narrow parallelism of the cellular pools of P25 and fibroin mRNA may be partly explained by the fact that the DNA upstream of the P25 gene possesses a sequence very similar to a region of fibroin 5'-flanking DNA (45), shown to possess transcription modulation signals by Suzuki *et al.* (46-50). For further substantial discussion on this subject, the completion of the sequence analysis of the L-chain gene, particularly, of the 5'-flanking region of the gene, is highly awaited.

III. Linkage analysis of the H and L chain genes in the chromosome of *Bombyx mori*

Recently, experimental data suggesting the heterogeneity of *Bombyx mori* fibroin were presented. Sasaki and Noda (13) identified two amino acids (Asp and Ser) in a ratio of about 1:1 as the N-terminal amino acids of fibroin large subunit, and suggested that the large subunit consists of two polypeptide chains with different N-terminal residues. Sprague (15) demonstrated that fibroin was resolved into two bands (M_r about 350,000) of equal staining intensity on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Taking into consideration that there is one fibroin gene per haploid genome and the *Bombyx* strain used was heterozygous for the fibroin locus, the possibility that these two fibroin polypeptides might be the products of dominant fibroin alleles differing slightly in size. Later, Sprague *et al.* (51) showed that two fibroin polypeptides differing in length are encoded by genes with different length.

We have examined molecular size of the H chains of fibroins obtained from twelve parent strains of *Bombyx mori* to inspect the occurrence of hereditary variants of fibroin (52). All the fibroin H chains examined exhibited a single component and these fibroin phenotypes were tentatively classified by their electrophoretic mobilities on SDS-polyacrylamide gel into three groups, that is, fast (F), moderate (M) and slow (S) moving groups as shown in Fig. 3. By carrying out F_1 hybridization and back crossing of the F_1 with each of their parents, it was concluded that the alleles which control the fibroin phenotype are codominant each other.

The occurrence of hereditary variants of fibroin subunit has made it possible for us to perform linkage analysis of the subunit genes, which had been a long-pending subject in the field of silkworm study. Hyodo *et al.* (53) determined for the first time that the H chain gene is linked with the *Nd* gene located on the 25th chromosome, using J-131 silkworm strain possessing the H chain of F phenotype and twenty-four silkworm stocks carrying genetic markers on each chromosome, of which H chains are M or S phenotype. The H chain gene was originally assigned to the 23rd chromosome, because of its linkage with the *Nd* locus. However, location of *Nd* has recently been corrected to be on the 25th chromosome (54-57). Accordingly, the H chain gene is assigned to the 25th chromosome.



Fig; 3. SDS-4% PAGE of fibroin H chains from parent strains of silkworm and their hybrid silkworm.

Fig. 3. PAGE SDS à 4% des chaînes H de la fibroïne de souches parentales de vers à soie et de leurs hybrides.

Lane 1: J-131; Lane 2: J-139; Lane 3: J-138; Lane 4: a mixture (1:1:1) of the H chains from J-131, J-139 and J-138; Lane 5: a hybrid silkworm (J-139 x J-138).

Colonne 1 : J-131; Colonne 2 : J-139; Colonne 3 : J-138; Colonne 4 : mélange (1:1:1) des chaînes H provenant des souches J-131, J-139 et J-138; colonne 5 : ver à soie hybride (J-139 x J-138).

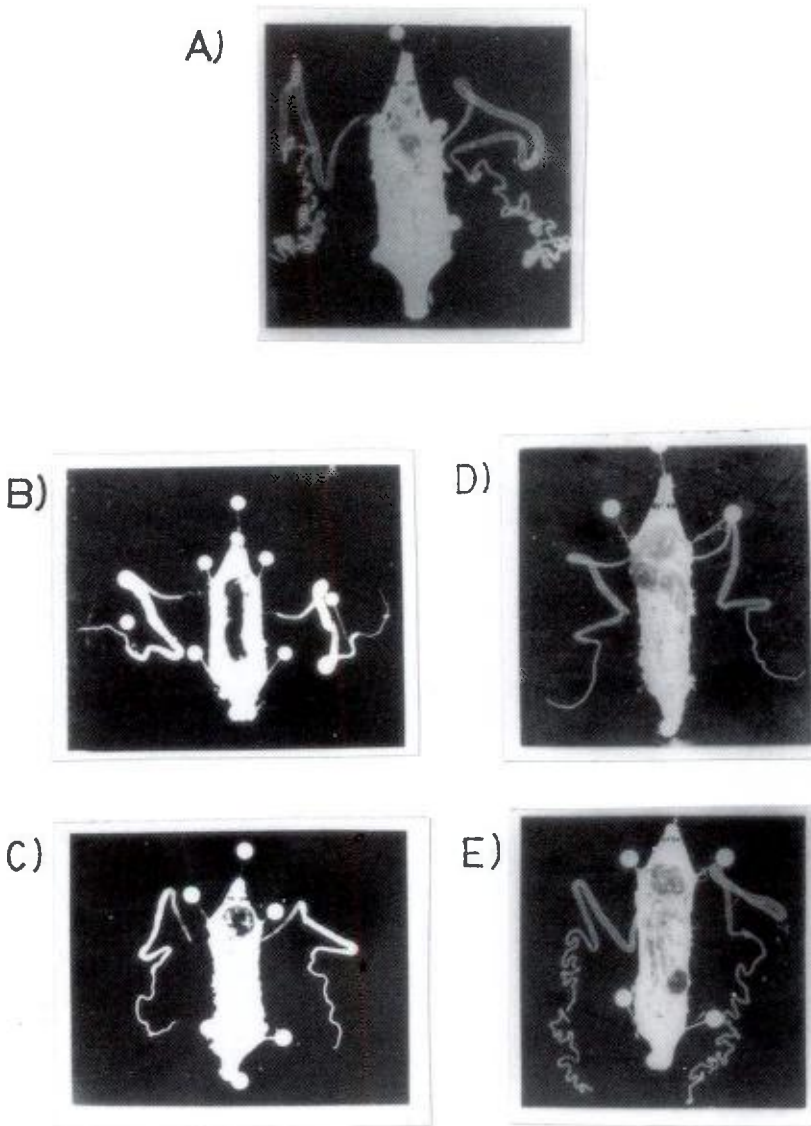


Fig. 4. Silk glands at the fifth day of the fifth instar.

Fig. 4. Glandes séricigènes au 5ème jour du 5ème âge.

(A) Parent strain (J-131/J-131), a normal producer; (B) *Nd* mutant strain (*Nd*(2)/*Nd*(2)); (C) Hybrid silkworm (*Nd*(2)/J-131); (D) *Nd-s* mutant strain (*Nd-s*^D/*Nd-s*^D); (E) Hybrid silkworm (*Nd-s*^D/J-131).

(A) Souche parentale (J-131/J-131), un producteur normal; (B) souche mutante *Nd* (*Nd*(2)/*Nd*(2)); (C) Hybride (*Nd*(2)/J-131); (D) Souche mutante *Nd-s* (*Nd-s*^D/*Nd-s*^D); (E) Hybride (*Nd-s*^D/J-131).

Genetic variants of fibroin L chain were also found by Hyodo *et al.* (58) and classified into three groups, A, B and C from their electrophoretic mobilities on SDS-polyacrylamide gel. Linkage analysis of the L chain gene, using a silkworm strain of Tamanashikasuri (L chain phenotype of C) and sixteen silkworm stocks (L chain phenotype of A or B) carrying genetic markers on each chromosome, revealed that the L chain gene is not linked to the H chain gene, but linked to the U gene located on the 14th chromosome. It is worth noting that a mutant gene, *Nd-s*, is known to be linked on the 14th chromosome. The *Nd-s* mutant exhibits a markedly lowered activity in the fibroin synthesis compared with that of normal silkworm. The silkworm bearing the *Nd* mutation is called "naked pupa" and the silkworm bearing the *Nd-s* mutation is called "sericin-cocoon", respectively (59). These mutant larvae pupate either without producing any cocoon or producing thin shelled cocoons consisting of mostly sericin and only few fibroin. The posterior silk glands of both *Nd* (60) and *Nd-s* (61, 62) silkworms are markedly degenerated, whereas their middle silk glands are almost normal (Fig. 4).

Our attention has been drawn to the fact that gene mutation either in the chromosome 14 or 25 results in a great reduction of fibroin secretion. Thus, an attempt to obtain a recombinant between the *Nd* and H chain genes was made. No recombinants were obtained in about 1000 hybrids (offsprings), suggesting a very close distance between the two genes. The possibility that the *Nd* mutation lays on the structure gene of fibroin itself or on the regulatory gene may be considered, taking into account the evidence that the formation of the H-L complex is prevented in the *Nd* mutant.

IV. Subunit combination and secretion of fibroin

As mentioned above, the posterior silk gland of *Nd* is extremely short in size and produces only a little fibroin. We obtained the fibroin of *Nd(2)*, one of the *Nd*-type strains, secreted into the lumen of the posterior silk gland as very thin thread by immersing the silk gland in cold 60% ethanol. This thread protein was inspected by its SDS-PAGE profile and amino acid composition. It was an unexpected finding that the fibroin secreted into the lumen of the posterior silk gland of *Nd(2)* mutant was composed of only the H chain, and no L chain was detected (64). Subsequently, a question arose whether *Nd(2)* mutant lacks the activity for the synthesis of L chain. Regarding this question, mRNA for the L chain was searched for in the posterior silk gland of *Nd(2)*. Total RNA prepared from the posterior silk gland of *Nd(2)* and J-131 (a normal producer) were subjected to Northern blot hybridization with ³²P-labeled L chain clone pLA23. In both cases the ³²P-labeled cDNA hybridized to a single band corresponding to the size of L chain mRNA (Fig. 5), indicating that L chain mRNA is synthesized in the posterior silk gland cells of *Nd(2)* as well as in those of J-131. However, the concentration of the L chain mRNA in the *Nd* cells was about 20% of that in J-131 cells, judging from the densitometric scanning data for Fig. 5.

The translational product of L chain mRNA was also confirmed inside the posterior silk gland cells of *Nd(2)*, using anti-L-chain serum and ¹²⁵I-protein A as shown in Fig. 6A, whereas L chain is undetectable in the lumen of the *Nd(2)* silk (Fig. 6B). Two possible explanations for the absence of L chain in the secreted fibroin of *Nd(2)* may be considered tentatively: a structural defect of the H chain or the L chain that prevents the formation of disulfide bond(s), or the absence of factor(s) required for the formation of disulfide bond(s).

Using two forms (A and C types of electrophoretic mobility) of genetic variants of the L chain described above, an attempt has been made to see whether the L chain derived from the *Nd(2)* allele in a hybrid *Nd(2)*/Tamanashikasuri is able to bind with the H chain from the normal allele and to be secreted into the lumen of the posterior silk gland. As shown in Fig. 6A, the L chain in the cells of *Nd(2)*/*Nd(2)* showed A type (lane 1), the L chain in the cells of Tamanashikasuri/Tamanashikasuri (a normal producer) showed C type (lane 2, and in the cells of *Nd(2)*/Tamanashikasuri, A and C types of L chain were detected with the ratio of approximately one to one (lane 3). When the fibroin secreted into the lumen of the posterior silk gland of the hybrid *Nd(2)*/Tamanashikasuri was subjected to SDS-PAGE after reduction with 2-mercaptoethanol, two bands of L chain (A and C types) were detected with the ratio of approximately one to one (Fig. 6B, lane 3). The *Nd(2)*/*Nd(2)* strain secreted

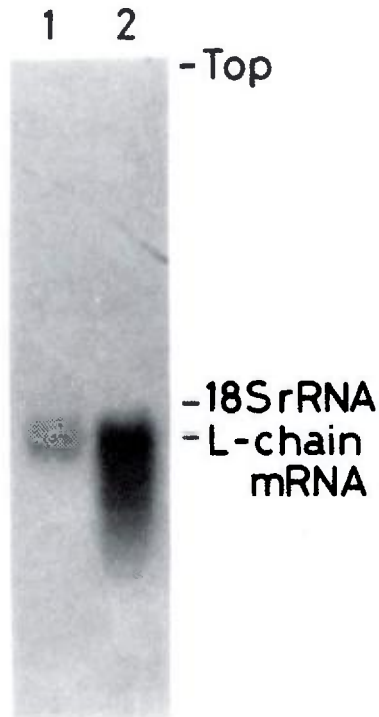


Fig. 5. Northern blotting analysis of L chain mRNA. Total RNA extracted from the posterior silk gland was subjected to electrophoresis and Northern blot hybridization.

Fig. 5. Analyse par buvardage Northern de l'ARNm de la chaîne L.

³²P-labeled cDNA clone pLA23 was used as a probe. Lane 1: Total RNA (20μg) from the posterior silk gland of Nd(2); Lane 2: Total RNA (20μg) from the posterior silk gland of J-131.

L'ARN total extrait du sécréteur de la glande séricigène a été soumis à électrophorèse et hybridation. Le clone d'ADNc pLA23 marqué au ³²P a été utilisé comme sonde. colonne 1 : ARN total (20μg) provenant du sécréteur de la glande séricigène de Nd(2) ; Colonne 2 : ARN total (20 μg) provenant du sécréteur de la glande séricigène de J-131.

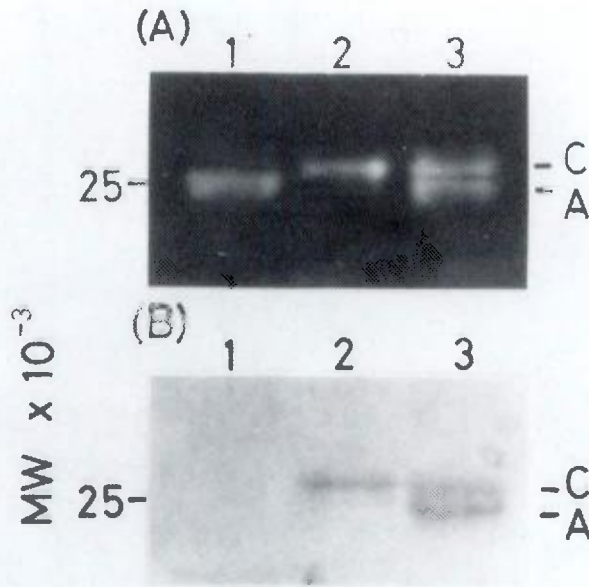


Fig. 6. Analysis of the translational product of L chain mRNA in the posterior silk gland cells of *Nd(2)*.

Fig. 6. Analyse du produit de la traduction de l'ARNm de la chaîne L dans les cellules du sécréteur de la glande séricigène de *Nd(2)*.

(A) Autoradiogram showing the L chain phenotypes in the tissue protein fraction. Tissue proteins (1 µg each) was subjected to SDS-12.5% PAGE after reduction with 2-mercaptoethanol, transferred, and reacted with the anti L chain serum, followed with ¹²⁵I-labeled protein A. (B) Phenotypes of L chain secreted into the lumen of the posterior silk gland. Fibroin secreted into the lumen was subjected to SDS-12.5% PAGE after reduction with 2-mercaptoethanol. Each lane was loaded with 5 µg of fibroin; stained with Coomassie Brilliant Blue. Lane 1: *Nd(2)/Nd(2)*; Lane 2: *Tamanashikasuri/Tamanashikasuri* (a normal producer); Lane 3: *Nd(2)/Tamanashikasuri*. C and A refer to genetic variants of L chain having different electrophoretic mobility (58).

(A) Autoradiogram montrant les phénotypes de la chaîne L dans la fraction protéique des tissus. Les protéines des tissus (1 µg de chaque) ont été soumises à électrophorèse en polyacrylamide 12,5 % avec SDS après réduction avec du 2-mercaptoéthanol, transférées, et mises en réaction avec le sérum anti-chaîne L, puis avec la protéine A marquée avec ¹²⁵I. (B) Phénotypes de la chaîne L présente dans le lumen du sécréteur de la glande séricigène. La fibroïne sécrétée dans le lumen a été soumise à PAGE-SDS à 12,5 % après réduction avec le 2-mercaptoéthanol, chaque colonne est chargée de 5 µg de fibroïne colorée avec du bleu de Coomassie. Colonne 1 : *Nd(2)/Nd(2)*; Colonne 2 : *Tamanashikasuri/Tamanashikasuri* (un producteur normal); Colonne 3 : *Nd(2)/Tamanashikasuri*. C et A représentent les variables génétiques de la chaîne L qui ont une mobilité électrophorétique différente (58).

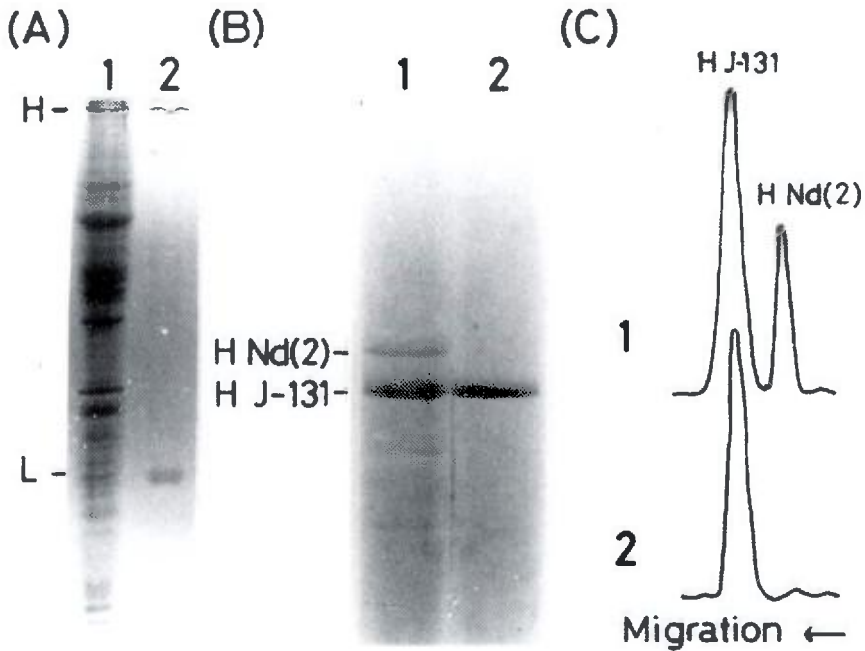


Fig. 7. Inhibition of secretion of the H chain derived from the *Nd(2)* allele in a hybrid silkworm, *Nd(2)/J-131*.

Fig. 7. Inhibi(tion de la sécrétion de la chaîne H provenant de l'allèle Nd(2) chez un ver à soie hybride, Nd(2)/J-131.

The secreted fibroin and the tissue proteins containing the intracellular fibroin of the posterior silk gland were subjected to SDS-12.5(A) or 4% (B) PAGE after reduction with 2-mercaptoethanol.

(A and B) Coomassie Brilliant Blue-stained gels; (C) densitometric tracing of the stained H chains in B. Lane 1: Tissue proteins (50 μ g) of the posterior silk gland; Lane 2: fibroin (5 μ g) secreted into the lumen.

La fibroïne sécrétée et les protéines du sécréteur de la glande séricigène contenant la fibroïne intracellulaire ont été soumises à PAGE SDS à 12,5 % (A) ou à 4 % (B) après réduction par le 2-mercaptoéthanol. A et B : gels colorés par le Bleu de Coomassie ; C : tracé densitométrique des chaînes H colorées présentes en B. Colonne 1 : protéines des tissus (50 μ g) du sécréteur ; colonne 2 : fibroïne (5 μ g) sécrétée dans le lumen.

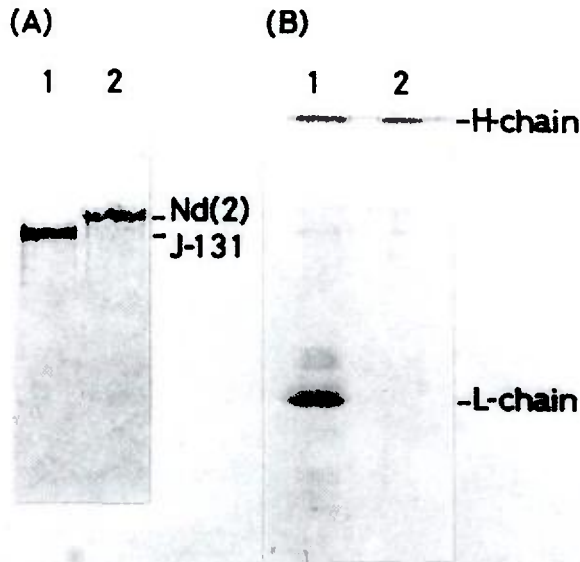


Fig. 8. Analysis of the H-L subunit structure of fibroins from the *Nd(2)* and the H-131 alleles in a hybrid silkworm, *Nd(2)/J-131*.

Fig. 8. Analyse de la structure des sous-unités H et L de la fibroïne provenant des allèles Nd(2) et J-131 chez un ver à soie hybride, Nd(2)/J-131.

Tissue proteins of the posterior silk gland were subjected to SDS-4% PAGE without treating with 2-mercaptoethanol, and fibroins from the *Nd(2)* and J-131 alleles were extracted separately from the gel. (A) Fibroins (3 μ g each) thus separated were subjected to SDS-4% PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue; (B) Fibroins (3 μ g each) from different alleles were subjected to SDS-15% PAGE after reduction with 2-mercaptoethanol and stained with Coomassie brilliant Blue; Lane 1: fibroin from the J-131 allele; Lane 2: fibroin from the *Nd(2)* allele.

Les protéines des tissus du sécréteur de la glande séricigène ont été soumises à PAGE SDS à 4 % sans traitement au 2-mercaptoéthanol, et les fibroïnes provenant des allèles Nd(2) et J-131 ont été extraites du gel séparément. (A) Les fibroïnes (3 μ g de chaque) ainsi extraites ont été soumises à PAGE SDS à 4 % et colorées par le Bleu de Coomassie. (B) Les fibroïnes (3 μ g de chaque) des différents allèles ont été soumises à PAGE SDS à 15% après réduction avec le 2-mercaptoéthanol et colorées par le Bleu de Coomassie. Colonne 1 : fibroïne de l'allèle J-131 ; Colonne 2 : fibroïne de l'allèle Nd(2).

a small amount of fibroin with no detectable L chain (Fig. 6B, lane 1). In the hybrid, *Nd(2)/Tamanashikasuri*, almost all of the H chain secreted into the lumen was the type from the *Tamanashikasuri* allele (the H chain from *Nd(2)* exhibited the slowest electrophoretic mobility among the silkworm strains tested). These results indicate that the L chain from the *Nd(2)* allele is functionally normal and can combine with the H chain from the *Tamanashikasuri* allele, resulting in the secretion of fibroin.

On the other hand, the secretion of the H chain from the *Nd(2)* allele was markedly reduced in a hybrid silkworm, *Nd(2)/J-131*, as shown in Fig. 7. The tissue materials of the posterior silk gland consisted of heterogeneous components (Fig. 7A, lane 1), whereas the secreted fibroin fraction is composed of fibroin H and L chains (Fig. 7A, lane 2). The same protein materials (reduced with 2-mercaptoethanol) were subjected to SDS-4% PAGE to examine the H chain region more precisely (Fig. 7B). The ratio of the H chain derived from the *Nd(2)* allele (H *Nd(2)*) to the H chain derived from the J-131 allele (H J-131) were 0.53 for the tissue proteins and <0.01 for the secreted fibroin (Fig. 7C). This fact indicates that secretion of H *Nd(2)* is reduced to a level < 2% of that of H J-131.

Fibroins derived from the *Nd(2)* and the J-131 alleles inside the posterior silk gland cells of the hybrid silkworm, *Nd(2)/J-131*, were separated on SDS-4% PAGE and extracted, respectively, in the absence of 2-mercaptoethanol and, then, the two fibroin preparations (Fig. 8A) were subjected to SDS-15% PAGE in the presence of 2-mercaptoethanol. As given in Fig. 8B, the fibroin derived from the J-131 allele contained L chain, but L chain was undetectable in the fibroin from the *Nd(2)* allele. In this system, L chains from the J-131 and *Nd(2)* alleles are indistinguishable, as both L chains show A type of electrophoretic mobility.

These results suggest that the absence of L chain in the fibroin of *Nd(2)* is likely to be caused by the failure of the formation of disulfide bond(s) between H and L chains due to some structural defect of the H chain. It is unlikely that the formation of the H-L subunit structure is prevented by the absence of an independent factor responsible for the formation of disulfide bond(s), because the H and L chains from the J-131 allele are associated and secreted normally in the same cellular milieu.

Similar evidence has been obtained by Takei *et al.* (65, 66) by using a *Nd-s* mutant, *Nd-s^D*, which carries a mutation very close to or within the fibroin L chain gene of the 14th chromosome. The *Nd-s^D* mutation was induced by chemical mutagenesis and has been fixed as a homozygous *Nd-s^D/Nd-s^D* strain by Gamo and Sato (67). Phenotypes of the strain are similar to those of the *Nd(2)/Nd(2)* (Fig. 4), although *Nd-s^D* and *Nd(2)* loci are linked to different chromosomes.

In Table II, amounts of DNA, RNA and fibroin secreted into the lumen per pair of posterior silk glands of the silkworm strains having the allelic combinations of *Nd-s^D/Nd-s^D*, *Nd-s^D/+*, and *+/+* (the homozygous wild-type alleles, *Tamanashikasuri*), are compared.

It is noted that the amount of fibroin secreted into the lumen in the *Nd-s^D/Nd-s^D* strain were less than 0.3% of that in the *+/+* strain, while the amounts of DNA and RNA in the posterior silk glands of the *Nd-s^D/Nd-s^D* strain were $\approx 10\%$ of those in the *+/+* strain. These results indicate that synthesis and/or secretion of fibroin are markedly suppressed in the presence of the homozygous *Nd-s^D* mutation. It is also noteworthy that the amount of fibroin secreted in the *Nd-s^D/+* strain was more than 175 times higher than that in the *Nd-s/Nd-s* strain, while the amounts of DNA and RNA per pair of posterior silk glands in the former strain were only about five times higher than those in the latter strain.

The fibroin secreted into the lumen of the posterior silk glands of the *Nd-s^D/Nd-s^D* strain was proved to consist of only the H chain, although the translational products of the L chain gene were present inside the cells of the posterior silk gland (Fig. 9). In the hybrid silkworm, *Nd-s^D/+*, the fibroin secreted into the lumen of the posterior silk gland was resolved into two bands of approximately equal intensity upon SDS-4% PAGE as shown in Fig. 10A, lane 2. The slowly moving fibroin consisted of the H chain from the *Nd-s^D* allele and the L chain from the J-131 allele (Fig. 10B, lane 1), and the fast moving fibroin was composed of the H chain from the J-131 allele and the L chain from the J-131 allele (Fig. 10B, lane 2). This result indicates that the L chain derived from *Nd-s^D* allele is unable to form disulfide linkage with both *Nd-s^D* H chain and J-131 chain.

Allelic Combination <i>Combinaison allélique</i>	DNA <i>ADN</i>		RNA <i>ARN</i>		Fibroin secreted <i>Fibroïne sécrétée</i>	
	Weight <i>Poids</i> µg	Relative ratio <i>Taux relatif</i>	Weight <i>Poids</i> µg	Relative ratio <i>Taux relatif</i>	Weight <i>Poids</i> µg	Relative ratio <i>Taux relatif</i>
+/+*	170	100	2640	100	29.5	100
<i>Nd-s^D/+</i>	84	49	1480	56	17.5	59
<i>Nd-s^D/Nd-s^D</i>	18	11	339	13	<0.1	<0.3

*The + allele represents the one in the Tamanashikasuri strain. Each analysis was made using five pairs of posterior silk glands from the larvae at the fourth day of the fifth instar.

L'allèle + représente celui de la souche Tamanashikasuri. Chaque analyse a été faite en utilisant 5 paires de sécréteurs de glande séricigène provenant de larves au 4ème jour du 5ème âge.

Table II. Amounts of DNA, RNA, and the secreted fibroin per pair of posterior silk glands of silkworm strains having different allelic combinations (66).

Tableau II. Quantités d'ADN, d'ARN et de fibroïne sécrétée par paire de sécréteurs de glandes séricigènes de souches de ver à soie avec des combinaisons alléliques différentes (66).

DISCUSSION

The L chain of fibroin has been demonstrated to play an important role in the secretory process of fibroin molecules synthesized in the endoplasmic reticulum of the posterior silk gland. As shown in Table I, the L chain is rather rich in hydrophobic amino acids such as Ala, Val, Ile and Leu, and also contains a considerable amount of acidic amino acids. Although amino acid sequence analysis of the L chain is still not completed, the possibility may be considered that there are at least two domains in the tertiary structure of L chain molecule, one is hydrophobic and the other is hydrophilic and probably acidic. This feature may provide a physiological function to the L chain that it stabilizes the H chain, which is essentially unstable in an aqueous solution. In other words, the L chain may act as a protective-colloidlike role in the cells and also in the lumen of the silk glands. The observation that the H chain in a dilute buffer (pH 7.0) tends to aggregate more rapidly than the fibroin in the same buffer may support the assumption mentioned above. This H chain-stabilizing action of the L chain may be necessary for a smooth progress of multi-stage processes of fibroin synthesis, where fibroin molecules synthesized on the posterior silk gland polysomes are transferred to Golgi apparatus through the membrane of endoplasmic reticulum, secreted into the lumen of the silk gland through the cell membrane, transmitted gradually to the middle silk gland, stored there a few days, and then spun through highly narrow ducts of the anterior silk gland. It is surprising that fibroin molecules, which are intrinsically liable to aggregate, move so smoothly along the long path way from the endoplasmic reticulum of the posterior silk glands to the orifice of spinneret.

As mentioned above, the cells of the posterior silk gland of *Nd(2)* are markedly diminutive compared with those of normal silkworm. Nakano (54), the first finder of *Nd(2)* strain, suggested from optical microscopic observations of the posterior silk gland cells of *Nd(2)* that some hindrance

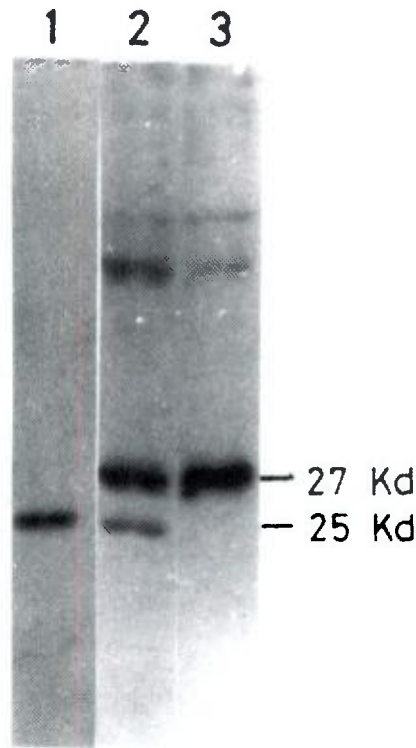


Fig. 9. Radioimmunochemical detection of the L chain in the tissue protein fraction from the posterior silk gland.

Fig. 9. Détection radioimmunochimique de la chaîne L dans la fraction protéique des tissus du sécréteur de la glande séricigène.

The tissue proteins were subjected to SDS-12.5% PAGE after reduction with 2-mercaptoethanol. The proteins were transferred, reacted with the anti L chain serum, followed with ^{125}I -labeled protein A, and autoradiography. The tissue protein fractions analyzed were from: Lane 1: the $+/+$ strain (Tamanashikasuri, a normal producer); Lane 2: the $Nd-s^D/+$ strain; Lane 3: the $Nd-s^D/Nd-s^D$ strain.

Les protéines des tissus ont été soumises à PAGE SDS à 12,5 % après réduction avec le 2-mercaptoéthanol. Les protéines ont été transférées, mises en réaction avec le sérum anti chaîne L, puis avec la protéine A marquée avec ^{125}I , et enfin autoradiographiées. Les fractions protéiques des tissus analysées proviennent de : Colonne 1 : la souche $+/+$ (Tamanashikasuri, un producteur normal) ; Colonne 2 : la souche $Nd-s^D/+$; Colonne 3 : la souche $Nd-s^D/Nd-s^D$.

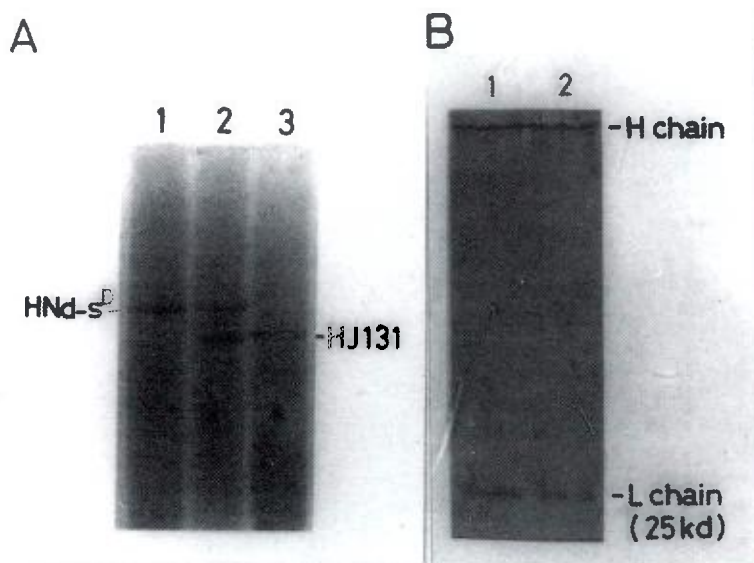


Fig. 10. (A) SDS-4% PAGE of the fibroin secreted into the lumen of the posterior silk gland.

Fig. 10.(A) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide à 4 % en présence de SDS de la fibroïne sécrétée dans le lumen du sécréteur de la glande séricigène.

The secreted fibroins (5 μ g each, without reduction) were from (lane 1) the $Nd-s^D/Nd-s^D$ strain; (lane 2) the $Nd-s^D/+$ strain; (lane 3) the $+/+$ strain (J-131).

Les fibroïnes sécrétées (5 μ g de chaque, sans réduction) proviennent de (colonne 1) la souche $Nd-s^D/Nd-s^D$; (colonne 2) la souche $Nd-s^D/+$; (colonne 3) la souche $+/+$ (J-131).

Fig. 10. (B) SDS-12.5% PAGE of the fibroin extracted from each band in A, lane 2 after reduction with 2-mercaptoethanol.

Fig. 10. (B) PAGE SDS à 12,5 % de la fibroïne extraite de chaque bande en A, colonne 2, après réduction avec le 2-mercaptoéthanol.

Lane 1: the fibroin containing the H chain from the $Nd-s^D$ allele; Lane 2: the fibroin containing the H chain from the $+$ (J-131) allele.

Colonne 1 : la fibroïne contenant la chaîne H provenant de l'allèle $Nd-s^D$; colonne 2 : la fibroïne contenant la chaîne H provenant de l'allèle $+$ (J-131).

to the secretion of liquid fibroin into the lumen of the gland might occur. Recently, Gamo and Sato (67) have carried out electron microscopic studies on the posterior silk gland of $Nd-s^D/Nd-s^D$ and $Nd-s^D/+$ strains and found that the endoplasmic reticulum was abnormally enlarged, but development of the Golgi apparatus and fibroin secretory vesicles were undetectable in the $Nd-s^D/Nd-s^D$ strain. On the other hand, the Golgi apparatus was moderately developed in the $Nd-s^D/+$ strain, although the endoplasmic reticulum was still fairly enlarged. From these observations they suggested that the transport of fibroin from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex is blocked in the $Nd-s^D/Nd-s^D$ strain.

During the last decade a great number of reports concerning the transport of the proteins synthesized in the endoplasmic reticulum has been presented (68). Secretory component (SC), a glycoprotein that is synthesized by glandular epithelial cells, has been proposed to function in the transepithelial transport of immunoglobulin (Ig) (69-71). It serves first as an Ig receptor at the basolateral surface of the glandular epithelial cell. The SC-Ig complex formed undergoes exocytosis and appears in the lumen as a soluble SC-Ig complex, that is, SC serves as a soluble secretory protein.

Gething *et al.* (72) have analyzed the intracellular transport of influenza virus hemagglutinin (HA) from its site of synthesis in the endoplasmic reticulum through the Golgi complex along the exocytic pathway, using wild and mutant types of HA. Their results suggest that correct folding and trimerization are essential for movement of HA from the endoplasmic reticulum. A similar result was obtained for the G glycoprotein of vesicular stomatitis virus that formation of an oligomer of G protein, probably a trimer, is necessary for G protein transport from endoplasmic reticulum to the Golgi complex and for its subsequent maturation (73). A cellular protein of 77 kD first identified as an immunoglobulin heavy chain binding protein (BiP) (75) was shown to play an important role in the transport of the heavy chain (76-78). BiP is considered to facilitate oligomerization and/or folding of immunoglobulin heavy chains in the lumen of the endoplasmic reticulum, resulting in disaggregating incorrectly folded proteins and permitting their export.

Taking all these reports into account, it is likely that the L chain subunit of fibroin facilitates appropriate folding of the H chain in the endoplasmic reticulum of the posterior silk gland cell. The correctly folded molecules of fibroin (liquid fibroin) may be prevented from aggregation during the intracellular transport and secretion. Further studies on the fine structure of the L chain and also the conformational changes of both the H and L chains caused by their complex formation, will serve for elucidation of biochemical and physiological function of the L chain in the synthesis and secretion of fibroin.

REFERENCES

1. SHIMURA K. (1978) Synthesis of silk proteins. In: *The Silkworm: an important laboratory tool* (ed. Tajima Y.), Kodansha, Tokyo. pp. 189-211.
2. SUZUKI Y. (1975) Fibroin messenger RNA and its genes. In: *Adv. Biophys.* (ed. Kotani M.) Univ. Tokyo Press/ Univ. Park Press, Tokyo/Baltimore, vol. 8, 83-114.
3. SUZUKI Y. (1977) Differentiation of the silk gland: a model system for the study of differential gene action. In: *Results and problems in cell differentiation* (ed. Beermann W.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, vol.8, 1-44.
4. DAILLIE J., LEGAY J.M., GAREL J.P. (1979) The Silkworm, a model system. *Biochimie*, 61, 137-320.
5. SHIMURA K. (1983) The physiology and biology of spinning in *Bombyx mori*. *Experientia*, 39, 441-473.
6. AKAI H. (1984) The Ultrastructure and functions of the silk gland cells of *Bombyx mori*. In: *Insect ultrastructure* (eds. King R.C. and Akai H.) Plenum, New York, vol. 2, 323-364.
7. TASHIRO Y., OTSUKI E. (1970) Studies on the posterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*. IV. Ultracentrifugal analyses of native silk proteins, especially fibroin extracted from the middle silk gland of the mature silkworm. *J. Cell Biol.*, 46, 1-16.
8. TASHIRO Y., OTSUKI E. (1970) Dissociation of native fibroin by sulfhydryl compounds. *Biochim. Biophys. Acta*, 214, 265-271.

9. TASHIRO Y., OTSUKI E., SHIMADZU T. (1972) Sedimentation analyses of native silk fibroin in urea and guanidine-HCl. *Biochim. Biophys. Acta*, 257, 198-209.
10. TASHIRO Y. (1980) Molecular weight and subunit structure of fibroin. In: *Structure of the silk fiber II* (ed. Hojo N.), Shinkyo Publ., Nagano, Japan, 121-144.
11. SASAKI T., NODA H. (1973) Studies on silk fibroin of *Bombyx mori* directly extracted from the silk gland. I. Molecular weight determination in guanidine hydrochloride or urea solution. *Biochim. Biophys. Acta*, 310, 76-90.
12. SASAKI T., NODA H. (1973) Studies on silk fibroin of *Bombyx mori* directly extracted from the silk gland. II. Effect of disulfide bonds and subunit structure. *Biochim. Biophys. Acta*, 310, 91-103.
13. SASAKI T., NODA H. (1974) Studies on silk fibroin of *Bombyx mori* directly extracted from the silk gland. III. N-terminal analysis and degradation in a slightly alkaline solution. *J. Biochem.*, 76, 493-502.
14. SHIMURA K., KIKUCHI A., OHTOMO K., KATAGATA Y., HYODO A. (1976) Studies on silk fibroin of *Bombyx mori*. I. Fractionation of fibroin prepared from the posterior silk gland. *J. Biochem.*, 80, 693-702.
15. SPRAGUE K.U. (1975) The *Bombyx mori* silk proteins: characterization of large polypeptides. *Biochemistry*, 14, 925-931.
16. SHIMURA K., KIKUCHI A., KATAGATA Y., OHOTOMO K. (1982) The occurrence of small component proteins in the cocoon fibroin of *Bombyx mori*. *J. Seric. sci. Jpn.*, 51, 20-26.
17. TOKUTAKE S. (1980) Isolation of the smallest component of silk protein. *Biochem. J.*, 187, 413-417.
18. KATAGATA Y., KIKUCHI A., SHIMURA K. (1984) Characterization of the crystalline-region peptides of fibroin prepared from the posterior silk gland. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 53, 165-174.
19. KATAGATA Y., KIKUCHI A., SHIMURA K. (1984) Fractionation and characterization of the amorphous-region peptides of fibroin prepared from the posterior silk gland. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 53, 226-236.
20. GAREL J.P., MANDEL P., CHAVANCY G., DAILLIE J. (1970) Functional adaptation of tRNAs to fibroin biosynthesis in the silk gland of *Bombyx mori* L. *FEBS Lett.*, 7, 327-329.
21. CHAVANCY G., GAREL J.P., DAILLIE J. (1971) Functional adaptation of aminoacyl-tRNA synthetases to fibroin biosynthesis in the silk gland of *Bombyx mori* L. *FEBS Lett.*, 49, 380-384.
22. MAJIMA R., KAWAKAMI M., SHIMURA K. (1975) The biosynthesis of transfer RNA in insects. I. Increase of amino acid acceptor activity of specific tRNAs utilized for silk protein biosynthesis in the silk gland of *Bombyx mori*. *J. Biochem.*, 78, 391-400.
23. DELANEY P., SIDDIQUI M.A.Q. (1975) Changes in *in vivo* levels of charged transfer RNA species during development of the posterior silk gland of *Bombyx mori*. *Develop. Biol.*, 44, 54-62.
24. SUZUKI Y., SUZUKI E. (1974) Quantitative measurement of fibroin mRNA synthesis in the posterior silk gland of normal and mutant *Bombyx mori*. *J. Mol. Biol.*, 88, 393-407.
25. MAEKAWA H., SUZUKI Y. (1980) Repeated turn-off and turn-on of fibroin gene transcription during silk gland development of *Bombyx mori*. *Develop. Biol.*, 78, 394-406.
26. PRUDHOMME J.C., COUBLE P. (1979) The adaptation of the silk gland cell to the production of fibroin in *Bombyx mori* L. *Biochimie*, 61, 215-227.
27. CHAVANCY G., FOURNIER A. (1979) Effect of starvation on tRNA synthesis, amino acid pool, tRNA charging levels and aminoacyl-tRNA synthetase activities in the posterior silk gland of *Bombyx mori* L. *Biochimie*, 61, 229-243.
28. PAVE A. (1979) Dynamics of macromolecular populations: a mathematical model of the quantitative changes of RNA in the silk gland during the last larval instar. *Biochimie*, 61, 263-273.
29. DAILLIE J. (1979) Juvenile hormone modifies larvae and silk gland development in *Bombyx mori*. *Biochimie*, 61, 275-281.
30. OHMACHI T., NAGAYAMA H., SHIMURA K. (1982) The isolation of a messenger RNA coding for the small subunit of fibroin from the posterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*. *FEBS Lett.*, 146, 385-388.

31. SUZUKI Y., BROWN D.D. (1972) Isolation and identification of the messenger RNA for silk fibroin from *Bombyx mori*. J. Mol. Biol., 63, 409-429.
32. COUBLE P., GAREL A., PRUDHOMME J.C. (1981) Complexity and diversity of polyadenylated mRNA in the silk gland of *Bombyx mori*: changes related to fibroin production. Develop. Biol., 82, 139-149.
33. COUBLE P., MOINE A., GAREL A., PRUDHOMME J.C. (1983) Developmental variations of a nonfibroin mRNA of *Bombyx mori* silkgland, encoding for a low-molecular-weight silk protein. Develop. Biol., 97, 398-407.
34. CHEVILLARD M., COUBLE P., PRUDHOMME J.C. (1986) Complete nucleotide sequence of the gene encoding the *Bombyx mori* protein P25 and predicted amino acid sequence of the protein. Nucleic Acids Res., 14, 6341-6342.
35. GAMO T., INOKUCHI T., 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.
36. EJIRI S., TAIRA H., SHIMURA K. (1972) Preparation and some properties of three amino acid polymerization factors from silk gland of silkworm. J. Biochem., 72, 391-401.
37. TAIRA H., EJIRI S., SHIMURA K. (1974) Purification and some properties of G-factor from the silk gland of silkworm. J. Biochem., 72, 1527-1535.
38. EJIRI S., MURAKAMI K., KATSUMATA T. (1977) Elongation factor 1 from the silk gland of silkworm. Purification and some properties of its γ subunit having EF-1b activity. FEBS Lett., 82, 111-114.
39. EJIRI S., MURAKAMI K., KATSUMATA T. (1978) Elongation factor 1 from the silk gland of silkworm. Reconstitution of EF-1_M from its subunits, EF-1a and EF-1bc. FEBS Lett., 92, 251-254.
40. MURAKAMI K., EJIRI S., KATSUMATA T. (1978) Elongation factor 1 from the silk gland of silkworm. Effect of EF-1a- and ribosome-dependent GTPase activity. FEBS Lett., 92, 255-257.
41. EJIRI S., NAOKI Y., MURAKAMI K., KATSUMATA T. (1978) Exchangeability of silk gland elongation factor 1b and pig liver elongation factor 1 β in polypeptide chain elongation. FEBS Lett., 95, 277-280.
42. OYAMA F., MIZUNO S., SHIMURA K. (1984) Predominant synthesis of fibroin heavy and light chains on the membrane-bound polysomes prepared from the posterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Biochem., 96, 1143-1153.
43. OYAMA F., MIZUNO S., SHIMURA K. (1984) Studies on immunological properties of fibroin heavy and light chains. J. Biochem., 96, 1689-1694.
44. KIMURA K., OYAMA F., UEDA H., MIZUNO S., SHIMURA K. (1985) Molecular cloning of the fibroin light chain complementary DNA and its use in the study of the expression of the light chain gene in the posterior silk gland of *Bombyx mori*. Experientia, 41, 1167-1171.
45. COUBLE P., CHEVILLARD M., MOINE A., RAVEL-CHAPUIS P., PRUDHOMME J.C. (1985) Structural organization of the P25 gene of *Bombyx mori* and comparative analysis of its 5' flanking DNA with that of the fibroin gene. Nucleic Acids Res., 13, 1801-1814.
46. TSUJIMOTO Y., SUZUKI Y. (1979) Structural analysis of the fibroin gene at the 5' end and its of surrounding regions. Cell, 16, 425-436.
47. TSUJIMOTO Y., SUZUKI Y. (1979) The DNA sequence of *Bombyx mori* fibroin gene including the 5' flanking, mRNA coding, entire intervening and fibroin protein coding regions. Cell, 18, 591-600.
48. TSUDA M., SUZUKI Y. (1983) Transcription modulation *in vitro* of the fibroin gene exerted by a 200-base-pair region upstream from the "Tata" box. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 7442-7446.
49. KUSUDA J., TAZIMA Y., ONIMARU K., NINAKI O., SUZUKI Y. (1986) The sequence around the 5' end of the fibroin gene from the wild silkworm, *Bombyx mandarina*, and comparison with that of the domesticated species, *B. mori*. Mol. gen. Genet., 203, 359-364.
50. TAMURA T., INOUE H., SUZUKI Y. (1987) The fibroin genes of *Antheraea yamamai* and *Bombyx mori* are different in their core regions but reveal a striking sequence similarity in their 5' ends and 5' flanking regions. Mol. Gen. Genet., 207, 189-195.
51. SPRAGUE K.U., ROTH M.B., MANNIG R.F., GAGE L.P. (1979) Alleles of the fibroin gene coding for proteins of different lengths. Cell, 17, 407-413.

52. HYODO A., SHIMURA K. (1980) The occurrence of hereditary variants of fibroin in the silkworm, *Bombyx mori*. Jpn. J. Genet., 55, 203-209.
53. HYODO A., GAMO T., SHIMURA K. (1980) Linkage analysis of the fibroin gene in the silkworm, *Bombyx mori*. Jpn. J. Genet., 55, 297-300.
54. DOIRA H. (1983) Linkage maps of *Bombyx mori* - Status quo in 1983. Sericologia, 23, 245-269.
55. DOIRA H., NAKAYAMA H., KAWAGUCHI Y., KIHARA H. (1985) Linkage studies of *Bombyx mori*: discovery of the twenty-fifth linkage group, Naked and y-translucent. J. Seric. Sci. Jpn., 54, 222-226.
56. NAKAYAMA M., DOIRA H., WATANABE T. (1987) Linkage studies of the fibroin heavy chain gene in *Bombyx mori*. Sci. Bull. Fac. Agr. Kyushu Univ., 42, 27-35.
57. NAKAYAMA M., DOIRA H., BANNO Y. (1988) Revision of the genetic map of the linkage group 23 in *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn., 57, 53-56.
58. HYODO A., YAMAMOTO T., UEDA H., TAKEI F., KIMURA K., SHIMURA K. (1984) Linkage analysis of the fibroin light chain gene in the silkworm, *Bombyx mori*. Jpn. J. Genet., 59, 285-296.
59. THE JAPANESE SOCIETY OF SERICULTURAL SCIENCE (1986) Gene name and gene symbol of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn., 55, 95-111.
60. NAKANO Y. (1951) Physiological, anatomical and genetical studies on the "Naked" silkworm pupa. J. Seric. Sci. Jpn., 20, 232-248.
61. WATANABE T. (1951) Studies of the sericin cocoon, (1) Chemical properties of the domestic silkworm spinning sericin cocoon. J. Seric. Sci. Jpn., 28, 251-256.
62. HORIUCHI Y., NAMISHIMA C., NAKAMURA K., YASUE N. (1963) On the sericin cocoon mutant discovered in a Burmese race of the silkworm. J. Seric. Sci. Jpn., 32, 195-196.
63. HYODO A., UEDA H., TAKEI F., KIMURA K., SHIMURA K. (1982) Gene expression of two fibroin alleles in the hybrid silkworm, J-131/*Nd*(2). Jpn. J. Genet., 57, 551-560.
64. TAKEI F., OYAMA F., KIMURA K., HYODO A., MIZUNO S., SHIMURA K. (1984) Reduced level of secretion and absence of subunit combination for the fibroin synthesized by a mutant silkworm, *Nd*(2). J. Cell Biol., 99, 2005-2010.
65. TAKEI F., KIMURA K., MIZUNO S., YAMAMOTO T., SHIMURA K. (1984) Genetic analysis of the *Nd-s* mutation in the silkworm, *Bombyx mori*. Jpn. J. Genet., 59, 307-313.
66. TAKEI F., KIKUCHI Y., KIKUCHI A., MIZUNO S., SHIMURA K. (1987) Further evidence for importance of the subunit combination of silk fibroin in its efficient secretion from the posterior silk gland cells. J. Cell Biol., 105, 175-180.
67. GAMO T., SATO S. (1985) Ultrastructural study of the posterior silk gland in the *Nd*, *Nd-s* and *Nd-s'* mutants with a defect of fibroin synthesis. J. Seric. Sci. Jpn., 54, 412-419.
68. PFEFFER S.R., ROTHMAN J.E. (1987) Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. Ann. Rev. Biochem., 56, 829-852.
69. MOSTOV K.E., KRAEHENBUHL J.P., BLOBEL G. (1980) Receptor-mediated transcellular transport of immunoglobulin: synthesis of secretory component as multiple and larger trans-membrane forms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 7257-7261.
70. MOSTOV K.E., FRIEDLANDER M., BLOBEL G. (1984) The receptor for transepithelial transport of IgA and IgM contains multiple immunoglobulin-like domains. Nature, 308, 37-43.
71. MOSTOV K.E., KOPS A.B., DEITCHER D.L. (1986) Deletion of the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor prevents basolateral localization and endocytosis. Cell, 47, 359-364.
72. GETHING M.J., MC-CAMMOM K., SAMBROOK J. (1986) Expression of wild-type and mutant forms of influenza hemagglutinin: The role of folding in intracellular transport. Cell, 46, 939-950.
73. KEIS T.E., LODISH H.F. (1986) Oligomerization is essential for transport of vesicular stomatitis viral glycoprotein to the cell surface. Cell, 46, 929-937.
74. COPELAND C.S., DOMS R.W., BOLZAU E.V., WEBSTER R.G., HELENIUS A. (1986) Assembly of influenza hemagglutinin trimers and its role in intracellular transport. J. cell Biol., 103, 1179-1191.

75. HAAS I.G., WABL M. (1983) Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature*, 306, 387-389.
76. BOLE D.G., HENDERSHOT L.M., KEARNEY J.F. (1986) Post-translational association of immunoglobulin heavy chain binding protein with nascent heavy chains in non secreting and secreting hybridomas. *J. Cell Biol.*, 102, 1558-1566.
77. MUNRO S., PELHAM H.R.B. (1986) An Hsp70-like protein in the ER: Identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell*, 46, 291-300.
78. MUNRO S., PELHAM H R B. (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins; *Cell*, 48, 899-907.

STRUCTURE, SYNTHÈSE ET SÉCRÉTION DE LA FIBROÏNE CHEZ LE VER À SOIE *BOMBYX MORI*

K. SHIMURA

Department of Agricultural Chemistry, Tohoku University, Sendai 980, Japon.

La fibroïne de *Bombyx mori* est composée d'une chaîne lourde (chaîne H, 350 kD) et d'une chaîne légère (chaîne L, 25 kD) connectées par des liens disulfures. Des variantes héréditaires des chaînes H et L ont été détectées et des analyses de linkage des gènes des chaînes H et L ont été effectuées, en utilisant des vers à soie porteurs des gènes variants de la chaîne H ou L. On a découvert que les gènes des deux chaînes sont liés à des chromosomes différents, c'est-à-dire que le gène de la chaîne H est lié au gène Nd situé sur le chromosome 25, et que le gène de la chaîne L est lié au gène Nd-s situé sur le chromosome 14. Le sécréteur de la glande séricigène de Nd(2), l'une des souches de type Nd est de taille extrêmement courte et sécrète seulement une petite quantité de fibroïne dans le lumen de la glande. On a observé que la fibroïne de Nd(2) ne contient pas de chaîne L, bien que l'ARNm de la chaîne L soit présent et que la chaîne L soit synthétisée dans les cellules du sécréteur de la glande séricigène de ce mutant. La mutation Nd(2) ne peut être dissociée du gène structural de la chaîne H. Il est donc fort probable que la chaîne H de Nd(2) ait une anomalie structurale qui interfère avec la formation du ou des lien(s) disulfure(s) avec la chaîne L, ce qui entraîne une forte diminution de l'activité de sécrétion de la fibroïne chez les cellules du sécréteur. Des observations similaires ont été faites chez la souche mutante Nd-s. Un locus responsable de la mutation Nd-s a été cartographié tout près ou au sein du gène de la chaîne L sur le chromosome 14. La petite quantité de fibroïne sécrétée dans le lumen du sécréteur de Nd-s est également constituée par la chaîne H uniquement. Tous les résultats présentés ici suggèrent que la combinaison des sous-unités H et L de la fibroïne est essentielle pour avoir une sécrétion efficace de fibroïne. Nous étudierons ici la fonction physiologique de la chaîne L dans les processus de transport intracellulaire et de sécrétion de la fibroïne chez la glande séricigène.

INTRODUCTION

Au milieu des années 50, le ver à soie *Bombyx mori* a été d'abord utilisé en biologie moléculaire comme modèle pour des études sur la biosynthèse des protéines chez les eucaryotes. Depuis, de nombreuses recherches intensives sur la biosynthèse des protéines de la soie se sont accumulées. Des articles de synthèse ont été publiés concernant un essai de construction d'un système acellulaire de synthèse de la fibroïne (1), l'isolement de l'ARNm de la fibroïne (2, 3), un inventaire exhaustif des recherches sur le Ver à soie comprenant le développement de l'oeuf, la régulation endocrinologique, et la synthèse adaptée de l'ARNt (4), la physiologie et la biologie du filage du cocon chez *Bombyx mori* (5), et des études ultrastructurales des cellules de la glande séricigène de *Bombyx mori* (6).

L'objet de cet article est de présenter l'hypothèse solide selon laquelle la molécule de fibroïne est composée de chaînes lourde et légère liées par des liens disulfures et que ce caractère de la structure des sous-unités favorise la synthèse et la sécrétion efficaces de la fibroïne chez les cellules de la glande séricigène de *Bombyx mori*, et rendrait les molécules de fibroïne stables et transportables dans le milieu cellulaire.

I. STRUCTURE EN SOUS-UNITÉS DE LA FIBROÏNE

On a longtemps pensé que la fibroïne de *Bombyx mori* était composée d'une seule chaîne longue polypeptidique. Récemment il est apparu plus probable que la fibroïne possède une structure en sous-unités. Tashiro et Ohtsuki (7-10) ont, les premiers, démontré que la fibroïne liquide directement préparée à partir du réservoir de la glande séricigène de *Bombyx mori* est composée d'un composant majeur homogène et de composants mineurs hétérogènes à faible poids moléculaire connectés entre eux par des liens disulfures. Les poids moléculaires de la fibroïne native et du composant majeur de fibroïne réduite dans la guanidine-HCl 6,0 M ont été déterminés respectivement à environ $M_r 3,7 \times 10^5$ et $M_r 3,0 \times 10^5$, par analyse de sédimentation à l'équilibre. Un résultat similaire a également été obtenu par Sasaki et Noda (11, 12) par sédimentation : la molécule de fibroïne ($M_r 3,6 \times 10^5$) serait composée de trois petits composants de $M_r 2,6 \times 10^4$ et d'un grand composant de $M_r 2,8 \times 10^5$, liés par des ponts disulfures. Au cours de ces expériences, cependant, la préparation de fibroïne a pu être dégradée par certaines protéases à sérine provenant peut-être de cellules abîmées de l'appareil digestif, et/ou de la glande séricigène de la larve mises en évidence par analyse du N-terminal, électrophorèse sur gel et centrifugation (13). La taille exacte des petites sous-unités liées avec la grande sous-unité restaient donc à élucider.

Pour éviter la dégradation protéolytique au cours de la solubilisation de la fibroïne, nous avons utilisé une préparation de fibroïne provenant du sécréteur de la glande séricigène du ver à soie (14). En bref, les sécréteurs des glandes séricigènes de larves au 5ème jour du 5ème âge ont été disséqués, lavés dans une solution glacée de KCl à 1,15 % et immergés immédiatement après dans une solution glacée d'éthanol à 30 %, et laissés pendant une nuit à 4°C. La fibroïne coagulée dans le lumen de la glande se distingue facilement des protéines des tissus par sa forme allongée et son aspect vitreux. La fibroïne est détachée des tissus de la glande qui l'entourent à l'aide d'une petite pince. La fibroïne obtenue est lavée plusieurs fois avec de l'eau déminéralisée, puis successivement dans une solution à 50 % d'éthanol, de l'éthanol pur et de l'éther, et gardée dans un dessiccateur. Cette méthode a l'avantage d'éliminer les risques de dégradation des molécules de fibroïne par les protéases des tissus et/ou soumettre la fibroïne à des conditions alcalines.

La fibroïne ainsi obtenue est dissoute dans 10 à 15 volumes (vol/pds) de LiSCN à 60 % (pH 7,0), additionné de 2-mercaptoéthanol et carboxyméthylée avec du monoiodoacétate dans l'urée 5M Tris Hcl 0,02 M, pH 8,0. La fibroïne carboxyméthylée donne deux pics distincts après élution sur Séphadex G-200. Il a été prouvé que les pics majeur et mineur contiennent des chaînes lourde et légère de molécules de fibroïne. Le rapport des surfaces des deux pics d'élution obtenus par absorption à 280 nm est de 92:8.

Bien que la structure en sous-unités de la fibroïne ait été pratiquement déterminée, la question restait de savoir si la petite unité de fibroïne était un contaminant ou faisait partie intégrante de la fibroïne (15). Une des raisons de lever cette ambiguïté provient peut-être du fait que toutes les études effectuées jusqu'alors sur la présence d'un petit composant chez la fibroïne ont été faites avec de la fibroïne préparée à partir de la région postérieure du réservoir de la glande séricigène et que le problème de la contamination par les protéines des tissus restait posé. Cette question a été résolue par l'isolement du petit composant à partir des protéines du cocon de *Bombyx mori*, lequel composant est totalement identique à celui de la fibroïne provenant du sécréteur de la glande séricigène en ce qui concerne la composition en acides aminés et les profils d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS (16, 17).

De plus, une expérience semi-quantitative a été effectuée sur la préparation des petit et grand composants du cocon. En partant de 1,0 g de protéines du cocon, on obtient environ 35 mg du petit composant et 503 mg du grand composant, indiquant que la quantité de petit composant chez la fibroïne du cocon représente environ 7 % du poids (16).

Ces résultats nous ont amenés à la conclusion que la molécule de fibroïne est composée d'une mole de chacune des sous-unités grande et petite liées par un (des) pont(s) disulfure(s), si l'on considère que les poids moléculaires des sous-unités grande et petite sont respectivement de $3,5 \times 10^4$ et $2,5 \times 10^4$. Sasaki et Noda (12) ont suggéré que la molécule de fibroïne était composée d'un grand composant d'un poids moléculaire de $2,8 \times 10^5$ et de trois petits composants d'un poids

moléculaire de $2,6 \times 10^4$. Cette proposition n'est pas en accord avec les données que nous avons obtenues. Ce désaccord semble venir principalement des raisons suivantes. Ces chercheurs ont estimé à trois le nombre de petits composants en postulant que la quantité (poids/poids) des petits composants est de 20 % et que les poids moléculaires de la fibroïne non réduite et du petit composant sont respectivement de $3,65 \times 10^5$ et $2,6 \times 10^4$. Au contraire, nous avons toujours obtenu des résultats expérimentaux montrant que la quantité de petit composant de la fibroïne est d'environ 7 %, ce qui correspond environ à $(2,5 \times 10^4 / 3,7 \times 10^5) \times 100$ (16, 18). Ceci suggère que le rapport du grand et du petit composant dans la fibroïne est de 1:1. Bien que la structure de la fibroïne n'ait pas encore été complètement élucidée, il est maintenant hors de doute que sa structure en sous-unités soit composée d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère. Nous donnerons donc désormais les noms de chaîne lourde (chaîne H) au grand composant et de chaîne légère (chaîne L) au petit composant (Fig. 1).

Le Tableau I présente la composition en acides aminés des chaînes H et L. La chaîne H montre une composition en acides aminés typique de la fibroïne, c'est-à-dire abondante en glycine et en alanine, avec un rapport glycine:alanine de presque exactement 3:2. D'un autre côté, la composition de la chaîne L est à l'évidence différente du type fibroïne. Il est intéressant de noter que le contenu en glycine et en alanine de la chaîne H est plus élevé que celui de la fibroïne intacte, et au contraire, les autres acides aminés contenus dans la chaîne H sont tous en moindre quantité que dans la fibroïne intacte. Ces résultats indiquent qu'une quantité importante d'acides aminés que l'on considérerait exister dans les régions amorphes des molécules de fibroïne devrait être transférée dans la famille d'acides aminés de la chaîne L. Katagata *et al.* (19) ont démontré que presque tous les peptides de la région amorphe obtenus par digestion chymotryptique de la chaîne H ont principalement une séquence d'acides aminés du type région cristalline, c'est-à-dire que les résidus de glycine apparaissent alternativement le long des chaînes peptidiques observées jusqu'ici, tandis que la longueur de la chaîne peptidique est bien plus courte que celle des peptides de la région cristalline obtenus en précipité au cours de la digestion chymotryptique de la chaîne H. Il semble donc possible de postuler que les résidus de glycine occupent des positions en alternance d'un bout à l'autre de la chaîne H. Dans ce cas, l'usage, adopté depuis longtemps, des termes région "cristalline" et "amorphe" chez les molécules de fibroïne doit être remis en cause car la question se pose de savoir si les peptides du surageant provenant de la digestion chymotryptique de la chaîne H existent réellement au stade amorphe dans une fibre de fibroïne.

II. BIOSYNTHESE DE LA FIBROÏNE

Au cours de la vie larvaire de *Bombyx mori*, les cellules de la glande séricigène subissent un développement cyclique lié à la succession des mues et intermues régulée par des hormones. Après la 4ème mue, les activités métaboliques des larves augmentent de façon marquée jusqu'à la production massive des protéines de la soie, et la glande séricigène grossit de façon exponentielle jusqu'au 6ème jour du 5ème âge. Dans le sécréteur a lieu la synthèse rapide de l'ADN et de l'ARN pendant la première moitié du 5ème âge. Leur production maximale par jour se situe le 3ème jour, tandis que la synthèse maximale de fibroïne se situe au 6ème jour (5). Le terme ARN englobe l'ARNr, l'ARNt et l'ARNm. Parmi ceux-ci, l'ARNr et l'ARNt montrent pratiquement les mêmes changements que l'ARN total alors que la quantité d'ARNm de fibroïne augmente (24) jusqu'au 6ème jour du 5ème âge. Bien que ces résultats aient été obtenus lors d'une étude préliminaire (20, 21), assez peu de preuves se sont ajoutées depuis pour que l'on soupçonne qu'une expression séquentielle des gènes impliqués dans le mécanisme de synthèse protéique soit précisément régulée dans la glande séricigène au 5ème âge larvaire (22, 23, 25, 26, 27, 28, 29).

Alors que la structure de la fibroïne en sous-unités a été établie, sont apparues de nouvelles questions concernant la biosynthèse de la chaîne L, ainsi que celle de la chaîne H, et la formation des ponts disulfures entre les deux sous-unités. Ohmachi et Shimura (30) ont démontré que la fraction d'ARN contenant les séquences poly A préparée à partir du sécréteur de la glande séricigène fournissait une fraction supplémentaire d'ARN de plus petite taille que celle de l'ARNm de fibroïne étudié par Suzuki et Brown (31). On suggéra que le nouvel ARN était l'ARN messenger codant la

fibroïne de la chaîne L après analyse de son produit de traduction par électrophorèse sur gel et immunologie. Couble *et al.* (32, 33) ont également isolé un ARN contenant un poly A à partir du sécréteur de la glande séricigène, codant pour une protéine de la soie (P25) de 25 kD. Un parallélisme étroit des pools cellulaires de l'ARNm de P25 et de l'ARNm de la fibroïne au cours de la dernière intermue larvaire a été démontré, ce qui indique un ajustement strict du taux de transcription de leur gène.

D'après les résultats de Couble *et al.* (33), l'ARNm de P25 semble au premier abord être semblable à l'ARNm de la chaîne L isolé par Ohmachi et Shimura (34). Récemment cependant il est devenu évident que la composition en acides aminés de P25, déduite d'après la séquence génomique (34), est significativement différente de celles de la chaîne L des fibroïnes isolées à partir du sécréteur et des cocons : en particulier dans le contenu en Gly, Ala, Phe, Thr, Pro, Lys, His, Arg et Cys. Il a été observé que des petits polypeptides associés à la fibroïne comprennent un composant majeur et au moins un composant mineur (16, 35) qui ont une mobilité électrophorétique légèrement différente. Nous pensons donc maintenant que P25 correspond peut-être à un composant mineur. Des relations fonctionnelles et d'évolution entre la chaîne L et P25 n'ont pas encore été élucidées.

La biosynthèse de la fibroïne dans un système acellulaire a été étudiée de manière extensive pendant deux décennies (36, 41). Dans ces travaux, l'attention a été portée uniquement vers la synthèse de la chaîne H et, pour cette raison, on ne dispose d'informations sur la synthèse de la chaîne L que depuis très peu de temps. Oyama *et al.* (42, 43) ont étudié à nouveau le site intracellulaire de la synthèse et l'assemblage des deux sous-unités dans le sécréteur. Les chaînes H et L ont été synthétisées ensemble comme produits majeurs sur les polysomes liés aux membranes préparés par centrifugation d'un homogénat de sécréteurs à 17 000 x g pendant 30 minutes dans une solution tampon de 20 mM Tris HCl (pH 8,0) contenant 50 mM de KCl, 5 mM de Mg, 0,4 M de sucrose. Il a été démontré qu'une partie substantielle des peptides de la chaîne L synthétisés sur les polysomes liés à la membrane est liée par des ponts disulfures aux polypeptides naissants de la chaîne H. Ces peptides naissants des chaînes H et L sur les polysomes liés sont protégés de la digestion par les protéases en l'absence de Triton X-100, alors qu'ils sont digérés en totalité en présence de Triton X-100. Cela montre que la majeure partie des chaînes H et L nouvellement synthétisées dans le système acellulaire, est incluse à l'intérieur de vésicules microsomaux. La formation du pont disulfure entre les chaînes H et L semble avoir lieu à un stade relativement précoce de la synthèse des deux chaînes sur les polysomes. Cependant, le moment exact et le lieu de la formation du pont disulfure, c'est-à-dire s'il se forme entre les chaînes en développement sur le polysome immédiatement après l'achèvement de la synthèse des deux ou d'une chaîne(s), ou dans le réticulum endoplasmique, restent à déterminer. Comme le montre la partie suivante, la combinaison des sous-unités H et L est un pas important pour la synthèse efficace et la sécrétion de la fibroïne.

Kimura *et al.* (44) ont comparé les changements intervenant dans la concentration de l'ARNm de la chaîne L dans le sécréteur à la fin du développement larvaire avec ceux de l'ARNm de la chaîne H par hybridation en "dot blot" avec des sondes excédentaires marquées au ^{32}P spécifiques des chaînes L et H respectivement. Comme le montre la figure 2, la concentration de l'ARNm de la chaîne L le dernier jour du 4^{ème} âge est presque égale à celle du 4^{ème} jour du 5^{ème} âge, alors que la concentration diminue jusqu'à un très faible niveau au cours de la 4^{ème} mue. La concentration recommence à augmenter à partir du 2^{ème} jour du 5^{ème} âge, et cela continue jusqu'au 7^{ème} jour. Il est intéressant de noter que les concentrations des deux chaînes H et L suivent un profil similaire. Cela indique que l'expression du gène de la chaîne L est coordonnée à l'expression du gène de la chaîne H à la fin du développement larvaire. Il est intéressant de découvrir comment les deux gènes, situés sur des chromosomes différents, sont exprimés de façon coordonnée. Un résultat similaire a été obtenu par Couble *et al.* (33) sur les changements de concentration de l'ARNm de P25 et l'ARNm de fibroïne dans les cellules du sécréteur à la fin de la vie larvaire. Ces auteurs ont suggéré que le parallélisme étroit entre les pools cellulaires des ARNm de P25 et de fibroïne peut être expliqué en partie par le fait que l'ADN en amont du gène de P25 possède une séquence très similaire à l'ADN de la région flanquante en 5' de la fibroïne (45), dans laquelle il existe des signaux de modulation de la transcription comme l'ont démontré Suzuki *et al.* (46-50). Afin de pouvoir discuter plus avant ce sujet, l'achèvement de l'analyse séquentielle du gène de la chaîne L, en particulier de la région flanquante en 5', est très attendue.

III. ANALYSE DE LINKAGE DES GENES DES CHAINES H ET L CHEZ LES CHROMOSOMES DE *BOMBYX MORI*

Récemment des résultats expérimentaux ont été présentés suggérant l'hétérogénéité de la fibroïne de *Bombyx mori*. Sasaki et Noda (13) ont identifié deux acides aminés (Asp et Ser) à un taux d'environ 1:1 comme les acides aminés N-terminaux de la grande sous-unité de fibroïne, et ont suggéré que la grande sous-unité se compose de deux chaînes polypeptidiques ayant un résidu N-terminal différent. Sprague (15) a démontré que la fibroïne se résout en deux bandes (M_R d'environ 350 000) d'intensité de coloration égale par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Si l'on considère qu'il y a un gène de fibroïne par génome haploïde et que la souche de *Bombyx* utilisée est hétérozygote pour le locus de fibroïne, il est possible que ces deux polypeptides de fibroïne soient les produits d'allèles codominants de fibroïne, de tailles légèrement différentes. Plus tard, Sprague *et al.* (51) ont montré que deux polypeptides de fibroïne de longueurs différentes sont codés par des gènes de longueurs différentes.

Nous avons examiné la taille moléculaire des chaînes H de fibroïnes obtenues à partir de douze souches parentales de *Bombyx mori* afin d'inspecter la présence de variantes héréditaires de la fibroïne (52). Toutes les chaînes H de fibroïne examinées montraient un seul composant et ces phénotypes de fibroïne ont été classifiés grossièrement en trois groupes selon leur mobilité électrophorétique sur gel de polyacrylamide SDS : rapide (F), modéré (M) et lent (S), comme indiqués sur la Figure 3. Par hybridation et croisement en retour des F_1 avec chacun des parents, il a été conclu que les allèles qui contrôlent le phénotype de la fibroïne sont codominants les uns envers les autres.

L'apparition de variantes héréditaires des sous-unités de la fibroïne nous a permis d'effectuer l'analyse de linkage des gènes des sous-unités, ce sujet ayant été en attente depuis longtemps. Hyodo *et al.* (53) ont déterminé pour la première fois que le gène de la chaîne H est lié au gène *Nd* situé sur le chromosome 25, en utilisant la souche de ver à soie J-131 possédant la chaîne H de phénotype F et 24 souches de ver à soie portant des marqueurs génétiques sur chaque chromosome avec des chaînes H de phénotype M ou S. Le gène de la chaîne H a été affecté à l'origine au chromosome 23, à cause de son lien avec le locus *Nd*. Cependant, la situation de *Nd* a été corrigée récemment et attribuée au chromosome 25 (54-57). Aussi le gène de la chaîne H est attribué au chromosome 25.

Les variantes génétiques de la chaîne L de la fibroïne ont également été découvertes par Hyodo *et al.* (58) et classifiées en trois groupes : A, B et C selon leur mobilité électrophorétique sur gel SDS de polyacrylamide. L'analyse de linkage du gène de la chaîne L, utilisant une souche de ver à soie de Tamanashikasuri (Chaîne L de phénotype C) et 16 souches de ver à soie (Chaîne L de phénotype A ou B) portant des marqueurs génétiques sur chaque chromosome, a révélé que le gène de la chaîne L n'est pas lié au gène de la chaîne H, mais lié au gène U situé sur le chromosome 14. Il est intéressant de noter qu'un gène mutant, *Nd-s*, est connu pour être lié au chromosome 14. Le mutant *Nd-s* entraîne une activité de synthèse de la fibroïne remarquablement réduite par rapport à celle d'un ver à soie normal. Le ver à soie portant la mutation *Nd* est appelé "naked-pupa" et le ver à soie portant la mutation "Nd-s" est appelé "sericin-cocoon" (59). Ces larves mutantes se transforment en chrysalides sans produire de cocon du tout, ou en produisant un cocon faible composé en grande partie de séricine et de peu de fibroïne. Les sécréteurs des glandes séricigènes des vers à soie *Nd* (60) et *Nd-s* (61, 62) sont bien dégénérés alors que les réservoirs sont presque normaux (Fig. 4).

Notre attention a été attirée par le fait que les mutations génétiques sur le chromosome 14 ou sur le chromosome 25, ont pour résultat une forte diminution de la sécrétion de fibroïne. Nous avons donc essayé d'obtenir une recombinaison des gènes *Nd* et du gène de la chaîne H. Aucun recombinant n'a été obtenu sur environ 1000 hybrides (F_1), ce qui suggère une très grande proximité des deux gènes. On peut considérer que la mutation *Nd* repose sur le gène structural de la fibroïne elle-même ou sur le gène de régulation, en prenant en compte le fait que la formation du complexe H-L est empêchée chez le mutant *Nd*.

IV. COMBINAISON DES SOUS-UNITES ET SÉCRETION DE LA FIBROINE

Comme mentionné plus haut, le sécréteur de la glande séricigène de *Nd* est extrêmement court et produit très peu de fibroïne. Nous avons obtenu de la fibroïne de *Nd*(2) sécrétée dans le lumen du sécréteur en fil très fin par immersion de la glande séricigène dans de l'éthanol à 60 % glacé. Le profil SDS-PAGE et la composition en acides aminés de cette protéine en fil ont été examinés. De manière inattendue on découvrit que la fibroïne sécrétée dans le lumen du sécréteur du mutant *Nd*(2) est seulement composée de la chaîne H et que l'on ne détecte pas de chaîne L (64). On se demanda alors si l'activité de synthèse de la chaîne L faisait défaut chez le mutant *Nd*(2). On rechercha l'ARNm de la chaîne L chez le sécréteur de *Nd*(2). Les ARN totaux préparés à partir du sécréteur de *Nd*(2) et de J-131 (un producteur normal) furent soumis à l'hybridation par buvardage Northern avec des clones pLA23 de la chaîne L marqués au ^{32}P . Dans les deux cas l'ADNc marqué au ^{32}P s'est hybridé sur une bande unique correspondant à la taille de l'ARNm de la chaîne L (Fig. 5), indiquant que l'ARNm de la chaîne L était synthétisé dans les cellules du sécréteur de *Nd*(2) comme dans celles de J-131. Cependant la concentration de l'ARNm de la chaîne L dans les cellules de *Nd* est d'environ 20 % de celle des cellules de J-131, d'après les résultats obtenus par balayage densitométrique (Fig. 5).

Le produit de traduction de l'ARNm de la chaîne L a aussi été détecté à l'intérieur des cellules du sécréteur de *Nd*(2), par le sérum anti-chaîne L et la protéine A marquée à ^{125}I comme le montre la Figure 6A tandis que la chaîne L n'est pas détectable dans le lumen de *Nd*(2) (Fig. 6B). Deux possibilités peuvent être avancées pour expliquer l'absence de la chaîne L dans la fibroïne sécrétée de *Nd*(2) : un défaut de structure de la chaîne H ou de la chaîne L qui empêche la formation du (des) pont(s) disulfure(s), ou l'absence de facteur(s) nécessaire(s) à la formation du (des) pont(s) disulfure(s).

En utilisant deux formes de variants génétiques de la chaîne L (types A et C de mobilité électrophorétique) décrites ci-dessus, un essai a été fait pour savoir si la chaîne L provenant de l'allèle *Nd*(2) chez un hybride *Nd*(2)/Tamanashikasuri est en mesure de se lier à la chaîne H d'un allèle normal et d'être sécrétée dans le lumen du sécréteur. Comme le montre la Figure 6A, la chaîne L dans les cellules de *Nd*(2)/*Nd*(2) est du type A (colonne 1), la chaîne L dans les cellules de Tamanashikasuri/Tamanashikasuri (producteur normal) est du type C (colonne 2), et dans les cellules de *Nd*(2)/Tamanashikasuri, on détecte les deux types A et C de la chaîne L avec un rapport d'environ 1:1 (colonne 3). Quand la fibroïne sécrétée dans le lumen du sécréteur de la glande séricigène de l'hybride *Nd*(2)/Tamanashikasuri est soumise à SDS-PAGE après réduction au 2-mercaptoéthanol, on détecte deux bandes de la chaîne L (types A et C) avec un rapport d'environ 1:1 (Fig. 6B, colonne 3). La souche *Nd*(2)/*Nd*(2) sécrète une petite quantité de fibroïne sans chaîne L détectable (Fig. 6B, colonne 1). Chez l'hybride *Nd*(2)/Tamanashikasuri, la majeure partie de la chaîne H sécrétée dans le lumen est du type de l'allèle Tamanashikasuri (la chaîne H provenant de *Nd*(2) montre la mobilité électrophorétique la plus lente parmi toutes les souches testées). Ces résultats indiquent que la chaîne L provenant de l'allèle *Nd*(2) est normale fonctionnellement et peut se combiner avec la chaîne H provenant de l'allèle Tamanashikasuri, avec comme résultat la sécrétion de fibroïne.

D'un autre côté, la sécrétion de la chaîne H provenant de l'allèle *Nd*(2) est très réduite chez un ver à soie hybride, *Nd*(2)/J-131, comme le montre la Figure 7. Les tissus du sécréteur sont composés de matériaux hétérogènes (Fig. 7A, colonne 1), alors que la fraction de fibroïne sécrétée est composée des chaînes H et L de fibroïne (Fig. 7A, colonne 2). Les mêmes matériaux protéiques (réduits au 2-mercaptoéthanol) sont soumis à électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 4 % avec SDS pour examiner de manière plus précise la région de la chaîne H (Fig. 7B). Le rapport de la chaîne H provenant de l'allèle *Nd*(2) (H *Nd*(2)) à la chaîne H provenant de l'allèle J-131 (H J-131) est de 0,53 pour les protéines des tissus et inférieur à 0,01 pour la fibroïne sécrétée (Fig. 7C). Ceci indique que la sécrétion de H *Nd*(2) est réduite à un niveau inférieur à 2 % de celle de H J-131.

Les fibroïnes dérivées des allèles *Nd*(2) et J-131 à l'intérieur des cellules du sécréteur du ver à soie hybride *Nd*(2)/J-131 ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 4 % avec SDS et extraites respectivement en l'absence de 2-mercaptoéthanol. Les deux préparations de fibroïne (Fig. 8A) ont ensuite été soumises à électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 15 % avec SDS en présence de 2-mercaptoéthanol. Comme le montre la Figure 8B, la fibroïne dérivée de l'allèle J-131

contient une chaîne L, mais on ne peut détecter de chaîne L chez la fibroïne dérivée de l'allèle *Nd*(2). Dans ce système, les chaînes L provenant des allèles J-131 et *Nd*(2) ne peuvent être distinguées l'une de l'autre car elles ont toutes les deux une mobilité électrophorétique de type A.

Ces résultats suggèrent que l'absence de chaîne L dans la fibroïne de *Nd*(2) est probablement due à la non-formation de pont(s) disulfure(s) entre les chaînes H et L en raison de quelque défaut structural de la chaîne H. Il est peu probable que la formation de la structure des sous-unités H-L soit empêchée par l'absence d'un facteur indépendant responsable de la formation du(des) pont(s) disulfure(s), car les chaînes H et L de l'allèle J-131 sont associées et sécrétées normalement dans le même milieu cellulaire.

Une preuve similaire a été obtenue par Takei *et al.* (65, 66) en utilisant un mutant de *Nd-s*, *Nd-s^D*, qui porte une mutation très proche ou au sein du gène de la chaîne L de fibroïne sur le chromosome 14. La mutation *Nd-s^D* a été induite par mutagenèse chimique et a été fixée en souche homozygote *Nd-s^D/Nd-s^D* par Gamo et Sato (67). Les phénotypes de cette souche sont similaires à ceux de *Nd*(2)/*Nd*(2) (Fig. 4), bien que les loci *Nd-s^D* et *Nd*(2) soient liés à des chromosomes différents.

Le Tableau II donne une comparaison des quantités d'ADN, d'ARN et de fibroïne sécrétée dans le lumen par paire de sécréteurs des souches de ver à soie ayant les combinaisons alléliques suivantes : *Nd-s^D/Nd-s^D*, *Nd-s^D/+*, et *+/+* (allèles de type sauvage homozygote, Tamanashikasuri).

On note que la quantité de fibroïne sécrétée dans le lumen chez la souche *Nd-s^D/Nd-s^D* est inférieure à 0,3 % de celle sécrétée chez la souche *+/+*, alors que les quantités d'ADN et d'ARN dans le sécréteur de la souche *Nd-s^D/Nd-s^D* représentent environ 10 % de celles de la souche *+/+*. Ces résultats indiquent que la synthèse et/ou la sécrétion de fibroïne sont réduites fortement en présence de la mutation homozygote *Nd-s^D*. Il est également intéressant de noter que la quantité de fibroïne sécrétée chez la souche *Nd-s^D/+* est plus de 175 fois supérieure à celle sécrétée chez la souche *Nd-s/Nd-s*, tandis que les quantités d'ADN et d'ARN par paire de sécréteurs chez la première souche sont seulement cinq fois plus élevées que chez la seconde.

Il a été prouvé que la fibroïne sécrétée dans le lumen du sécréteur de la souche *Nd-s^D/Nd-s^D* se compose seulement de la chaîne H, bien que des transcriptions du gène de la chaîne L soient présentes dans les cellules du sécréteur (Fig. 9). Chez le ver à soie hybride *Nd-s^D/+*, la fibroïne sécrétée dans le lumen du sécréteur se résout en deux bandes d'intensité à peu près égale lors de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 4 % avec SDS (Fig. 10A, colonne 2). La fibroïne à mobilité lente se compose de la chaîne H provenant de l'allèle *Nd-s^D* et de la chaîne L provenant de l'allèle J-131 (Fig. 10B, colonne 1) et la fibroïne à mobilité rapide se compose de la chaîne H provenant de l'allèle J-131 et de la chaîne L provenant de l'allèle J-131 (Fig. 10B, colonne 2). Ce résultat indique que la chaîne L dérivée de l'allèle *Nd-s^D* n'est pas en mesure de former un pont disulfure avec la chaîne H de *Nd-s^D*, ni avec la chaîne H de J-131.

DISCUSSION

Il a été démontré que la chaîne L de la fibroïne joue un rôle important dans le processus de sécrétion des molécules de fibroïne synthétisées dans le réticulum endoplasmique du sécréteur de la glande séricigène. Comme le montre le Tableau I, la chaîne L est assez riche en acides aminés hydrophobes tels que Ala, Val, Ile et Leu, et contient aussi une quantité importante d'acides aminés acides. Bien que l'analyse de la séquence des acides aminés de la chaîne L ne soit pas encore achevée, on peut considérer comme possible l'existence d'au moins deux domaines dans la structure tertiaire de la molécule de la chaîne L, l'un étant hydrophobe et l'autre étant hydrophile et probablement acide. Ceci donne peut-être une fonction physiologique à la chaîne L qui stabilise la chaîne H, laquelle est essentiellement instable dans une solution aqueuse. En d'autres termes, la chaîne L joue peut-être le rôle d'agent de type colloïde protecteur dans les cellules et aussi dans le lumen de la glande séricigène. L'observation de ce que la chaîne H tend à se solidifier, dans une solution tampon diluée (pH 7,0), plus rapidement que la fibroïne dans la même solution tampon, peut soutenir cette hypothèse. Cette action stabilisant la chaîne H de la part de la chaîne L est peut-être nécessaire au bon déroulement du processus à stades multiples de la synthèse de la fibroïne, au cours duquel les molécules de fibroïne

synthétisées sur les polysomes du sécréteur sont transférées dans l'appareil de Golgi à travers la membrane du réticulum endoplasmique, sécrétées dans le lumen de la glande séricigène à travers la membrane cellulaire, transportées progressivement dans le réservoir, stockées là quelques jours, puis filées par les conduits étroits de la filière. Il est surprenant que les molécules de fibroïne, qui sont par nature destinées à s'aggréger, se déplacent si doucement tout au long du chemin qui les conduit du réticulum endoplasmique du sécréteur à l'orifice de la filière.

Comme il est dit plus haut, les cellules du sécréteur de *Nd(2)* sont de taille nettement plus petite que celles du ver à soie normal. Nakano (54), qui a découvert le premier la souche *Nd(2)*, a émis l'hypothèse, à partir d'observations des cellules du sécréteur de *Nd(2)* au microscope, de l'existence de certains obstacles à la sécrétion de la fibroïne liquide dans le lumen de la glande séricigène. Récemment, Gampo et Sato (16) ont effectué des études au microscope électronique sur le sécréteur des souches *Nd-s^D/Nd-s^D* et *Nd-s^D/+* et ont trouvé que le réticulum endoplasmique était anormalement gros, mais n'ont pu détecter un développement de l'appareil de Golgi et des vésicules sécrétant la fibroïne chez la souche *Nd-s^D/Nd-s^D*. D'un autre côté, chez la souche *Nd-s^D/+* l'appareil de Golgi est modérément développé et les vésicules sécrétant la fibroïne sont clairement observés bien que le réticulum endoplasmique soit encore assez agrandi. Ces observations les ont amenés à suggérer que le transport de la fibroïne du réticulum endoplasmique au complexe de Golgi est bloqué chez la souche *Nd-s^D/Nd-s^D*.

Au cours des dix dernières années, un grand nombre de rapports a été publié sur le transport des protéines synthétisées dans le réticulum endoplasmique (68). Il a été suggéré que le composant sécréteur (SC), une glycoprotéine synthétisée par les cellules de l'épithélium de la glande, joue un rôle dans le transport transépithélial de l'immunoglobuline (Ig) (69-71). Il sert d'abord de récepteur de Ig à la surface basolatérale de la cellule épithéliale. Le complexe SC-Ig formé subit l'exocytose et apparaît dans le lumen en tant que complexe SC-Ig soluble, c'est-à-dire que SC sert de protéine sécrétrice soluble.

Gething *et al.* (72) ont analysé le transport intracellulaire de l'hémoagglutinine du virus de la grippe (HA) du site de synthèse dans le réticulum endoplasmique à travers le complexe de Golgi le long du chemin exocytotique, en utilisant des types sauvages et mutants de HA. Leurs résultats suggèrent qu'un pliage correct et une trimérisation sont essentiels au mouvement de HA à partir du réticulum endoplasmique.

Un résultat similaire a été obtenu pour la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculaire. La formation d'un oligomère de la protéine G, probablement un trimère, est nécessaire au transport de la protéine G du réticulum endoplasmique au complexe de Golgi et ensuite à sa maturation (73). Il a été montré qu'une protéine cellulaire de 77 kD d'abord identifiée comme une protéine liant la chaîne lourde d'immunoglobuline (BiP) (75) joue un rôle important dans le transport de la chaîne lourde (76-78). On pense que BiP facilite l'oligomérisation et/ou le pliage des chaînes lourdes d'immunoglobuline dans le lumen du réticulum endoplasmique, ce qui entraîne une désaggrégation des protéines incorrectement pliées et permet leur exportation.

Si l'on prend en compte tous ces résultats, il est probable que la sous-unité de la chaîne L de fibroïne facilite le pliage adéquat de la chaîne H dans le réticulum endoplasmique des cellules du sécréteur. Cela peut empêcher les molécules de fibroïne correctement pliées (fibroïne liquide) de s'aggréger au cours du transport intracellulaire et de la sécrétion. Des études ultérieures sur l'ultrastructure de la chaîne L et aussi sur les changements de conformation des chaînes H et L occasionnés par la formation de leur complexe, serviront à élucider la fonction biochimique et physiologique de la chaîne L dans la synthèse et la sécrétion de la fibroïne.

TROPICAL SERICULTURE: A KEY INDUSTRY OF THE 21ST CENTURY

Masayoshi SHIKATA*, Toshiharu FURUSAWA and Leslie S. INDRASITH*****

*** Research Institute of Tropical Agriculture, University of the Ryukyus, Yaeyama-Gun, Okinawa 907-15, Japan, ** +Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan, *** Zoologisches Institut, Abteilung Für Zoophysiologie, Universität Bern, CH-3012 Bern, Erlachstrasse 9a, Switzerland.**

Keywords: Tropical Sericulture.

In the current international tide of events the tropical sericulture seems more and more to play a critical role in the sericultural industry of the 21st century, and increase in the production rate of cocoons and silk in tropical areas has become apparent. When we consider why the 21st century is heading in this direction, we must first examine how to treat the state of tropical sericulture in order to bring the era to full realization. We would like to introduce a number of ventures based on these thoughts.

The burden of the world's silk production was formerly carried by countries in the north, especially by industrial countries such as Japan. Yet in spite of the development of sericultural technology, silk production in these countries has waned. Under this circumstance it is necessary for the current silk producing regions, especially tropical countries to lose no time in establishing production areas. We introduce the following measures in hopes that they might be a useful reference encouraging the production regions to continue to supply the people of the world with that blessing of nature, the "Queen of fibers", silk.

Is it truly the second coming of the silk age?

As the "Queen of fibers", silk still maintains an important role in formal wear. In the production of casual wear however, synthetic fibers are most widely used, which presents the problems of absorbency, etc. As one means of improving the absorbency function of nylon 6, it is possible to use nylon 4 and nylon 3, due to short intervals between their amide groups.

If, in carrying this idea forward, nylon 2 would be advanced moreover, it has almost the same character as natural silk. It will be much more rational to increase the production of natural silk. If such production of silk could be readily accomplished for various purposes, the use of natural silk itself, produced by biotechnology utilizing natural energy, is desirable.

In spite of the fact that silk is often thought to be too costly for use in casual wear, the feel of silk, its distinctive physiological features, have been reassessed and silk knit products are becoming quite fashionable around the world. All the more as clothing materials move away from the purely synthetic to a combination of synthetic and natural fibers, and even silky inners such as "silk polyester" and "silk cotton" come into place, we cannot help but feel that the age of silk is making a come back.

+Correspondence to: Dr. Toshiharu Furusawa, Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan

Why can the future be considered the age of tropical sericulture?

In silk production until recently, emphasis had been placed on productivity concerning technological growth. Namely, there has been a concern to aim toward those silkworm varieties which produce the most silk and due also to the fact that there are seasonal considerations when breeding is most easily accomplished, the process of silk production in the northern model with spring and autumn as the main breeding seasons has become quite developed.

Nevertheless, due to competition with other industries and other agricultural products, having once measured the improvement of land and labor productivity there have been attempts toward multiple breeding periods conducted with the aid of mechanization, as well as complete automatization relying on the use of artificial feed. We have gone so far as to attempt complete automatization without the need for manpower.

Such developments certainly reflect splendid achievements in technology, yet the equipment and operational costs, as well as the cost of feed, are several times more costly than breeding with mulberry leaves. From an economical standpoint, artificial breeding is out of the question.

The seasonal sericulture of the northern model which has thus developed to the utmost degree clearly has its own natural limitation, and is already on the path towards self destruction. Perhaps silk production in the industrial north has adjusted to the large-scale uniformization suggested by Alvin Toffler's second wave.

The transformation into an age where consumer needs are many and varied and limited production of many goods is necessary will be a hard one. Tropical sericulture, which allows for year-long breeding, will become all the more advantageous. Moreover, it is already the case that current sericultural technology has established methods by which breeding can be accomplished even in the hot seasons. Tropical sericulture allows for silk to be effectively produced with unlimited natural energy, without even utilizing inorganic energy. The expansion of both formal and casual clothing lines can be made possible by today's tropical sericulture. The assertion that the 21st century will be the age of tropical sericulture rests on points such as this. It is probably safe to say that we have already begun to enter that age.

Provision for the desired state of tropical sericulture.

Since mulberry trees grow densely throughout the year in the tropics, year round breeding is possible, and productivity can therefore be raised by means of multiple breeding in its truest form.

Therefore, rather than utilizing the seasonal-based production technology of the northern model, technology should be established which makes the most of such advantageous tropical conditions. In the northern regions, where winter is a factor to be considered, cocoons harvested during the seasonal breeding periods are dried at high temperatures and then preserved, thus supplying the silk production process all year-round. Because year-round breeding is possible with tropical sericulture, there is no need to preserve cocoons, thus making connected systemization a reality in the production of silk for multiple purposes. Furthermore, not only is it true that costs escalate on account of energy-demanding high-temperature drying and preservation and the like, but it is also the case that the resultant protein denaturation of the silk strand remarkably damages the quality of the final product.

Naturally, such systemized silk production makes necessary the small lot production of silk with especial properties suited to its eventual intended use. The following discusses what needs to be done in the technology of various fields in order to attain this goal.

We have maintained that in future, silk production geared toward the products eventual purpose is needed. The most important factor influencing the quality of silk is the variety of silkworm which is used. Only having first chosen the varieties most appropriate for tropical sericulture and then clarifying the properties of such, is it desirable to employ them in production. It is meaningless to use only that variety which produces the most silk simply because it will use the level of productivity. Silk used in knits, unlike that used in formal wear, presents no problems as far as the length of silk strands can be unravelled, and so it seems most suitable to use multivoltine varieties which develop quickly and breed effectively.

Breeding: The recent development of a disinfection technique has contributed greatly to making tropical sericulture possible. We must not be lax in continued research endeavors. Cooperative

breeding of young silkworms in modern well equipped facilities until the third developmental stage is one area which needs to be explored.

Mulberry feed: One of the distinctive features of tropical sericulture is the thick growth of mulberry trees year round which makes multiple breeding possible. Thus, it is necessary to select mulberry varieties which can readily adapt to the environment, provide a bountiful harvest, and which have a high feed value.

One of the authors (Professor Dr. Masayoshi Shikata) cross-bred an indigenous mulberry variety of semi-tropical Okinawa prefecture that was well adapted to the islands strong winter winds with a variety introduced from abroad that has high harvest yield rate. This cross breed, well adapted to the island environment and making possible a high production yield, has now come into wide use among farmers.

Since mulberry trees weaken when subjected to the frequent harvesting required by multiple breeding, it is necessary to find a simple means of propagating the trees by vegetative propagation. The replanting of fresh cuttings is being used by farmers as a solution to this.

Whatever the means chosen, it is necessary to be cautious about using introduced mulberry varieties, as they are easily susceptible to sudden change in environmental conditions. Furthermore, by establishing proper cultivation methods for multiple harvesting, we should further develop technology which makes possible and efficient year round supply of trees.

Filature: As described above, those who want to produce silk in the tropics must adjust systems of producing silk in the northern region, namely its climate, to that of the tropics. The most important thing to be changed is that cocoons harvested should directly proceed to cooking and reeling, omitting drying and storing. Eclosion from cocoon would be a problem since it reduces the efficiency of reeling machine as in the case above, but it could be easily solved by storing harvested cocoons in air-tight bags since pupae would die due to the lack of oxygen. Because this method does not heat the cocoons, filaments denature less and the silk is easily reeled. Raw silk obtained through this method is rather uncrystallized if compared with that of heat-dried reeled silk.

In northern regions, automatic reeling machines were invented largely to get the highest efficiency of producing silk, and they use these on a large scale to produce cocoon filaments of equal quality. However, in the tropics, productions of different qualities in rather small scales are very important to help the economy of small farm holders.

To leaders of sericulture in the tropics

Sericulture in the tropics definitely need its own style. In the northern regions the dormancy of mulberry trees always prevented sericultural skills and style from being improved. Of course, climate differs from place to place even in the tropics, not to mention between the tropics and the northern areas, so we need different sericultural skills for each case. A choice of proper spice for an isle described before is one of the examples. And it is believed you can extend your work in making a final product using specific character each place or a country has. Product without specific character no longer has value.

Sericultural skills in the northern regions achieved to lower the costs of production in large factories, to compete with synthetic fibers in price, though that did not give much help since the differences between silk and synthetic fibers are essential, therefore, inevitable. Artificial diet itself is a wonderful fruit of sericultural study, though it is out of agricultural principles because it does not utilize natural energy which is infinite, therefore it also is not needed in the tropical sericulture. Fundamental knowledge obtained through the study of artificial diet should, of course, be largely used.

Alvin Tofler, the author of "Third wave", predicts in his book that future society will depend on natural energy, and will no longer request mass produced goods but specially made ones. In the future, sericulture will also be required to produce various kinds of silk goods, and we believe that only tropical sericulture can fit severe demands.

We request those who lead sericulture in the tropics to build up proper skills which are appropriate for respective climates and other conditions, never to hesitate to try new ways of utilizing silk, and to offer the "Queen of fibers" to people around the world forever.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to express our sincere thanks to Mr. Teruyuki Niimi and Mr. Gentaro Yamamoto of the Faculty of Agriculture, Nagoya University for their generous help in preparation of this article.

REFERENCES

SHIKATA M., HOSHINO M., and SHINJO T., (1984) Evaluation of the Okinawa shimaguwa mulberries and the Taiwan encouraging mulberries as a cultivated mulberry, *J. seric. Sci. Jpn.*, 53, 151-155.

SHIKATA M., FURUSAWA T., INDRASITH L.S. and LIU J.L., (1984), A new and simple method for the conservation of silk cocoons for filature. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 53, 414-420

SHIKATA M., HOSHINO M., SHINJO T. FURUSAWA T. and INDRASITH L.S., (1984) Survival ration of hardwood cutting of sub-tropical mulberry varieties pretreated with girdling. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 53, 543-544.

SHIKATA M., HOSHINO M., SHINJO T., FURUSAWA T. and INDRASITH L.S., (1985), Evaluation of growth and yield of tropical mulberry varieties, II. Yield and growth characteristics of mulberry varieties originating from Indonesia, Taiwan and Okinawa, after two years of cultivation, *J. Seric. Sci. Jpn.*, 54, 366-373.

SHIKATA M., HOSHINO M., SHINJO T., FURUSAWA T. and KUSWIAR E., (1986), Massive improvement on survival ratio of hardwood cuttings in sub-tropical mulberry varieties pretreated with girdling, a field study, *J. Seric. Sci.*, 55, 173-174.

SHIKATA M., AZUMA M., FURUSAWA T. and WU D.Y., (1986), Further study on a new and simple method for the conservation of silk cocoons for filature. Study on tropical sericulture IX. *Bull. Fac. Text. Sci., Kyoto Insti. of Tech.* 11, 121-125.

SHIKATA M., (1987) Implantation of the tropical mulberry races in research institute of tropical agriculture, University of Ryushus, and characteristics of these mulberry races. *Bull. Colleg. of Agri., Univ. of Ryulyus*, 34, 209-221.

LA SERICICULTURE TROPICALE, UNE INDUSTRIE CLE DU 21^{EME} SIECLE

Masayoshi SHIKATA*, Toshiharu FURUSAWA** et Leslie S. INDRASITH***

* Research Institute of Tropical Agriculture, University of the Ryukyus, Yaeyama-Gun, Okinawa 907-15, Japon, **Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japon, ***Zoologisches Institut, Abteilung Für Zoophysiologie, Universität Bern, CH-3012 Bern, Erlachstrasse 9a, Suisse.

Dans le courant international actuel, la sériciculture tropicale est de plus en plus amenée à jouer un rôle critique dans l'industrie séricicole du 21^{ème} siècle, l'augmentation du taux de production de cocons et de soie des pays tropicaux étant devenue très nette. Si l'on se demande pourquoi le 21^{ème} siècle se dirige dans cette direction, on doit tout d'abord réfléchir à la façon de traiter cette industrie séricicole pour lui assurer son plein essor. Nous souhaitons tenter certaines réflexions.

Le poids de la production de soie mondiale était auparavant porté par les pays du nord, principalement les pays industrialisés tels que le Japon. Pourtant, en dépit du développement de la technologie séricicole, la production de ces pays a décliné. Dans ces conditions, il est nécessaire pour les pays actuellement producteurs de soie, en particulier les pays tropicaux, de développer sans perdre de temps des techniques de production différentes des précédentes utilisées dans les pays du nord. Nous proposons les mesures suivantes en espérant qu'elles seront des références utiles encourageant les régions productrices à continuer d'approvisionner le monde entier avec ce bienfait de la nature, la "Reine des Fibres", la soie.

Atteignons-nous réellement le second âge de la soie ?

La soie comme "Reine des Fibres" joue toujours un rôle important dans les tenues habillées. Pourtant la production de vêtements ordinaires utilise le plus souvent des fibres synthétiques qui présentent des inconvénients comme la capacité d'absorption, etc. Pour obtenir une capacité d'absorption meilleure que celle de nylon 6, il est possible d'utiliser nylon 4 et nylon 3 qui possèdent des intervalles plus courts entre les groupes amides.

En poussant cette idée plus avant, nylon 2 serait encore plus performant et il aurait les mêmes caractéristiques que la soie naturelle. Il sera beaucoup plus rationnel d'augmenter la production de soie naturelle. Si une telle production de soie devait se réaliser aisément à des fins diverses, il serait bon d'utiliser la soie naturelle produite grâce à une biotechnologie utilisant l'énergie naturelle.

En dépit du fait que la soie est souvent considérée comme trop coûteuse pour les vêtements ordinaires, le toucher de la soie, ses caractéristiques physiologiques distinctes ont été réaffirmées et les produits en maille deviennent très populaires dans le monde entier. Les tissus s'éloignent du synthétique pur pour se rapprocher d'un mélange fibre synthétique et fibre naturelle et même si on utilise de plus en plus des composants soyeux tels que "soie-polyester" et "soie-coton", nous ne pouvons nous empêcher de penser que l'âge de la soie est en train de revenir.

Pourquoi peut-on considérer le futur comme l'âge de la sériciculture tropicale ?

Jusqu'à une époque récente, l'amélioration de la production de soie dépendait principalement de la productivité liée à l'amélioration technologique. Le premier souci était d'améliorer les races de vers à soie et aussi de prendre en compte les saisons les plus favorables à l'élevage. Le modèle

d'élevage des pays du nord avec deux saisons principales d'élevage, printemps et automne, a aussi été largement adopté. Pourtant, en raison de la compétition avec d'autres industries et d'autres produits agricoles, et après avoir réussi l'amélioration de la productivité (terre et main d'oeuvre), des efforts ont été faits pour multiplier les périodes d'élevage grâce à la mécanisation et à une automatisation totale basée sur la nourriture artificielle. Nous avons été jusqu'à tenter une automatisation totale excluant toute main d'oeuvre. De tels développements reflètent certainement les réalisations splendides de la technologie, pourtant les coûts d'équipement et opérationnels ainsi que le coût de nourriture sont beaucoup plus élevés qu'avec l'élevage sur la feuille de mûrier. D'un point de vue économique, l'élevage artificiel n'est pas envisageable.

La sériciculture saisonnière de type nordique qui s'est ainsi développée jusqu'au plus haut degré a montré clairement ses limites et amorce elle-même sa propre destruction. Il se peut que la production de soie des pays industrialisés du nord se soit adaptée à l'uniformisation à grande échelle suggérée par la deuxième vague d'Alvin Toffler.

L'évolution vers un âge où les besoins de consommation sont multiples et variés et où la production limitée d'un grand nombre de produits est nécessaire, ne sera pas chose facile. La sériciculture tropicale qui permet un élevage tout au long de l'année deviendra d'autant plus avantageuse. De plus, il est établi que la technologie séricicole actuelle a mis au point des méthodes permettant les élevages, même pendant les saisons chaudes. La sériciculture tropicale permet une production de soie effective avec une énergie naturelle

illimitée. La sériciculture tropicale d'aujourd'hui permet donc le développement de vêtements habillés aussi bien qu'ordinaires. L'affirmation que le 21^{ème} siècle sera l'âge de la sériciculture tropicale repose sur des arguments comme celui-ci. Nous pouvons sans danger affirmer que nous sommes déjà entrés dans cet âge.

Dispositions à prendre pour atteindre l'état idéal de la sériciculture tropicale.

Puisque les mûriers poussent très bien pendant toute l'année sous les tropiques, un élevage continu sur toute l'année est possible, et la productivité peut donc être améliorée par un élevage multiple dans sa forme la plus simple.

Aussi, au lieu d'utiliser la technologie de la production saisonnière du modèle nordique, on devrait mettre au point une technologie qui tirerait parti au maximum des conditions tropicales. Dans les régions du nord, là où l'hiver est un facteur important, les cocons récoltés pendant les saisons d'élevage sont séchés à haute température et ensuite conservés, assurant ainsi la production de soie pendant toute l'année. Puisque l'élevage est possible toute l'année avec la sériciculture tropicale, il n'est plus nécessaire de conserver les cocons et la connection systématisée avec la filature permet la production de soie pour divers usages. De plus, il est vrai que les coûts sont plus élevés du fait de l'énergie nécessaire à l'obtention de haute température pour le séchage et la conservation, mais aussi que la dénaturation de la protéine du fil de soie qui en résulte endommage sérieusement la qualité du produit fini.

Naturellement, une telle production de soie systématisée rend nécessaire une petite production de soie ayant des propriétés particulières. La discussion qui suit étudie les différents besoins d'amélioration de cette technologie pour atteindre ce but.

Nous affirmons que dans le futur, la production de soie devrait se diriger vers une production de produits à caractères particuliers. Le facteur le plus important influant sur la qualité de soie est le choix de la variété de vers à soie. Avant de commencer la production, il faut d'abord choisir la variété la mieux adaptée à la sériciculture tropicale et en définir les propriétés. Il est inutile d'utiliser seulement la variété qui produit la plus grande quantité de soie sous prétexte qu'elle augmenterait la productivité. La soie utilisée dans la maille, contrairement à celle utilisée dans les vêtements habillés, ne pose pas de problème car les brins de soie peuvent être détordus ; aussi l'utilisation de variétés polyvoltines se développant rapidement et s'élevant facilement, est judicieuse.

Elevage : Le développement récent de la technique de désinfection a contribué grandement à l'implantation de la sériciculture tropicale. Nous ne devons pas relâcher nos efforts. L'élevage de jeunes vers à soie jusqu'au 3^{ème} âge en coopérative, dans des locaux bien équipés demande à être étudié.

Le mûrier comme nourriture : L'un des traits distinctifs de la sériciculture tropicale est le développement rapide des mûriers tout au long de l'année, ce qui permet plusieurs élevages. Il est donc nécessaire de sélectionner des variétés s'adaptant facilement à l'environnement, qui assurent d'abondantes récoltes et qui ont une haute valeur nutritive.

L'un des auteurs (Professeur Dr. Masayoshi Shikata) a croisé une variété de mûrier indigène de la préfecture d'Okinawa, climat semi-tropical, bien adaptée aux vents froids et forts des îles, avec une variété introduite de l'étranger ayant un fort rendement. Cet hybride, bien adapté à l'environnement des îles, qui permet un fort rendement, est maintenant largement utilisé par les fermiers.

Puisque les mûriers s'épuisent rapidement lorsqu'ils sont soumis à de fréquentes récoltes, nécessaires pour les multi-élevages, il est devenu indispensable de trouver un moyen simple de faire se reproduire les arbres par reproduction végétative. Les fermiers utilisent pour cela le repiquage de jeunes boutures.

Quel que soit le moyen utilisé, il est nécessaire d'être prudent dans l'utilisation des variétés de mûriers introduites de l'extérieur car ils sont très sensibles aux changements brusques d'environnement. De plus, tout en établissant des méthodes de culture adaptées à de multiples récoltes, nous devons développer une technologie permettant un approvisionnement constant en arbres.

Filature : Comme nous l'avons décrit plus haut, la production de soie sous les tropiques nécessite une adaptation au système de production de soie des régions nordiques aux régions tropicales, en raison du climat. La chose la plus importante à modifier est de procéder immédiatement à la cuisson et au dévidage, évitant ainsi le séchage et la conservation. L'éclosion des cocons pourrait être un problème puisque elle réduit l'efficacité de la machine à dévider, comme décrit ci-dessus, mais celui-ci peut être facilement résolu en conservant les cocons dans des sacs sous vide, de ce fait la chrysalide meurt par manque d'oxygène. Grâce à cette méthode, les cocons ne sont pas chauffés, les fils de soie ne sont pas endommagés et la soie se dévide facilement. La soie grège ainsi obtenue est peu cristallisée par rapport à celle obtenue après séchage à haute température.

Dans les régions du nord, les filatures automatiques ont été inventées en grande partie pour obtenir le plus haut rendement de soie et elles sont utilisées à grande échelle pour produire des fils de qualité égale. Pourtant, dans les zones tropicales, les petites productions de qualités différentes jouent un rôle très important dans l'amélioration de la situation économique des petits fermiers.

Aux responsables de la sériciculture dans les pays tropicaux.

La sériciculture sous les tropiques doit absolument développer sa propre originalité. Dans les pays du nord, la dormance des mûriers a toujours empêché toute amélioration dans la méthode et les techniques. Le climat diffère naturellement d'un endroit à un autre, même en pays tropical, sans compter les différences climatiques existant entre les pays du nord et les pays tropicaux. D'où, comme nous l'avons décrit précédemment, le choix d'une espèce particulière adaptée aux îles. Nous croyons que le produit fini peut être amélioré en tenant compte des caractères spécifiques de chaque région et chaque pays. Un produit sans caractère particulier n'a plus de valeur.

Les techniques séricoles des régions du nord ont réussi à abaisser les coûts de production des grandes usines, et peuvent concurrencer les fibres synthétiques au niveau des prix ; cela ne leur a pas été d'un grand secours puisque la différence entre la soie et les fibres synthétiques est essentielle et par là-même inévitable. La nourriture artificielle est en elle-même une réussite extraordinaire de la recherche séricole. Pourtant, elle ne correspond pas aux principes agricoles car elle n'utilise pas les ressources naturelles qui sont infinies, de plus, elle n'a aucune raison d'être dans la sériciculture tropicale. Une étude de la nourriture artificielle devrait bien sûr être largement assurée.

Alvin Toffler, auteur de "La Troisième vague", prédit que la société future dépendra de l'énergie naturelle et ne sera plus demandeur de produits de fabrication en série mais de fabrication artisanale. Dans le futur, la sériciculture sera amenée à produire différentes sortes de produits de soie et nous sommes persuadés que seule la sériciculture tropicale peut répondre à une forte demande.

Nous demandons aux dirigeants de la sériciculture tropicale de mettre au point leurs propres techniques, adaptées aux climats et autres conditions respectives, de ne jamais hésiter à expérimenter de nouveaux moyens d'utiliser la soie et d'offrir la "Reine des Fibres" à tous, dans le monde entier, pour toujours.

SERICULTURE IN TROPICAL COUNTRIES

V. BALASUBRAMANIAN

Central Silk Board, United Mansions, 2nd Floor, 39 Mahatma Gandhi Road, BANGALORE
560 001, India.

Silk and other textile fibres.

1. Out of the man-made and natural fibres, silk accounts for an insignificant 0.17%. Among the natural fibres of cotton, wool and silk, the latter accounts for 0.31% as shown in Table I.

Year	Cotton	Wool	Silk	Sub-total	Silk as %	Man made fibres	Grand total	Silk as %
<i>Année</i>	<i>Coton</i>	<i>Laine</i>	<i>Soie</i>	<i>Sous-total</i>	<i>Soie en %</i>	<i>Fibres faites manuellement</i>	<i>Grand total</i>	<i>Soie en %</i>
1970	11,782	1,602	41	13,425	0.30	8,636	22,061	0.19
1975	11,759	1,527	49	13,335	0.37	10,312	23,647	0.21
1980	14,266	1,581	55	15,902	0.35	13,718	29,620	0.19
1985	17,540	1,676	59	19,275	0.31	15,514	34,789	0.17

Table I. Global production of textile fibres (1000 tonnes)

Tableau I. Production globale des fibres textiles (1000 tonnes)

The above table will show that while the world production of textile fibres has increased by 58% since 1970, silk has increased by 37% between 1970 and 1985. Actually, the position is much worse when we compare the raw silk production in 1938. In 1938 world silk production was 56,460 tonnes, of which Japan alone produced 43,150 tonnes. Hence, the world silk production has just now caught up with the pre-war level. The major reason for this is the steep decline in Japan's production. It is China and, to a lesser extent India, which have increased their production to off-set the fall in production of Japan.

Production of mulberry cocoons and raw silk:

2. The world cocoon production after reaching a peak of 438,800 tonnes in 1938 showed a decline in the post-war years. It is only in the 1980s, the pre-war peak has been exceeded. The world production of cocoons in 1985 aggregated to 5,35,400 metric tonnes compared to 3,90,000 tonnes in 1975. The growth attained during this period is 37%.

3. The production of raw silk in temperate countries like Japan and South Korea is progressively shrinking. China and India are the only countries in the world where the production is increasing steadily. The following table shows the trend in world production of silk.

(Tonnes)

Country <i>Pays</i>	1938	1970	1980	1986
China <i>Chine</i>	4,850	11,124	23,485	35,000
Japan <i>Japon</i>	43,150	20,515	16,155	8,341
India <i>Inde</i>	690	2,258	4,593	7,897
USSR <i>URSS</i>	1,900	3,000	4,254	3,999
Republic of Korea <i>République de Corée</i>	1,820	3,026	3,279	2,196
Brazil <i>Brésil</i>	30	259	1,284	1,664
Other countries <i>Autres pays</i>	4,020*	818	2,450	2,748
TOTAL	54,460	41,000	55,500	61,845

* Italy/*Italie* 2,740, Greece/*Grèce* 260, Turkey/*Turquie* 210, Iran/*Iran* 210, Bulgaria/*Bulgarie* 180, Vietnam/*Vietnam* 180.

Source: ISA. / *Sources AIS.*

Table II. Trend in world raw silk production

Tableau II. Tendance de la production mondiale de soie grège.

4. It can be seen from Table II that the silk production in India has gone up from about 700 tonnes in 1938 to 8,000 tonnes in 1986. The production of cocoons in India is steadily increasing. The progress of raw silk production is given in Table III.

(M. Tonnes)

Year <i>Année</i>	Mulberry <i>Mûrier</i>	Non-mulberry <i>Non mûrier</i>			Total <i>Total</i>
		Tasar	Eri	Muga	
1951-52	625	124	100	45	894
1961-62	1,308	202	132	53	1,695
1971-72	2,046	314	168	72	2,600
1981-82	4,801	257	147	44	5,249
1986-87	7,897	441	392	55	8,785

Table III / *Tableau III*

Sericulture and Employment

5. Sericulture is a highly employment oriented industry on account of its domesticated nature of rearing. Mulberry has to be cultivated in the farms and the silkworms have to be fed about 4 times a day. This involves picking mulberry leaves every day during the period of feeding of about 25 to 32 days. In the early stage, the mulberry leaves have to be cut in small portions and have to be spread on the silkworms kept in the trays. Every day, the rearing trays have to be cleaned and unhealthy, sick and dead worms have to be removed. This involves a large number of labour. Normally, in the farmer's family, all the members take part in the various aspects of rearing. After the cocoon is spun on bamboo mountages called Chandrikes, they have to be carried to the cocoon markets for sale. In the cocoon market, the cocoons are purchased by the reelers who stifle the cocoons and reel the silk filament from the cocoons into raw silk. This involves employment of labour by the reeler. After the silk is reeled, the reelers take it to the Silk Exchange in Karnataka, and to the merchants in other parts of India, and sell them. Merchants in turn sell the yarn to the twistors or to the master weavers or to the weavers' organisations. About 70% of the raw silk in India is woven on handlooms and balance 30% on powerlooms. Handloom is again highly labour intensive. The high employment intensiveness of the sericulture industry is shown in Table IV.

Operations <i>Opérations</i>	Mandays of employment <i>Journées de travail</i>
a) Mulberry cultivation (one ha.) and silkworm rearing (yield 770 kgs. cocoons) <i>Culture de mûrier (un ha.) et élevage de vers à soie (rendement 770 kg. de cocons)</i>	1,465
b) Reeling (yield 77 kgs. of silk), Twisting, weaving, printing, dyeing <i>Dévidage (rendement 77 kgs de soie) retordage, tissage, impression, teinture</i>	231 1,194
c) Indirect employment in making equipments needed for (a) and (b) <i>Emplois indirects provenant de la fourniture d'équipements utilisés pour (a) et (b).</i>	429
	----- 3,319

Table IV / *Tableau IV*

6. In tropical conditions, there is leaf availability of mulberry throughout the year and the farmer are able to take up 4 to 6 times silkworm rearing. During each rearing, the farmer has to stay in his house and pay attention to rearing. Hence, mulberry cultivation and silkworm rearing requires the presence of the farmer in his farm house. One of the main problems in a populous country like India is the migration of landless agricultural labourers and the marginal and small farmers to the urban areas creating city-slums. Expansion of the sericulture industry is capable of arresting this kind of migration to the urban areas. At present about 5.4 millions are employed in sericulture, most of whom are in 45,000 of India's 576,000 villages.

Sericulture as a means of income levelling

7. Sericulture plays a vital role in transferring wealth from richer sections of the society to the poorer sections. Silk is consumed mostly by the affluent and the money so spent by them on purchase of silk is distributed among the farmers, reelers, twistors, weavers and traders. The major share of which goes to the farmers who rear silkworms and produce cocoons. The percentage of distribution of money from grey silk fabrics (before printing and dyeing) is shown in Table V.

1. Cocoon producer/ <i>Producteur de cocons</i>	54.6%
2. Silk Reelers/ <i>Filateurs</i>	6.6%
3. Twisters/ <i>Moulineurs</i>	8.7%
4. Weaver/ <i>Tisseur</i>	12.3%
5. Trader/ <i>Négociant</i>	17.8%
	100.0%

Table V. / *Tableau V.***Sericulture requires low gestation period:**

8. Sericulture has very low gestation and it starts yielding very quickly. Under the tropical conditions, from the seventh month of raising mulberry plantation, the farmers can start rearing silkworms and earn. It has another advantage of giving returns in quick succession which no other crop can match. The farmer can take up silkworm rearing every two to two-and-half months from the same plantation and get returns five to six times a year.

Sustaining capacity of mulberry in drought conditions:

9. Mulberry is a deep rooting plant and it withstands drought conditions. During severe droughts when all other crops wither, it is only from mulberry that the farmer could still rear some quantity of silkworms and get income for his sustenance and tide over the famine conditions. It is seen that during the severest drought the total annual precipitation will be about 40% of the normal rainfall. At this low rainfall food crops will not form grains and even fodder value of the crop will be almost nil. But, at 40% of normal rainfall, mulberry leaves will sprout and the farmers will get two out of the normal five crops.

Utilisation of unarable waste lands for sericulture development:

10. Mulberry and other non-mulberry food plants can be cultivated on non-arable and barren waste lands to carry-out silkworm rearing. Silkworm food plants like Mulberry, *Terminalia Arjuna*, *Terminalia Tomentosa*, Som and Soalu can be cultivated in non-arable waste lands and in shrub forest areas for silkworm rearing. In India, the Social Forestry Programme, the National Afforestation Programme and the programmes of Wasteland Development Board etc., can include cultivation of silkworm food plants providing employment opportunities to villagers and tribal inhabitants of the area.

ROLE OF INDIA IN WORLD SERICULTURE

11. Silk is produced both in the temperate and tropical zones mainly in Asia and also in some other parts of the world. But, henceforth the role of tropical area in the production of silk will become more important. The biggest silk producer in the world today is China followed by India, Japan, Soviet Union, the Republic of Korea, Brazil, Thailand, Vietnam and other countries. Essentially, silk is produced by the developing countries of Asia.

12. It is observed that as a country develops, its labour switches over from silkworm rearing to manufacturing industry. This can be seen in earlier days in France and Italy and later in Japan and

now in the Republic of Korea. This may be for two reasons; firstly as a country develops industrially the land available for cultivation of mulberry itself goes down. Secondly, as urbanisation and industrialisation go hand in hand, the rural labour available for silkworm rearing becomes less. Sericulture is a highly labour-intensive agro industry and reduced availability of labour results in reduced silk production.

13. It may be more than a coincidence that most of the developing countries are situated between the tropics of cancer and capricorn. The pressure of rural population in these developing countries is also high. In most of these developing countries in the tropical area, there is, therefore, a problem of finding gainful employment for rural labour within the rural area itself. It is very common that the unemployed rural labour migrates to cities and create slums. Viewed from this background, sericulture is an ideal industry to be developed in rural areas since mulberry cultivation, silkworm rearing and reeling of cocoons into silk, absorb a lot of labour. It is estimated that in India for every acre of intensive mulberry cultivation followed by silk production processes of reeling, twisting and weaving by handlooms, the employment generated is 5 man years.

14. Apart from absorbing rural labour, sericulture transfers income from the rich to the poorer section of the society. Of the total yarn production of the world in the form of Cotton, Wool, Silk and man-made fibres, silk accounts for only 0.16 per cent. It will therefore, remain as a luxury. Silk is mostly bought by the affluent while its production is mostly by small farmers, landless labour and generally the poorer sections of the society. What applies at the national level, also happens on an international plane. The developing countries which produce silk can export it to the developed countries and earn foreign exchange. It is worthwhile to remember that an important item of trade surplus of Japan before the Second World War was in the form of silk stockings and fabrics exported to the West.

15. India has a long tradition of producing and using silk. India produces all the four main types of silk namely mulberry, tasar, eri and muga. However, mulberry silk accounts for about 90% of India's silk production. Traditionally, it was Bengal which was the home of silk in India. In the second half of 18th century an enlightened king of Mysore, Tippu Sultan developed sericulture systematically in the southern peninsular India. From then on, Southern India became a major producer of silk. During the Second World War, the sericulture industry further developed because of the demand for silk for making parachutes. After the War, the States of Mysore and Madras, as they were then known, further developed the silk industry. Today the production of mulberry silk in India is about 8,000 tonnes of which about 90% is produced in the 3 states of Karnataka, Andhra Pradesh and Tamil Nadu.

16. Realising the importance of this industry, the Government of India and the State Governments are now taking steps to expand sericulture in all the States. Some of the states in India, which are making determined efforts to increase silk production are Orissa, Maharashtra, Kerala, Gujarat and Rajasthan. The scope for increasing silk production in other states, especially in the North-East of India, is immense. There need be no anxiety that a luxury product like silk will encroach upon food production. Apart from the increase in the productivity in food grains per unit of land, the area under mulberry in India itself is very small. The net area sown under agricultural crops in India is about 350 million acres of which the area under mulberry is about 6,000,000 acres. This is just 0.16 per cent of net area sown. There is therefore, scope for increasing mulberry areas to about 1% which will ultimately increase silk production to about 50,000 tonnes of raw silk giving employment to 20 million people in the rural India. Besides increasing the area, there is great scope for increasing productivity of silk per unit of land. For instance, the raw silk production per acre of land is about 52 kg in Hangzhou area in China, 40 kg in Japan and only 14 kg in India. The green revolution which has taken place in agriculture is still to happen in a significant way in sericulture.

17. One of the notable characteristics of Indian sericulture is that it has remained technologically a low capital intensive industry. The conversion of silk cocoons into silk yarn is done over 90% on cottage industry basis in the villages and small towns. The silk yarn so produced in the cottage industry

sector is woven to the extent of about 70%, in 200,000 handlooms. India is probably the only country where handlooms exist in large number. The policy of the Government of India is also to protect handlooms and therefore a large variety of woven silk cloth is reserved for handlooms.

18. The role of silk in the foreign trade of India is significant. From a meagre Rs. 76 million in 1971-72, the exports are reaching a level of Rs. 2,500 million during this year. This represents an increase from 0.47% to 1.61% in India's total export earnings. However, the share of India's export of silk in the total silk trade of the world is only about 10%. This is because of the huge domestic demand for silk fabrics resulting in very high price of raw silk. The primary consideration is therefore to increase silk production substantially and to upgrade the quality. The Central Silk Board and the major silk producing states of India have projects on the anvil which will increase mulberry silk production by about 100% in 5 years time. Given the right support, this is by no means impossible. Such doubling of production has already taken place in the leading Silk State of Karnataka. Karnataka's silk production increased from 2,500 tonnes in 1981 to 4,600 tonnes in 1987 on the successful implementation of the Rs. 1,100 million World Bank assisted Sericulture project.

19. Silk is a natural fibre and is indeed the queen of fabrics. It certainly cannot replace cotton. But it can become an important cash crop in the product-mix of the developing countries of Asia, Africa and South America. In tropical areas, sericulture gives a stream of income, 4-5 times from an acre of land in 10 months out of 12. But there are problems to be solved. For a long time sericulture has been developed mostly in the temperate regions like middle and northern China, Japan and Korea. Because of this, most of the practices evolved in silkworm rearing are oriented to temperate sericulture. The tropical areas have a natural advantage in producing better quality and more quantity of mulberry leaves. With this advantage of feed-base the tropical areas should evolve suitable, simple and hygienic rearing practices and should breed silkworm races which can thrive in comparatively hot and humid climate.

20. With a net cultivable area of over 360 million acres and a large rural population, India can become a world leader in silk production. Mulberry grows throughout the year under Indian climatic conditions unlike the temperate countries. The main problem in producing good quality of yarn is to evolve hardy silkworm races which can withstand the hot climate and unhygienic rearing conditions of Indian villages. The research institutes of the Central Silk Board are now changing the emphasis from high silk content to hardiness of the race while evolving new silkworm races. Added to this, we must also use multi-end and semi-automatic reeling machines increasingly to ensure better quality of yarn.

LA SERICICULTURE DANS LES PAYS TROPICAUX

V. BALASUBRAMANIAN

Central Silk Board, United Mansions, 2nd Floor, 39 Mahatma Gandhi Road, BANGALORE
560 001, Inde.

Soie et autres fibres.

1. Parmi les fibres naturelles et celles produites par l'homme, la soie représente une part insignifiante 0,17%. Parmi les fibres naturelles, coton, laine et soie, cette dernière représente 0,31%, comme le montre le tableau I.

Ce tableau montre que la production de fibres textiles mondiale ayant augmenté de 58% depuis 1970, la soie a augmenté de 37% entre 1970 et 1985. En réalité, la position est encore plus mauvaise si l'on compare la production de soie grège de 1938. En 1938, la production mondiale de soie était de 56 460 tonnes ; le Japon seul en produisait 43 150 tonnes. La production de soie mondiale a donc tout juste rattrapé le niveau d'avant-guerre. La raison principale est le déclin rapide de la production japonaise. La Chine, et à un moindre degré l'Inde, ont augmenté leur production pour pallier à la chute de la production du Japon.

Production de cocons et de soie grège :

2. La production mondiale de cocons, après avoir atteint un maximum de 438 000 tonnes en 1938 a décliné pendant les années d'après-guerre. Il a fallu attendre 1980 pour voir ce sommet d'avant-guerre dépassé. La production mondiale de cocons en 1985 s'élève à 535 400 tonnes métriques, par rapport à 390 000 tonnes en 1975. La croissance atteinte pendant cette période était de 37%.

3. La production de soie grège dans les pays tempérés tels que le Japon et la Corée du Sud est progressivement en diminution. La Chine et l'Inde sont les seuls pays du monde où la production augmente régulièrement. Le tableau II montre la tendance de la production de soie mondiale.

4. Le tableau II indique que la production de soie en Inde a augmenté d'environ 700 tonnes en 1938 à 8 000 tonnes en 1986. La production de cocons en Inde est en augmentation régulière. La progression de la production de soie grège est indiquée dans le tableau III.

Sériciculture et emplois

5. La sériciculture est une industrie très prometteuse d'emploi en raison du caractère domestique de l'élevage. Le mûrier doit être cultivé dans les fermes et les vers à soie doivent être nourris 4 fois par jour. Ceci implique un ramassage de feuilles quotidien pendant la période de nourrissage qui dure de 25 à 32 jours. Au début de l'élevage, les feuilles de mûrier doivent être coupées en petits morceaux et doivent être étalées sur les vers à soie se trouvant sur les claies. Chaque jour, les claies d'élevage doivent être nettoyées et les vers en mauvaise santé, malades et morts doivent être enlevés. Cela demande beaucoup de main d'œuvre. Normalement, tous les membres de la famille du fermier participent aux divers aspects de l'élevage. Lorsque les cocons ont été filés sur l'encabannage de bambou appelé Chandrikes, ils doivent être portés aux marchés de cocons pour être vendus. Au marché, les cocons sont recherchés par les filateurs qui les étouffent et filent le fil de soie. Le filateur

a besoin de beaucoup de main d'oeuvre. Lorsque la soie est filée, les filateurs la vendent au Silk Exchange du Karnataka et aux divers marchands dans le reste de l'Inde. Les marchands à leur tour vendent le fil aux mouliniers, aux tisseurs ou aux organisations de tissage. Environ 70% de la soie grège indienne est tissée sur des métiers à main et 30% sur des métiers mécaniques. Les métiers à main nécessitent aussi une main d'oeuvre importante. La répartition des emplois séricicoles apparaît dans le tableau IV.

6. Dans les conditions tropicales, les feuilles de mûrier sont disponibles toute l'année et les fermiers peuvent entreprendre 4 à 6 élevages. Pendant chaque élevage, le fermier doit rester chez lui et surveiller l'élevage. Aussi la culture du mûrier et l'élevage du ver à soie nécessitent la présence du fermier chez lui. L'un des principaux problèmes d'un pays très peuplé comme l'Inde est la migration des ouvriers agricoles, des petits fermiers et des fermiers marginaux vers les zones urbaines créant ainsi des bidonvilles. L'essor de l'industrie séricicole est en mesure d'arrêter cette sorte de migration vers les zones urbaines. Actuellement, 5,4 millions de personnes sont employées en sériciculture, la plupart d'entre elles proviennent de 45 000 villages sur les 576 000 villages indiens.

La sériciculture comme moyen d'élever le niveau de vie.

7. La sériciculture joue un rôle vital dans le transfert des richesses des couches les plus riches de la société vers les couches les plus pauvres. La soie est consommée principalement par les plus aisés et l'argent ainsi dépensé par l'achat de soie est distribué parmi les fermiers, filateurs, mouliniers, tisseurs et marchands. La plus grande partie de cet argent revient aux fermiers qui élèvent les vers à soie et produisent des cocons. Le pourcentage de distribution des richesses, à partir du tissu de soie grège (avant impression et teinture) est présenté dans le tableau V.

La sériciculture demande une courte période de gestation.

8. La sériciculture a une période de gestation très courte et elle commence à être rentable très rapidement. Dans les conditions tropicales, les fermiers peuvent élever des vers à soie et ils sont assurés d'un revenu à partir du 7^e mois suivant la plantation des mûriers. La sériciculture a un autre avantage qui est celui d'assurer des rentrées qui se succèdent rapidement, ce qu'aucune autre récolte ne peut assurer. Le fermier peut entreprendre un élevage tous les deux mois, deux mois et demi avec la même plantation et obtenir des rentrées cinq à six fois par an.

Bonne capacité du mûrier dans les conditions de sécheresse.

9. Le mûrier est une plante à racine profonde qui supporte bien la sécheresse. Pendant les dures sécheresses, alors que toutes les autres plantes périssaient, seul le mûrier a pu assurer au fermier un élevage correct de vers à soie et lui apporter des revenus lui permettant de surmonter la famine. On a vu que pendant les sécheresses les plus dures, les précipitations représentent 40% des précipitations normales. Pendant ces périodes de faibles précipitations, les céréales alimentaires ne forment pas de grain et leur valeur fourragère est presque nulle. Mais, avec des précipitations de 40% par rapport à la normale, les feuilles de mûrier poussent malgré tout et les fermiers ont deux récoltes sur les cinq normales.

10. Le mûrier et les autres plantes nourricières non-mûrier peuvent être cultivées sur des terres non arables et dévastées et permettre l'élevage du ver à soie. Les plantes nourricières du ver à soie, telles que le mûrier, *Terminalia arjuna*, *Terminalia tomentosa*, Som et Soalu, peuvent être cultivées sur des terrains non cultivables et dans les zones couvertes d'arbustes, pour l'élevage du ver à soie. En Inde le Social Forestry Programme (Programme social des Forêts), le National Afforestation Programme (Programme national pour le Reboisement) et les programmes pour le développement des terres dévastées, etc., incluent la culture des plantes nourricières du ver à soie et apportent des possibilités d'emploi pour les villages et les habitants de ces zones vivant en tribus.

ROLE DE L'INDE DANS LA SERICICULTURE MONDIALE

11. La soie est produite aussi bien dans les zones tempérées que dans les zones tropicales, principalement en Asie et aussi dans d'autres parties du monde. Aussi, le rôle de la production dans les zones tropicales est amené à devenir plus important. Le plus grand producteur de soie du monde est aujourd'hui la Chine, suivi par l'Inde, le Japon, l'Union Soviétique, la République de Corée, le Brésil, la Thaïlande, le Vietnam et d'autres pays. La soie est essentiellement produite par les pays d'Asie en voie de développement.

12. On a observé qu'au fur et à mesure qu'un pays se développe, sa main d'oeuvre passe de l'élevage du ver à soie à une industrie manufacturée. On a pu observer cela autrefois en France et en Italie, plus tard au Japon et maintenant en République de Corée.

Cela peut s'expliquer pour deux raisons : en premier lieu, à mesure qu'un pays se développe industriellement, le terrain disponible pour la culture du mûrier diminue. Deuxièmement, comme urbanisation et industrialisation vont de paire, le travail rural disponible pour l'élevage du ver à soie diminue. La sériciculture est une agro-industrie qui emploie une forte main d'oeuvre et une diminution de la production de soie entraîne une diminution des possibilités d'emploi.

13. La plupart des pays en voie de développement se situe entre le tropique du cancer et le tropique du capricorne ; cela est peut-être plus qu'une simple coïncidence. La pression de la population rurale dans ces pays en voie de développement est aussi très forte. Aussi dans la plupart des pays en voie de développement des zones tropicales, il est difficile de trouver des emplois rentables pour la population des zones rurales. Il est très fréquent que les chômeurs ruraux émigrent vers les villes et créent des bidonvilles. De ce point de vue, la sériciculture est une industrie idéale pour les zones rurales, puisque la culture des mûriers, l'élevage des vers à soie et le filage des cocons emploient beaucoup de main d'oeuvre. On estime qu'en Inde, pour chaque demi-hectare de culture intensive de mûrier suivie par la production de soie par filature, moulinage et tissage manuels, l'emploi généré est de 5 unités de travail-homme.

14. La sériciculture résorbe le chômage rural ; à côté de cela, elle permet le transfert des revenus des classes les plus riches aux classes les plus pauvres de la société. Sur la production mondiale totale de fil de coton, laine, soie et fibres faits manuellement, la soie compte pour 0,16 pour cent seulement. Elle restera donc un luxe. La soie est principalement achetée par la classe la plus aisée, alors que la production provient surtout des petits fermiers, des ouvriers agricoles et généralement des classes les plus pauvres de la société. Ce qui s'applique à un niveau national s'applique aussi au niveau international. Les pays en voie de développement producteurs de soie peuvent exporter vers les pays développés et acquérir des devises étrangères. Il est bon de se rappeler qu'une importante part du surplus au Japon avant la seconde guerre mondiale était sous forme de bas et de tissus de soie exportés vers l'Ouest.

15. L'Inde possède une longue tradition de production et d'utilisation de la soie. L'Inde produit les quatre types principaux de soie mûrier, tasar, eri et muga. Pourtant, la soie du mûrier représente environ 90 % de la production de soie indienne. Le Bengale était traditionnellement le centre de la soie en Inde. Dans la seconde partie du 18^e siècle, un roi éclairé de Mysore, le sultan Tipu a développé systématiquement la sériciculture dans la péninsule sud de l'Inde. A partir de ce moment, le sud de l'Inde est devenu le principal producteur de soie. Pendant la seconde guerre mondiale, l'industrie séricicole s'est encore développée en raison de la demande de soie pour parachutes. Après la guerre, les états de Mysore et Madras ont encore développé l'industrie de la soie. Aujourd'hui, la production de soie du mûrier en Inde est d'environ 8 000 tonnes dont 90 % est produit par les 3 états du Karnataka, Andhra Pradesh et Tamil Nadu.

16. Lorsqu'ils se sont rendus compte de l'importance de cette industrie, le gouvernement indien et les gouvernements des états ont pris des mesures pour développer la sériciculture dans tous les états. Certains nouveaux états de l'Inde tels que Orissa, Maharashtra, Kerala, Gujarat et Rajasthan,

font des efforts résolus pour améliorer leur production de soie. Les possibilités d'augmentation de la production de soie dans d'autres états, principalement dans le Nord-est de l'Inde sont immenses. Il n'y a pas de crainte à avoir qu'un produit de luxe comme celui-ci empiète sur la production des cultures vivrières. A part l'augmentation de productivité des céréales par unité de terrain, la zone productrice de mûrier est en elle-même très petite en Inde. Les zones cultivées en Inde couvrent environ 369 millions d'acres dont six mille sont plantés en mûrier. Cela représente juste 0,16 pour cent des zones cultivées. On pourra ainsi élargir les plantations de mûrier d'environ 1% ce qui augmentera finalement la production de soie d'environ 50 000 tonnes de soie grège et donnera un emploi à 20 millions de personnes dans l'Inde rurale. A côté de l'augmentation des surfaces, on pourra aussi augmenter la productivité de soie par unité de terrain. Par exemple, la production de soie grège par acre de terrain est d'environ 52 kg dans la région de Hangzhou en Chine, 40 kg au Japon et seulement 14 kg en Inde. La révolution verte qui a eu lieu en agriculture devra avoir lieu en sériciculture de manière significative.

17. L'une des caractéristiques notables de la sériciculture indienne est qu'elle est restée technologiquement à un bas niveau. La conversion de cocons de soie en fil de soie se fait dans plus de 90% au niveau artisanal dans les villages et petites villes. Le fil de soie ainsi produit artisanalement est filé jusqu'à 70% sur 200 000 métiers manuels. L'Inde est probablement le seul pays où les métiers manuels existent en aussi grand nombre. La politique du Gouvernement de l'Inde est de protéger les métiers manuels, aussi, une grande variété de tissus de soie est réservée aux métiers manuels.

18. Le rôle de la soie dans le commerce étranger de l'Inde est significatif. En 1971-1972, les exportations étaient de 76 millions de Roupies, elles atteindront 2 500 millions de Roupies cette année. Cela représente une augmentation de 0,47% à 1,61% de la totalité des gains d'exportation. Pourtant, la part des exportations de soie indienne par rapport au commerce de soie mondial total est seulement de 10%. Cela vient de l'immense demande intérieure de tissus de soie qui entraîne un coût élevé de la soie grège. La mesure essentielle est donc d'augmenter la production de soie de manière substantielle et d'améliorer la qualité. Le Central Silk Board et les principaux états indiens producteurs de soie ont des projets à l'étude pour augmenter la production de soie du mûrier d'environ 100% dans les cinq années à venir. C'est un projet tout à fait possible si l'on se donne les moyens. Un tel doublement de production a déjà eu lieu dans l'état pilote de la soie du Karnataka. La production de soie du Karnataka est passée de 2 500 tonnes en 1981 à 4 600 tonnes en 1987 grâce à la mise sur pied réussie du projet de Sériciculture assistée par les 1 100 millions de Roupies de la Banque mondiale.

19. La soie est une fibre naturelle et elle est véritablement la reine des textiles. Elle ne peut certainement pas remplacer le coton. Mais elle peut devenir une source importante de revenus dans l'éventail des produits des pays en voie de développement d'Asie, d'Afrique et d'Amérique du Sud. Dans les pays tropicaux, la sériciculture assure un revenu, 4-5 fois pendant 10 mois sur 12. Mais il reste des problèmes à résoudre. Pendant longtemps, la sériciculture a été développée principalement dans les régions tempérées comme la Chine du Nord et du Centre, le Japon, la Corée. C'est pourquoi la plupart des pratiques les plus avancées d'élevage du ver à soie sont orientées vers la sériciculture des pays tempérés. Les zones tropicales sont naturellement avantagées pour produire des feuilles de meilleure qualité et en plus grande quantité. Grâce à cet avantage, les zones tropicales devraient développer des pratiques d'élevage adaptées, simples et hygiéniques et devraient élever des races de vers à soie pouvant se développer dans un climat relativement chaud et humide.

20. Avec une zone cultivable nette de plus de 360 millions d'acres et une importante population rurale, l'Inde est devenu un leader mondial dans la production de soie. Sous le climat indien, les mûriers poussent toute l'année, contrairement aux pays tempérés. Le problème principal pour produire du fil de bonne qualité est de pouvoir obtenir des races de vers à soie résistants qui pourront supporter le climat chaud et les conditions d'élevage peu hygiéniques des villages indiens. Les instituts de recherche du Central Silk Board sont en train de changer d'objectif : d'un fort contenu en soie, on préfère développer de nouvelles races de vers à soie plus robustes. De plus, nous devons multiplier l'emploi des machines semi-automatiques et multi-bouts pour assurer une meilleure qualité de fil.

COMPARATIVE EVALUATION OF MORPHOLOGICAL CHARACTERS OF SOME OPEN-POLLINATED PROGENIES AND PARENTAL LINES OF MULBERRY

M.A. BARI, M.A. QUIYYUM, M. ISLAM and S.U. AHMED

Bangladesh Sericulture Research and Training Institute, Rajshahi, Bangladesh.

Sixty clonal lines, one indigenous variety and three improved selections were evaluated for total leaf yield and seven yield contributing characteristics. Data were collected four times a year corresponding to the four silk cocoon rearing seasons practised in Bangladesh. Results obtained suggest that the clonal line N 17 and 58 were the best performers and produced significantly higher total leaf yield per plant than the best improved selection (BSRM-19). Besides, four clonal lines (N 3, 33, 35 and 47) were also found to be promising. Simple correlation coefficients estimated suggest that leaf yield is a very complex character directly and/or indirectly affected by a number of components and that selection criteria need to be carefully devised.

Key-words: Open-pollination, Progeny, Mulberry

INTRODUCTION

Qualitative and quantitative improvement of mulberry is one of the basic requirements for establishing and flourishing sericulture industry in a country. Mulberry, with a number of species and varieties, is cultivated in Bangladesh mainly for its leaves used as feed for the rearing of silkworm, *Bombyx mori* L. Nearly 60-70% of the cost of cocoon production is attributed to mulberry leaf production. Earlier sericologists were of the opinion that importing high yielding exotic varieties and directly introducing them in the field might reduce the cost of production to a great extent. But experience has shown that exotic varieties could not replace the indigenous ones in tropical regions because of their difficulties in adaptation to local cultural practices. Therefore, developing high leaf yielding varieties through conventional breeding method is the prime necessity in order to boost-up sericultural activities in the region.

Breeding of mulberry through conventional methods commenced in Japan from the beginning of the present century. The variety 'Ichinose' which covers nearly 50% of total mulberry field in Japan was obtained by a chance selection from open-pollinated population. The varieties 'Kokuso-20', 'Kokuso -21' and Kokuso-27, on the other hand, are the products of artificial hybridization followed by selection (Das, 1983). Polyploidy and mutation breeding of mulberry were also reported in Japan leading to improve strains (Sugiyama, 1953; Hasama, 1967, Katagiri, 1985 and Tojyo *et al.*, 1986). In USSR, new mulberry varieties with an increase of 70% leaf yield per hectare were developed by selection procedure (Abdullav, 1962). Some high yielding varieties have also been developed from open-pollinated hybrids (Kuchkarov, 1978 and Nikuradze, 1982). In China, improved variety Lup-40' was developed from open-pollinated seedlings of the variety 'Jing' (Anonymous, 1985). A number of selections, including 'Kanva-2', were made from open-pollinated population in India. Improved mulberry varieties were also developed from hybrid seedlings (Das and Krishnaswami, 1965; Das and Chowdhury, 1973 and Das, 1983). No literature is available on mulberry breeding in Bangladesh. Hence, this is the first attempt to develop high yielding improved mulberry varieties through selection among open-pollinated offspring suitable for the environmental conditions of Bangladesh.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted at the Bangladesh Sericulture Research and Training Institute, Rajshahi, Bangladesh, during 1983-86. The parents were selected for their desirable economic characters. The characteristics features of the parents are described below:

Telia: Indigenous variety with highly dissected small leaves and very short internodes, dioecious.

BSRM-5: Improved variety selected from local cultivars having both entire and dissected leaves of medium size, dioecious.

BSRM-18: Improved variety, Indian origin with large entire leaves, monoecious.

BSRM-19: Improved variety, Indian origin with medium darkgreen and very shiny entire leaves, monoecious.

Open-pollinated seeds were harvested in March, 1983 and were shown in the seed bed. Seedling raised from these seeds were transplanted in the field in the following October for preliminary observation. Sixty promising seedlings were selected through visual inspection. The selected lines (hereafter referred to as clonal lines) and four parents were planted in the experimental plots through cuttings in September, 1984, in randomized block design with three replications. There were six rows for each entry and fifteen plants per row. The distance between plants within row and that between rows were 60 cm.

Normal cultural operations like irrigation, fertilization, weeding, etc. were carried out as and when needed. The plants were pruned four times a year according to the four cocoon crops and data were collected each time on eight quantitative characteristics viz. branch height (in cm), branch number per plant, leaf number per branch, leaf size (in cm^2), internodal distance (in cm), percentage of leaf fall, single leaf weight (in g) and total leaf yield (in g).

RESULTS AND DISCUSSION

The character measurement means of the clonal lines and four parents with respect to the eight characteristics studies over four seasons are presented in Table I. The results obtained are discussed as follows:

Branch height

The branch height was highly variable and ranged from 65.04 cm to 110.36 cm. None of the clonal lines were significantly different from the parent BSRM-19 producing tallest branches (106.37 cm), but a number of them were more or less similar to it. However, the clonal line N° 40 produced tallest branches (110.36 cm) among the clonal entries.

Branch number per plant

The number of branches per plant was highly variable and ranged from 11.11 to 37.5. The clonal line N° 43 (37.5) followed by 35 (36.56), 34 (33.54) and 13 (31.87) produced significantly more number of branches than the parent BSRM-18 producing highest number of branches per plant (29.70). The clonal line N° 43 which produced the highest number of branches per plant was 17.73% higher than the highest parent BSRM-18.

Leaf number per branch

The number of leaves per branch ranged from 23.87 to 34.02 and the highest number was obtained in the clonal line N° 50 (34.02) followed by 33 (32.67) and 36 (32.64). The clonal line N° 50 was significantly higher and had 6.81% more leaves per branch than the highest parent BSRB-19 (31.85).

Leaf size

The leaf size was highly variable and ranged from 55.44 cm^2 to 190.18 cm^2 . The largest leaf size was observed in the clonal line N° 52 (190.18) followed by 26 (189.06) and 8 (174.05). These three clonal lines produced significantly larger leaves than the highest parent BSRM-18 (138.80). The clonal line N° 52 produced 37% larger leaves than the highest parent. The parental line Telia produced the smallest leaf (55.44 cm^2). The high range of variation obtained for this character indicate presence of high genetic variability among the population studied and considerable improvement could be achieved.

Single leaf weight

	Branch height (cm) <i>Hauteur Branche</i> (cm)	Branch number <i>Nombre Branche</i>	Leaf number <i>Nombre Feuille</i>	Leaf size (cm ²) <i>Taille feuille</i> (cm ²)	Single leaf weight (g) <i>Poids d'une feuille</i> (g)	Leaf fall (%) <i>Chute feuilles</i> (%)	Inter- nodal distance (cm) <i>Distance inter- nodale</i> (cm)	Leaf yield (g) <i>Rendt. feuilles</i> (g)
Telia	65.04	13.72	24.01	55.44	0.70	24.22	2.61	101.44
BSRM-5	90.62	19.21	27.12	119.81	1.54	27.82	3.28	306.36
BSRM-18	86.72	29.70	28.73	138.80	1.67	27.45	3.01	379.10
BSRM-19	106.37	29.60	31.85	127.68	1.89	27.40	3.32	380.87
1	93.75	21.63	28.97	103.60	1.42	30.55	3.17	161.35
2	93.75	16.32	27.53	123.93	1.72	26.40	3.32	260.66
3	106.13	21.87	31.77	143.44	1.20	26.00	3.25	382.37
4	100.35	14.74	28.97	147.62	1.52	22.50	3.41	185.90
5	84.10	26.96	25.43	124.94	1.65	26.85	3.24	254.22
6	81.38	19.89	30.23	156.63	1.85	29.75	2.67	274.89
7	75.77	13.96	24.53	107.64	2.22	26.00	2.96	172.93
8	81.38	18.25	24.33	174.05	2.60	23.90	3.37	213.94
9	78.23	17.42	27.67	136.88	1.56	30.17	2.75	204.36
10	82.72	28.25	25.22	102.76	1.80	34.42	3.23	267.62
11	95.07	21.67	30.00	99.24	1.57	27.32	3.46	259.42
12	84.89	18.30	27.28	137.38	1.85	29.27	2.93	303.48
13	89.41	31.87	31.52	75.24	0.98	25.80	2.78	266.58
14	84.05	15.87	28.42	150.57	2.30	22.50	2.95	310.32
15	91.44	20.47	27.01	113.87	1.60	28.77	3.34	239.26
16	90.11	25.14	29.14	108.61	1.42	27.92	3.05	254.48
17	103.45	24.22	30.97	155.69	2.16	29.00	3.32	402.11
18	97.83	22.31	29.33	161.04	1.80	28.77	3.28	338.10
19	85.00	13.57	26.72	94.18	1.25	19.87	3.13	141.33
20	92.22	18.32	25.12	139.61	2.03	25.52	3.64	219.13
21	77.11	11.11	23.87	175.26	2.05	29.12	3.16	182.75
22	90.17	28.80	27.85	119.69	1.85	30.57	3.20	298.16

Table I. Mean performance of some qualitative characters in mulberry.

Tableau I. Performances moyennes de certains caractères qualitatifs du mûrier.

(First part : to be continued/ *Première partie : suite p. suivante*)

	Branch height (cm) <i>Hauteur Branche</i> (cm)	Branch number <i>Nombre Branche</i>	Leaf number <i>Nombre Feuille</i>	Leaf size (cm ²) <i>Taille feuille</i> (cm ²)	Single leaf weight (g) <i>Poids d'une feuille</i> (g)	Leaf fall (%) <i>Chute feuilles</i> (%)	Inter- nodal distance (cm) <i>Distance inter- nodale</i> (cm)	Leaf yield (g) <i>Rendt. feuilles</i> (g)
23	96.18	18.14	28.48	123.66	1.63	27.05	3.30	234.52
24	94.20	14.21	29.96	129.27	1.72	23.65	3.12	212.37
25	91.25	14.18	30.06	146.04	2.02	24.92	2.94	200.74
26	79.24	12.41	25.20	189.06	2.32	26.25	3.17	239.26
27	92.50	12.96	29.56	169.13	2.30	20.52	3.11	292.12
28	81.16	12.26	26.37	150.73	2.21	28.45	3.02	216.39
29	100.60	13.68	26.25	168.50	2.02	22.95	3.70	236.24
30	89.17	12.74	30.34	133.12	1;61	22.62	2.99	214.52
31	103.74	16.03	28.87	118.37	1.61	23.47	3.34	249.53
32	95.31	16.81	29.88	125.21	1.53	25.65	3.28	200.24
33	106.16	24.64	32.67	121.24	1.78	24.05	3.49	379.69
34	110.14	33.54	29.03	108.28	1.03	27.07	3.17	283.73
35	85.90	36.56	26.27	117.10	1.49	26.05	2.92	376.90
36	93.42	22.27	32.64	116.07	1.28	24.07	3.52	201.94
37	105.90	19.88	27.33	143.37	1.77	26.85	3.26	241.09
38	103.07	20.47	27.69	151.02	1.88	31.17	3.33	262.72
39	89.11	21.12	30.23	98.45	1.19	25.65	3.19	188.63
40	110.36	18.79	27.20	113.97	1.75	25.42	3.45	210.14
41	82.59	21.04	30.18	120.53	1.60	28.50	2.94	201.93
42	89.46	20.25	30.87	146.13	1;58	26.05	2.88	257.43
43	88.57	37.50	31.92	115.39	1.54	28.27	2.88	294.57
44	99.00	21.47	28.51	106.58	1.37	29.57	3.09	202.40

Table I. Mean performance of some qualitative characters in mulberry.

Tableau I. Performances moyennes de certains caractères qualitatifs du mûrier.

(Second part : to be continued/ Deuxième partie : suite p. suivante)

	Branch height (cm) <i>Hauteur Branche</i> (cm)	Branch number <i>Nombre Branche</i>	Leaf number <i>Nombre Feuille</i>	Leaf size (cm ²) <i>Taille feuille</i> (cm ²)	Single leaf weight (g) <i>Poids d'une feuille</i> (g)	Leaf fall (%) <i>Chute feuilles</i> (%)	Inter- nodal distance (cm) <i>Distance inter- nodale</i> (cm)	Leaf yield (g) <i>Rendt. feuilles</i> (g)
45	93.73	21.38	28.45	157.47	2.44	28.17	3.24	258.38
46	90.81	14.79	25.64	128.19	2.10	23.65	3.10	194.50
47	90.02	25.34	27.50	134.09	1.82	26.72	3.51	380.87
48	88.45	15.89	30.02	137.30	1.90	27.92	3.20	220.13
49	89.82	15.75	29.33	140.07	1.67	22.82	2.99	275.46
50	89.37	14.29	34.02	149.12	2.20	25.42	2.98	234.57
51	93.95	24.35	31.00	121.37	1.13	28.27	2.76	362.06
52	106.90	18.12	25.42	190.18	2.17	25.92	3.34	309.16
53	79.56	12.68	27.93	162.86	2.75	30.52	3.07	228.80
54	96.52	17.31	29.04	140.38	1.72	29.12	3.40	189.56
55	101.62	22.90	28.40	148.60	1.71	33.52	3.44	300.89
56	85.39	25.58	27.01	120.11	1.65	29.83	2.96	246.96
57	85.81	19.27	29.67	118.35	1.47	28.82	3.14	186.31
58	91.80	22.36	30.23	151.05	2.13	28.20	3.07	401.09
59	96.08	20.55	24.93	114.33	1.43	26.05	3.19	267.22
60	78.53	12.25	29.61	139.23	2.00	24.47	3.03	183.72
LSD at 5 %	5.95	1.82	2.16	32.42	0.21	0.66	0.19	9.41

Table I. Mean performance of some qualitative characters in mulberry.

Tableau I. Performances moyennes de certains caractères qualitatifs du mûrier.

(Third part/ Troisième partie)

The weight of single leaf was highly variable ranging from 0.70 g to 2.75 g. A number of clonal lines (7, 8, 14, 17, 26, 28, 45, 50, 52, 53, and 58) showed significantly higher leaf weight over the highest parent. Clonal line N° 53 produced heaviest leaves (2.75 g) which was 45.5% more than the parent BSRM-19 having highest single leaf weight (1.89g).

Percentage of leaf fall

The percentage of leaf fall was the least variable among the characters studied and ranged from 19.87 % to 34.42 %. Highest leaf fall percentage was noticed in the clonal line 10 (34.42) followed by 38 (31.17) and 22 (30.57). Besides, a good number of clonal lines (1, 6, 9, 10, 12, 15, 17, 18, 21, 22, 28, 38, 41, 44, 45, 51, 53, 55, 56 and 58) also showed significantly increased leaf fall percentage than the highest parental value. However, the leaf fall percentage is strongly related to environmental stress and may obscure any conclusion.

Internodal distance

Internodal distance ranged from 2.61 cm to 3.70 cm and the largest internodal length was observed in the clonal line N° 29 (3.70 cm) followed by 20 (3.64 cm) and 36 (3.52 cm). A number of clonal lines (20, 29, 36 and 37) showed significantly increased internodal distance over the highest parent BSRM-19 (3.32 cm). The parent Telia showed the smallest internodal distance among population. Internodal distance was found to be relatively less variable.

Leaf yield

The leaf yield per plant was highly variable and ranged from 101.44 g to 402.11 g. The clonal line N° 17 (402.11 g) followed by line N° 58 (401.09 g) produced significantly higher leaf yield than the parent BSRM-19 which produced the highest leaf yield (380.87 g) per plant among the parents. The clonal line N° 17 and 58 which produced highest leaf yield per plant were 5.57 % and 5.30 % respectively, more than the highest parent BSRM-19.

Mulberry plants with tall branches, more number of branches per plant, more number of leaves per branch, large leaves with short internodal distance are desirable and are considered as the criteria for screening and selecting improved variety (Ogure, 1977). The results obtained in the present investigation and discussed herein suggest that the clonal line N 17 and 58 produced highest total leaf yield per plant and also possessed significantly taller branches, heavier and larger leaves. A number of clonal lines, such as 3, 33, 35 and 47, were found to be promising when overall performance with respect to the characteristics studies was taken into consideration.

Simple correlation coefficient

All possible simple correlation coefficient calculated between pairs of characters are given in Table II. A highly variable spectrum of relationships was observed. Branch height was positively and significantly correlated with leaf yield, leaf number per branch and internodal distance but was significantly and negatively associated with branch number. Branch number, on the other hand, had highly significant positive correlation with leaf yield, leaf number per branch and leaf fall but was negatively and significantly correlated with single leaf weight and leaf size. Single leaf weight did not show any correlation with leaf yield but had highly significant positive association with leaf size and internodal distance. Single leaf weight, on the other hand, was negatively and significantly correlated with branch number and leaf number per branch. Leaf size was insignificantly and positively correlated with leaf yield, single leaf weight and internodal distance, but it has significantly negative association with branch number, leaf number per branch and leaf fall percentage.

The results obtained indicate that leaf yield in mulberry is a very complex character and selection criteria should be carefully designed. Plants with medium height would produce more number of branches per plant, more leaves per branch and more yield per plant. Increased number of branches per plant would, however, reduce leaf size and single leaf weight. Plants with short internodes are generally preferred in mulberry but the results obtained in the present study suggest that plants with long internodes would have more number of leaves per branch together with large and heavier leaves.

REFERENCES

- ABDULLAV K., 1962, *Koklady Akad Nauk Azerbaizhanskoil SSR* 17 (5), 411-414.

Characters	Branch number/ plant	Leaf numbe/r branch	Leaf size	Inter- nodal distance	% of leaf fall	Single leaf weight	Total leaf yield/ plant
<i>Caractères</i>	<i>Nombre branches/ plante</i>	<i>Nombre feuilles/ branche</i>	<i>Taille feuilles</i>	<i>Distance inter nodale</i>	<i>% de chute des feuilles</i>	<i>Poids d'une feuille</i>	<i>Rendement total feuilles/ plante</i>
Branch height	0.53**	0.54**	0.09	0.72**	0.01	60.15	0.39**
<i>Hauteur de branche</i>							
Branch number per plant		0.37**	0.35**	0.11	0.39**	0.40**	0.56**
<i>Nombre de branches par plante</i>							
Leaf number per branch			-0.06	0.25**	-0.02-0.40**	0.17	
<i>Nombre de feuilles par branche</i>							
Leaf size				0.25*	-0.004	0.74**	0.24*
<i>Taille des feuilles</i>							
Internodal distance					0.19	0.91**	0.16
<i>Distance internodale</i>							
Percentage of leaf fall						-0.04	0.17
<i>Pourcentage de chute de feuilles</i>							
Single leaf weight						0.09	
<i>Poids d'une feuille</i>							

*=Significant at 1 %/ *Significatif à 1%* **=significant at 5%/ *Significatif à 5%*

Table II. Correlation coefficients among eight characters in mulberry

Tableau II. Coefficients de corrélation sur huit caractères du mûrier

ANONYMOUS, 1985, Mulberry cultivation, Regional Sericulture Training Centre Guangzhou, China, 114-116.

DAS B.C. and P.C. CHOWDHURY, 1973, Evaluation of improved strains of mulberry. Paper presented at the 12th International Silk Congress, Barcelona, Spain, 26th May 1973.

DAS B.C. and S. KRISHNASWAMI, 1965, Some observations in interspecific hybridization in mulberry. *Indian J. Seric.*, 4, 1-8.

DAS B.C., 1983, Mulberry taxonomy, cytogenetics and breeding. Paper presented in the National Seminar on Silk Research and Development, March 10-13, Bangalore, 7.

HASAMA K. 1967, Induced mutation and plant breeding in vegetatively propagated species. *J. Seric. Sci. Japan*, 36(4), 346-352.

KATAGIRI K, 1985, Cytological, histological and genetical studies on mutation induction in mulberry. *Bull. Seric. Exp. Sta.*, 29(4), 495-498.

KUCHKAROV U., 1978, Economically useful top crosses of mulberry. *Reterativnyi Zhurnal*, 65(9), 260, as referred in plant breeding abstract, 50(1), 740.

NIKURADZE V.G., 1982, Choice of parental pairs for reproduction of mulberry by seeds. *Plant Breeding Abstract* 54 (485), 3731.

OGURE m., 1977, Time for assessing various characters in mulberry breeding, *Bull. Seric. Exp. Sta.*, 27(2), 243-277.

SUGIYAMA T., 1953, Studies on the hybridization of mulberry trees by the use of cuttings. *Bull. Seric. Exp. Sta.*, 14(4), 157-198.

TOJYO I.G. WATANABE and S. HAYASAKA, 1986, Breeding of new triploid mulberry cultivars. *Bull. Seric. Exp. Sta.* 30(2), 245-250

EVALUATION COMPARATIVE DES CARACTERES MORPHOLOGIQUES DE QUELQUES DESCENDANTS OBTENUS PAR POLLINISATION OUVERTE ET DES LIGNEES PARENTALES DE MURIER

M.A. BARI, M.A. QUIYYUM, M. ISLAM and S.U. AHMED

Bangladesh Sericulture Research and Training Institute, Rajshahi, Bangladesh.

Le rendement total en feuilles et sept caractéristiques contribuant au rendement ont été étudiées chez soixante lignées clonales, une variété indigène et trois sélections améliorées. Les données ont été collectées quatre fois dans l'année au cours des quatre saisons d'élevage séricicole pratiquées au Bangladesh. Les résultats obtenus indiquent que les lignées clonales N° 17 et 58 sont les meilleurs producteurs et donnent un rendement total de feuilles par plante supérieur à celui des sélections plus améliorées (BSRM-19). Par ailleurs, quatre autres lignées clonales (N° 3, 33, 35 et 47) se sont également avérées prometteuses. De simples estimations de coefficients de corrélation indiquent que le rendement en feuilles est de caractère complexe, directement et/ou indirectement affecté par un nombre de composants et que les critères de sélection doivent être soigneusement choisis.

INTRODUCTION

Les améliorations qualitatives et quantitatives du mûrier sont des impératifs de base pour l'établissement d'une industrie séricicole prospère. Le mûrier, de même qu'un certain nombre d'espèces et de variétés, est cultivé au Bangladesh principalement pour ses feuilles qui servent de nourriture dans les élevages de vers à soie *Bombyx mori* L. Presque 60-70% du coût de la production de cocons sont attribués à la production de feuilles de mûrier. Les sériciculteurs d'autrefois pensaient que l'importation de variétés exotiques à haut rendement et leur introduction directe dans les plantations pourraient réduire de beaucoup le coût de la production. Mais l'expérience a montré que les variétés exotiques ne pouvaient pas remplacer les variétés indigènes des régions tropicales, en raison de leur difficulté d'adaptation aux conditions de culture locale. C'est pourquoi le développement de variétés à haut rendement de feuilles par des méthodes de culture conventionnelles est la condition première à l'essor des activités séricoles dans la région.

La culture du mûrier par des méthodes conventionnelles a commencé au Japon au début de ce siècle. La variété "Ichinose" qui couvre presque 50% de la totalité des champs japonais a été obtenue grâce à une sélection au hasard réalisée par pollinisation ouverte de la population. Les variétés "Kokuso 20", "Kokuso-21" et "Kokuso-27" d'autre part, sont le produit d'une hybridation artificielle, suivie de sélection (Das, 1983). On dit aussi au Japon que la polyploidie et la culture du mûrier par mutation conduit à l'amélioration des races (Sugiyama, 1953; Hasama, 1967; Katagiri, 1985 et Tojyo et al. 1986). En URSS, de nouvelles variétés de mûrier donnant une augmentation de 70% du rendement en feuilles, ont été développées par sélection (Abdullav, 1962). Certaines variétés à haut rendement ont aussi été développées à partir d'hybrides obtenus par pollinisation ouverte (Kuchkarov, 1978 et Nikuradre, 1982). En Chine, la variété améliorée "Lup-40" a été développée à partir de jeunes plants obtenus par pollinisation ouverte de la variété "Jing" (Anonyme, 1985). Un certain nombre de sélections, "Kanva-2" y compris, ont été faites en Inde à partir de la population à pollinisation ouverte. Les variétés améliorées de mûrier ont été développées à partir de jeunes plants hybrides (Das et Krishnaswami, 1965; Das et Chowdhury, 1973 et Das, 1983). Il n'existe aucune littérature disponible

sur la culture du mûrier au Bangladesh. D'où ce premier essai pour développer des variétés de mûrier à haut rendement, améliorées par la sélection parmi les descendants obtenus par pollinisation ouverte convenant aux conditions de l'environnement au Bangladesh.

MATERIELS ET METHODES

L'expérience a été conduite au Bangladesh Sericulture Research and Training Institute, Rajshahi, Bangladesh en 1983-1986. Les parents ont été sélectionnés pour leurs caractères économiques intéressants. Les traits caractéristiques des parents sont décrits ci-dessous :

Telia : Variété indigène avec de petites feuilles très découpées, de très petits internœuds, dioïque.

BSRM-5 : Une variété améliorée sélectionnée à partir de cultivars locaux ayant des feuilles pleines et découpées de taille moyenne, dioïque.

BSRM-18 : Variété améliorée, d'origine indienne avec de larges feuilles pleines, monoïque.

BSRM-19 : Variété améliorée, d'origine indienne avec des feuilles moyennes vert foncé et très brillantes, monoïque.

Les graines obtenues par pollinisation ouverte ont été récoltées en mars 1983 et disposées sur des lits de grainage. Les jeunes plants issus de ces graines ont été transplantés dans les champs au mois d'octobre suivant pour les observations préliminaires. Soixante jeunes plants ont été sélectionnés par simple inspection. Les lignées sélectionnées (appelées plus loin lignées clonales) et quatre parents ont été plantés, sur des parcelles expérimentales à partir de tailles de septembre 1984, disposés au hasard, en trois réplicats. Il y avait six rangées pour chaque lignée et quinze plantes par rangée. La distance séparant les plantes sur un même rang et celle séparant les rangs était de 60 cm.

Les opérations normales de culture telles que irrigation, fertilisation, désherbage ont été accomplies suivant les besoins. Les plants ont été taillés quatre fois par an, suivant les quatre récoltes de cocons et on a collecté les données portant sur huit caractéristiques quantitatives, c'est à dire : hauteur de branche (en cm), nombre de branches par plante, nombre de feuilles par branche, taille de la feuille (en cm^2), distance internodale (en cm), pourcentage de chute des feuilles, poids d'une feuille (en g) et rendement total en feuilles (en g).

RESULTATS ET DISCUSSION

Les moyennes des caractères des lignées clonales et des 4 parents concernant les huit caractéristiques étudiées sur quatre saisons sont présentées dans le Tableau I. Les résultats obtenus amènent la discussion suivante :

Hauteur de branche :

La hauteur de branche est très variable et se situe entre 65,04 cm et 110,36 cm. Aucune des lignées clonales n'est significativement différente des parents, BSRM-19 produisant les plus hautes branches (106,37 cm) mais un grand nombre d'entre elles sont plus ou moins similaires. Pourtant la lignée clonale N° 40 produit les branches les plus hautes (110,36 cm).

Nombre de branches par plante

Le nombre de branches par plante est très variable et se situe entre 11,11 et 37,50. La lignée clonale N° 43 (37,5) suivie par 35 (36,56), 34 (33,54) et 13 (31,87) ont produit un nombre significativement plus important de branches que les parents BSRM-18 produisant le nombre le plus élevé de branches par plante (29,70). La lignée clonale N° 43 produisant le plus grand nombre de branches par plante est 17,73% plus haute que le meilleur parent BSRM-18.

Nombre de feuilles par branche

Le nombre de feuilles par branche se situe entre 23,87 et 34,02 et le nombre le plus élevé est obtenu par la lignée clonale N° 50 (34,02) suivie par 33 (32,67) et 36 (32,64). La lignée clonale N° 50 est significativement meilleure et a 6,81% de plus de feuilles par branche que le meilleur parent BSRM-19 (31,85).

Taille de la feuille

La surface de la feuille est très variable et va de 55,44 cm^2 à 190,18 cm^2 . La taille de feuille la plus large est observée sur la lignée clonale N° 42 (190,18) suivie par 26 (189,06) et 8 (174,05). Ces trois lignées clonales produisent des feuilles significativement plus larges que les meilleurs parents.

BSRM-18 (138,80). La lignée clonale N° 52 produit des feuilles plus larges de 37% par rapport au meilleur parent. La lignée parentale Telia produit la feuille la plus petite (55,44 cm²). La grande amplitude de variation obtenue pour ces caractères indique la présence d'une forte variabilité génétique parmi la population étudiée et une amélioration considérable pourrait être obtenue.

Poids d'une feuille

Le poids d'une feuille est fortement variable. Il varie de 0,70 g à 2,75 g. Un certain nombre de lignées clonales (7, 8, 14, 17, 26, 28, 45, 50, 52, 53 et 58) donnent un poids de feuilles significativement plus élevé que leur parent le plus élevé. La lignée clonale N 53 donnent les feuilles les plus lourdes (2,75 g) ce qui est supérieur de 45,5% au parent BSRM-19 lequel donne le poids d'une feuille le plus élevé (1,89 g).

Pourcentage de chute des feuilles

Le pourcentage de chute de feuilles est le moins variable des caractères étudiés et il se situe entre 19,87% et 34,42%. Le pourcentage de chute des feuilles le plus élevé a été observé dans la lignée clonale 10 (34,42) suivie par 38 (31,17) et 22 (30,57). Par ailleurs, un bon nombre de lignées clonales (1, 6, 9, 10, 12, 15, 17, 18, 21, 22, 28, 38, 41, 44, 45, 51, 53, 55, 56 et 58) donnent également un pourcentage de chute de feuilles significativement supérieur aux valeurs parentales les plus hautes. Cependant, le pourcentage de chute de feuilles est étroitement lié au stress de l'environnement et peut fausser les conclusions.

Distance internodale

La distance internodale se situe entre 2,61 cm à 3,70 cm et la longueur la plus grande est observée dans la lignée clonale N° 29 (3,70 cm) suivie par 20 (3,64 cm) et 36 (3,52 cm). Un certain nombre de lignées clonales (20, 29, 36 et 37) donnent une distance internodale significativement plus grande par rapport au parent le plus élevé BSRM-19 (3,32 cm). Le parent Telia donne la distance internodale la plus courte de la population. La distance internodale s'avère être relativement moins variable.

Rendement de feuilles

Le rendement de feuilles par plante est fortement variable et se situe entre 101,44 g et 402,11 g. La lignée clonale N° 17 (402,11 g), suivie par la lignée N 58 (401,09 g) produisent une quantité de feuilles significativement plus élevée que le parent BSRM-19 qui produit le poids de feuilles le plus élevé (380,87 g) par plante parmi les parents. Les lignées clonales N° 17 et 58 qui donnent le rendement en feuilles le plus élevé par plante sont respectivement 5,57% et 5,30% plus productives que le parent le plus fort BSRM-19.

On préfère les mûriers avec des branches hautes, avec un plus grand nombre de branches par plante, un plus grand nombre de feuilles par branche, de grandes feuilles avec de petites distances internodales. Ces critères servent pour la sélection de variétés améliorées (Ogiere, 1977). Les résultats obtenus et discutés ici indiquent que les lignées clonales N° 17 et 58 produisent le rendement total de feuilles par plante le plus élevé et possèdent également les branches significativement les plus hautes, les feuilles les plus lourdes et les plus grandes. Un certain nombre de lignées clonales, telles que 3, 33, 35 et 47, s'avèrent être prometteuses quant aux résultats concernant les caractéristiques étudiées.

Coefficients de corrélation simples

Tous les coefficients de corrélation simples possibles calculés entre paires de caractères sont donnés dans le Tableau II. Un profil hautement variable de relations est observé. La hauteur de branche est positivement et significativement corrélée avec le rendement en feuilles, le nombre de feuilles par branche et la distance internodale mais est significativement et négativement associée au nombre de branches. Le nombre de branches, d'un autre côté, présente une corrélation positive, hautement significative avec le rendement en feuilles, le nombre de feuilles par branche et la chute des feuilles, mais est négativement corrélé de manière significative avec le poids de feuille individuel et la taille de la feuille. Le poids d'une feuille ne présente pas de corrélation avec le rendement en feuilles mais est associé positivement de manière hautement significative à la taille des feuilles et la distance internodale. Le poids individuel de la feuille, d'autre part, est corrélé négativement et de manière significative avec le nombre de branches et le nombre de feuilles par branche. La taille des feuilles est significativement et positivement corrélée au rendement en feuilles, au poids d'une feuille et à la distance internodale mais elle est significativement et négativement associée au nombre de branches, au nombre de feuilles par branche et au pourcentage de chute des feuilles.

Les résultats obtenus indiquent que le rendement en feuilles chez le mûrier est un caractère très complexe et les critères de sélection doivent être indiqués avec beaucoup de soin. Les plantes d'une hauteur moyenne produisent un plus grand nombre de branches par plante, plus de feuilles par branche et un rendement en feuilles par plante supérieur. Un nombre plus élevé de branches par plante réduit pourtant la taille des feuilles et le poids d'une feuille. Les plantes ayant de petits internoeuds sont en général préférés chez le mûrier, mais les résultats obtenus dans la présente étude laissent penser que les plantes ayant de longs internoeuds produisent plus de feuilles par branche ainsi que des feuilles plus larges et plus lourdes.

ANATOMY OF FOLIACEOUS STIPULE OF MULBERRY

N.K. DWIVEDI, N. SURYANARAYANA and A.K. SIKDAR

Mulberry Breeding and Genetics Section, Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore 570 008, India.

In the present investigation anatomy of foliaceous stipule of triploid mulberry has been described. The epidermis normally single layered, occasionally multilayered. The cuticle is thin. Glandular and non-glandular trichomes are present. Stomata are of ranunculaceous type. The mesophyll is uniformly differentiated into palisade and spongy parenchyma. The bundle sheath extends horizontally under the upper epidermis. The petiole is circular in out line and has incomplete stele.

Keywords: Anatomy, Foliaceous stipule, Diploid mulberry, Triploid mulberry, *Morus alba*.

INTRODUCTION

The stipules form an important diagnostic character in taxonomy and their major role seems to be the protection of young developing leaves. However, their morphology is in a state of confusion. The stipule is lateral, scale like and caducous in the members of the family Moraceae (Hooker, 1885). Cross (1937) studied the development of leaf and stipules in *Morus alba*, while Pundir (1976) investigated the structures in *Ficus glomerata*. The present note of investigation deals with morphological and anatomical studies in foliaceous stipule in triploid and stipule like scale in diploid mulberry.

MATERIAL AND METHODS

The foliaceous stipules and stipule like scales collected from autotriploid mulberry raised from autotetraploid variety S36 (*M. indica* L.) and diploid mulberry (*M. indica* var. S36) were fixed in F.A.A. The materials dehydrated through tertiary butyl alcohol were embedded in paraffin wax. Microtome sections cut at 7-10 microns thickness were stained with safranin and fast green combination. Number of chloroplast per stoma was determined by staining epidermal strips of leaf with 2% I + K I solution. For stomatal study abaxial epidermal layer was peeled off and mounted on a glass slide in a drop of water.

RESULTS AND DISCUSSION

Morphology

The stipule is boat shaped with serrated margins (Fig. 1). It appears at the base of petiole in pair. It is dark green in colour. The mean number of chloroplast/pair of guard cell (Fig. 7) and number of stomata/unit area (Fig. 8) are 23.9 and 55.6 respectively. The size of stoma is 19.50 x 12.40 microns. Two types of trichomes i.e. non-glandular and glandular (Figs. 9, 10) are frequent on both surfaces of the stipule.

In diploid mulberry stipule is thin scale like structure. The mean number of chloroplast/pair of guard cells and number of stomata/unit area are 13.5 and 60 respectively. The size of stomata is 16.30 x 10.25 microns. Uniseriate three celled non-glandular trichomes are restricted to the abaxial side only.

Figs. 1-10 : Foliateous stipule in triploid mulberry.

Fig. 1 à 10 : Stipule de la feuille du mûrier triploïde.

Fig. 1. Boat shaped foliateous stipules.

Fig. 1. Stipules en forme de barque.

Fig. 2. Transversal section of stipule, multiple upper epidermis, crystal.

Fig. 2. Coupe transversale de la stipule, épiderme supérieur multiple, cristal.

Fig. 3. Transversal section of stipule, single layered lower epidermis, stomata.

Fig. 3. Coupe transversale de la stipule, épiderme inférieur à couche unique, stomate.

Fig. 4. Transversal section of stipule, cystolith.

Fig. 4. Coupe transversale de la stipule, cytolithe.

Fig. 5. Transversal section of stipule, vein, multiple upper epidermis.

Fig. 5. Coupe transversale de la stipule, nervure, épiderme supérieur multiple.

Fig. 6. Transversal section of midrib.

Fig. 6. Coupe transversale de la nervure principale.

Fig. 7. Stomatal chloroplasts.

Fig. 7. Chloroplastes des stomates.

Fig. 8. Stomatal frequency.

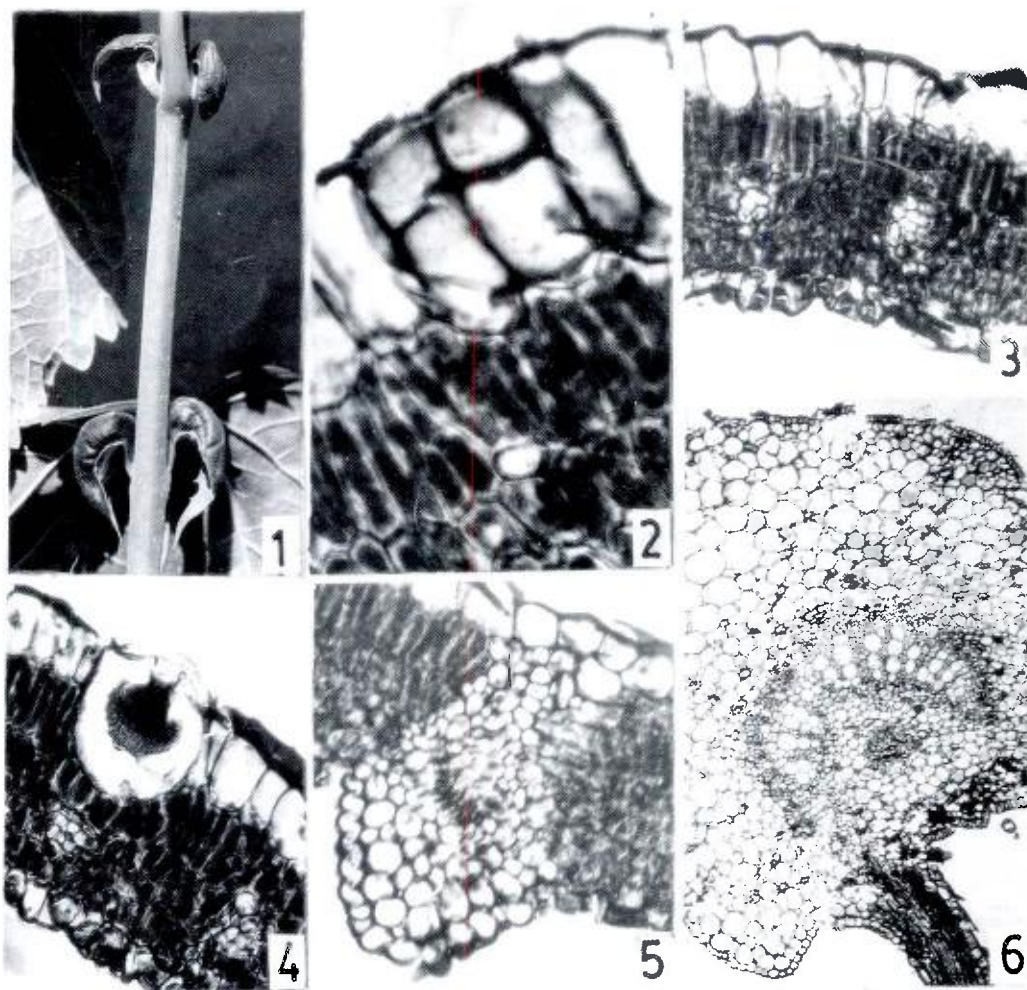
Fig. 8. Fréquence des stomates.

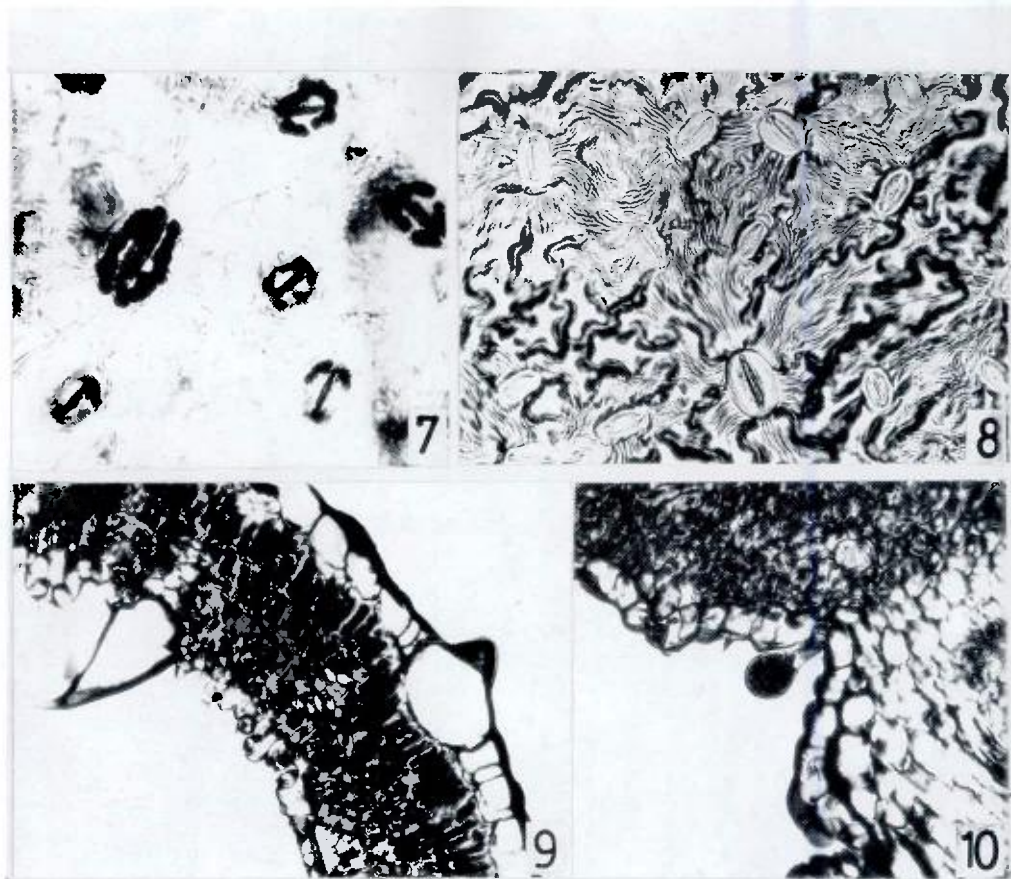
Fig. 9. Transversal section of stipule, non-glandular trichome.

Fig. 9. Coupe transversale de la stipule, trichome non glandulaire.

Fig. 10. Transversal section of stipule, glandular trichome.

Fig. 10. Coupe transversale de la stipule, trichome glandulaire.





Anatomy

Lamina

Epidermis: The upper epidermis is normally single layered (Figs. 3, 4) but sometimes it may be two layered over veins and veinlets (Figs. 2, 5). More than two layers of epidermis are formed due to periclinal division in the protoderm and derivatives of these divisions may divide and form a multiple epidermis as reported in epidermis of mulberry lamina (Shah and Kachroo, 1979). The cells are longer than broad. The outer walls are rather thicker than the inner and anticlinals tend to be wavy. Stomata are absent but cystoliths are quite common (Fig. 4). The lower epidermis is single layered (Fig. 3, 4). Cuticle is thick and straight (Figs. 2, 5). Stomata are frequent and of the ranunculaceous type (Figs. 3, 7, 8). Cystoliths are less common compared to the upper surface. Trichomes both non-glandular and glandular types are common (Figs. 9, 10).

Mesophyll: The mesophyll is differentiated into palisade and spongy. It does not extend to the midrib and vein (Fig. 5) but is continuous over the veinlets (Figs. 3, 4). The palisade occupies nearly half the total thickness of the leaf. It is two layered (Figs. 3, 4, 9). The cells are cylindrical. The chloroplast are confined to margins. The cells are compact and thin walled. Few cells contain crystal (Fig. 2). The spongy layer occupies half of the total stipule thickness. The cells are mostly spherical but a few or all cells adjoining the lower epidermis are filamentous or more or less akin to palisade (Fig. 3). The chloroplasts are peripheral. Few cells contain crystalloid structure.

The bundle sheath: It is not massive in area and extended horizontally. The tracheal elements are bounded by 2-3 layers of spherical to polygonal cells, rather thick walled compared to the surrounding mesophyll cells. The cells are slightly lignified. From the centre of the upper epidermis there are 7-8 cells while on lower side the cells range from 10-12. Cell size is variable. The ultimate veinlets lack sheaths.

Midrib: In a cross section it is convex dorsally and slightly elevated ventrally. The dorsal surface is narrow. The epidermis is lightly variable in size but compact. The epidermis is one layered, cells as long as wide, outer walls in the upper epidermal cells more or less elevated and thicker than the inner walls. Cuticle thin over both the epidermis. Stomata are absent and the frequency of the trichomes is lesser than that on the wings.

The cortical collenchyma is massive, of the lacunate type, 6-8 layered on the upper surface, cells rounded to polygonal in shape, heavily thickened and with crystals and intercellular space (Fig. 6). It is followed by many layered parenchyma with rounded to hexagonal cells and with large intercellular space. The stele is horseshoe shaped with massive outer ring of phloem (Fig. 6). The pith is parenchymatous. Crystals in and around the phloem and in the pith are rare.

Petiole

It is circular in out line with a deep middorsal groove in transverse section. The epidermis is one layered. Stomata are absent. The peridermal cells show slight variation in structure but the cuticle is thin. The anticlinal walls are informally straight. The collenchyma is of the lacunate type and massive. It is devoid of contents. Occasionally cells show blackish contents. The parenchymatous cells are thin walled non lignified and with intercellular space and crystals. Few cells with blackish contents. The stele is in the form of complete ring, with prominent protophloem. Phloem parenchyma and ray parenchyma are thin walled. The ray parenchyma is with pits. The pith is parenchymatous and contains many vascular bundles. Occasional cells contain crystals and other brownish contents.

In diploid mulberry the scale like stipule is 8-10 celled thick in the centre while the portion derived by marginal activity is only 5-6 celled. There is no histological differentiation into palisade and spongy parenchyma but all the cells enclosed within single layered epidermal layers are collenchymatous and have air spaces between them. The single procambial strand forms the midvein of the mature stipule. The later veins are developed towards one side of the stipule. The bundle sheath is absent.

The presence of multiple epidermis, glandular and non-glandular hairs, uniform single layered lower epidermis in lamina, ranunculaceous type stomata and single layered epidermis of petiole in foliaceous stipule show similarity with that of leaf of mulberry (Metcalf and Chalk, 1950; Shah and Kachroo, 1979).

While presence of cuticle, multilayered epidermis, palisade and spongy parenchyma, well developed vascular supply with bundle sheath, more number of stomatal chloroplast, less number and

large sized stomata and presence of glandular trichomes in foliaceous stipules in triploid mulberry shows differentiation with that of normal stipule like scales observed in diploid mulberry.

ACKNOWLEDGEMENT

Authors are thankful to Dr. M.S. Jolly, Ex-Director, C.S.R. & T.I., Mysore for providing facilities.

REFERENCES

- CROSS G.L. (1937) The origin and development of the foliage leaves and stipules of *Morus alba*. Bull. Torrey bot. Club, 64, 145-163.
- HOOKE J.D. (1885) In: The Flora of British India, vol. 5, 491.
- METCALFE C.R., CHALK L. (1950) Anatomy of the dicotyledons, 2, Oxford.
- PUNDIR Y.P.S. (1976) The structure and development of stipules and leaf in *Ficus glomerata* Roxb. Acta Bot. Indica, 4, 11-15.
- SHAH A.H., KACHROO, P. (1979) In: Recent researches in plant science. pp. 159-173. Ed. S.S. Bir, Kalyani Publ., New Delhi.

ANATOMIE DE LA STIPULE DE LA FEUILLE DE MURIER

N.K. DWIVEDI, N. SURYANARAYANA et A.K. SIKDAR

Mulberry Breeding and Genetics Section, Central Sericultural Research & Training Institute, Mysore 570 008, Inde.

La présente étude concerne l'anatomie de la stipule foliaire du mûrier triploïde. L'épiderme a normalement une couche, parfois plusieurs. La cuticule est mince. Des trichomes glandulaires et non-glandulaires sont présents. Les stomates sont de type renonculacée. Le mésophylle est différencié uniformément en parenchymes palissadique et spongieux. La gaine des vaisseaux s'étend horizontalement sous l'épiderme supérieur. Le pétiole est circulaire et a une stèle incomplète.

INTRODUCTION

Les stipules sont un caractère important pour le diagnostic taxonomique et leur rôle principal semble être la protection des jeunes feuilles en train de se développer. Cependant leur morphologie est mal connue. La stipule est latérale, en forme d'écaille et caduque chez les membres de la famille des Moracées (Hooker, 1885). Cross (1937) a étudié le développement de la feuille et des stipules chez *Morus alba* tandis que Pundir (1976) a étudié leur structure chez *Ficus glomerata*. La présente note de recherche porte sur l'étude morphologique et anatomique de la stipule foliaire chez le mûrier triploïde et de l'écaille en forme de stipule chez le mûrier diploïde.

MATERIELS ET METHODES

Les stipules foliaires et les écailles en forme de stipule collectées sur des mûriers autotriploïdes obtenus à partir de la variété autotétraploïde S36 (*Morus indica* L.) et sur des mûriers diploïdes (*M. indica*, var. S36) sont fixées dans du F.A.A. Les matériaux déshydratés par l'alcool butylique tertiaire sont enrobés dans de la cire de paraffine. Des sections obtenues au microtome de 7-10 microns d'épaisseur sont colorées avec un mélange de safranine et de fast green. Le nombre de chloroplastes par stomate est déterminé en colorant des morceaux d'épiderme de feuilles avec une solution de I + KI à 2 %. Pour l'étude des stomates, la couche épidermique abaxiale est épluchée et posée sur une lame en verre dans une goutte d'eau.

RESULTATS ET DISCUSSION

Morphologie

La stipule a la forme d'une barque avec des bords resserrés (Fig. 1). Elle est présente par paire à la base du pétiole, et est de couleur vert foncé. Le nombre moyen de chloroplastes par paire de cellules garde (Fig. 7) est de 23,9 et le nombre moyen de stomates par unité de surface (Fig. 8) est 55,6. La taille des stomates est de 19,50 x 12,40 microns; deux types de trichomes, non-glandulaires et glandulaires (Figs. 9, 10) sont fréquents sur les deux surfaces de la stipule.

Chez le mûrier diploïde, la stipule a une structure en forme d'écaille fine. Le nombre moyen de chloroplastes par paire de cellules garde et le nombre de stomates par unité de surface sont respectivement 13,5 et 60. La taille des stomates est 16,30 x 10,25 microns. Les trichomes

non-glandulaires composés d'une seule couche de trois cellules sont présents seulement sur le côté abaxial.

Anatomie

Lamina

Épiderme : L'épiderme supérieur se compose normalement d'une couche unique de cellules (Figs. 3, 4) mais parfois de deux couches au-dessus des nervures et nervurettes (Figs. 2, 5). Plus de deux couches d'épiderme se forment à cause de la division péricleinale dans le protoderme et les dérivés de ces divisions peuvent se diviser et former un épiderme multiple comme décrit chez l'épiderme des lamina du mûrier (Shah et Kachroo, 1979). Les cellules sont plus longues que larges. Les parois externes sont plus épaisses que les parois internes et les anticlinaux ont tendance à être en forme de vagues. Les stomates sont absents mais les cytolithes sont assez courantes (Fig. 4). L'épiderme inférieur est constitué d'une seule couche (Fig. 3, 4). La cuticule est épaisse et droite (Fig. 2, 5). Les stomates sont fréquents et du type renonculacée (Fig. 3, 7, 8). Les cytolithes sont moins courantes par rapport à la surface supérieure. Les trichomes non-glandulaires et glandulaires sont courants (Fig. 9, 10).

Mésophylle : Le mésophylle est différencié en parenchyme palissadique et spongieux. Il ne s'étend pas à la nervure principale et aux nervures secondaires (Fig. 5) mais est continu au-dessus des petites nervures (Fig. 3, 4). Le parenchyme palissadique occupe presque la moitié de l'épaisseur totale de la feuille. Il se compose de deux couches (Fig. 3, 4, 9). Les cellules sont cylindriques. Le chloroplaste est confiné sur les bords. Les cellules sont compactes avec des parois minces. Quelques cellules contiennent un cristal (Fig. 2). La couche spongieuse occupe la moitié de l'épaisseur totale de la stipule. Les cellules sont pour la plupart sphériques mais quelques unes ou toutes les cellules au bord de l'épiderme inférieur sont filamenteuses ou plus ou moins du type palissadique (Fig. 3). Les chloroplastes sont périphériques. Quelques cellules contiennent une structure cristalloïde.

Gaine des vaisseaux : Elle n'est pas très importante en surface et s'étend horizontalement. Les éléments trachéiques sont liés par deux à trois couches de cellules de forme sphérique ou polygonale, avec des parois assez épaisses en comparaison des cellules du mésophylle environnantes. Les cellules sont légèrement ligneuses. A partir du centre de l'épiderme supérieur, on trouve sept à huit cellules tandis que sur le côté inférieur on en trouve dix à douze. La taille des cellules est variable. Les dernières petites nervures n'ont pas de gaine.

Nervure principale : En coupe, elle a un dos convexe et est légèrement relevée ventralement. La surface dorsale est étroite. L'épiderme est de taille légèrement variable mais est compact. Il est constitué d'une couche unique, les cellules sont aussi longues que larges, les parois externes des cellules de l'épiderme supérieur sont plus ou moins élevées et plus épaisses que celles des parois internes. La cuticule des deux épidermes est fine. Les stomates sont absents et la fréquence des trichomes est moindre que celle des ailes.

Le collenchyme cortical est massif, de type lacunaire, avec 6 à 8 couches sur la face supérieure, composé de cellules de forme ronde à polygonale, très épaisses et avec des cristaux dans l'espace intercellulaire (Fig. 6). Il est suivi par des parenchyms à couches multiples avec des cellules rondes à hexagonales et avec un large espace intercellulaire. La stèle est en forme de fer à cheval avec un anneau externe de phloème important (Fig. 6). La moëlle est parenchymateuse. Les cristaux dans et autour du phloème et dans la moëlle sont rares.

Pétiole

Il est circulaire avec un creux profond au milieu du dos en coupe transversale. L'épiderme a une couche. Les stomates sont absents. Les cellules péridermiques ont une structure légèrement différente mais la cuticule est mince. Les parois anticlinales sont droites. Le collenchyme est du type lacunaire et important. Il n'a pas de contenu. Parfois les cellules ont un contenu noirâtre. Les cellules du parenchyme ont des parois fines, ne sont pas ligneuses, avec des espaces intercellulaires et des cristaux. On observe quelques cellules avec un contenu noirâtre. La stèle a la forme d'un anneau entier, avec un protophloème proéminent. Le parenchyme du phloème et le parenchyme du rayon ont des parois minces. Le parenchyme du rayon a des trous. La moëlle est parenchymateuse et contient de nombreux faisceaux vasculaires. Certaines cellules contiennent des cristaux, d'autres ont un contenu brun.

Chez le mûrier diploïde, la stipule en forme d'écaille a une épaisseur de 8 à 10 cellules au centre tandis que la partie provenant de l'activité marginale a 5 à 6 cellules seulement. On n'observe pas de différenciation histologique entre les parenchymes palissadique et spongieux mais toutes les cellules incluses au sein des couches de l'épiderme à couche unique sont collenchymateuses avec des espaces d'air entre elles. Le fil procambial unique forme la nervure principale de la stipule mature. Les nervures apparaissant plus tard se développent en direction d'un côté de la stipule. La gaine de vaisseaux est absente.

La présence d'épiderme multiple, de poils glandulaires et non-glandulaires, d'un épiderme inférieur à une couche dans les laminas, de stomates de type renonculacée et d'épiderme à couche unique du pétiole chez la stipule foliaire montre une similitude avec la structure de la feuille de mûrier (Metcalfe et Chalk, 1950 ; Shah et Kachroo, 1979).

La présence d'une cuticule, d'un épiderme à couches multiples, de parenchymes palissadique et spongieux, d'un réseau vasculaire bien développé avec la gaine de vaisseaux, d'un nombre supérieur de chloroplastes des stomates, d'un nombre moindre de stomates de plus grande taille et la présence de trichomes glandulaires chez la stipule foliaire du mûrier triploïde montrent la différenciation avec la stipule normale en forme d'écaille observée chez le mûrier diploïde.

STUDIES IN COLCHICINE INDUCED MUTANTS OF MULBERRY

N.K. DWIVEDI, N. SURYANARAYANA, B.N. SUSHEELAMMA, A.K. SIKDAR and
M.S. JOLLY

Mulberry Breeding and Genetics Section, Central Sericultural Research and Training
Institute, Mysore 570 008, India.

*Cytomorphological and anatomical studies were made in a monoecious diploid mutant with superior economic characters and a female autotetraploid mutant with good hybridization potentiality, isolated from colchiploids of female variety Kanva-2 of *Morus alba* L. and male variety S41 of *M. indica* L. respectively, whose axillary buds were treated with 0.4% colchicine for 8 hours for consecutive three days. The possible mutagenic effect of colchicine has been discussed.*

Keywords: Mulberry, monoecious mutants, colchicine.

INTRODUCTION

The two high yielding mulberry varieties, Kanva-2 (*Morus alba* L.) and S41 (*M. indica* L.) bear only female and male flowers respectively. Male and mixed type of inflorescences were induced by colchicine in variety Kanva-2 (Dwivedi *et al.*, 1984). Dwivedi *et al.* (1987) studied floral vasculature and trichomes on female and colchicine induced male and abnormal flowers in it. The present investigation deals with cytomorphological and anatomical studies in a monoecious diploid mutant of female diploid variety Kanva-2 and a female autotetraploid mutant of male aneuploid male variety S41 isolated among the colchiploids of these varieties during polyploidy breeding programme.

MATERIAL AND METHODS

The unfolding axillary buds of female variety Kanva-2 (*M. alba* L.) and male variety S41 (*M. indica* L.) were treated with 0.4% aqueous colchicine (Loba, India) for 8 hours for consecutive three days, using cotton wads to keep the growing buds wet. After treatment a branch bearing both male and female inflorescences in var. Kanva-2 and a branch bearing female inflorescences in var. S41 was isolated and multiplied by cuttings for detail studies. For mitotic studies root tips were treated with 0.002 M solution of 8-hydroxyquinoline for 1 hour at 15°C and washed with distilled water, fixed in 1:3 acetic alcohol for 24 hrs, hydrolysed in 1N HCl at 60°C for 15 minutes, stained in 2% acetoorcein for 24 hours, were squashed in 45% acetic acid. For meiotic studies male inflorescences were fixed in Carnoy's fluid and anthers were smeared in 1% aceto carmine. Pollen fertility was also assessed in 1% aceto carmine. For stomatal studies abaxial epidermal layer was peeled off and mounted on a glass slide in drop of water. The leaf thickness has been studied by cutting hand sections. The sections were stained in safranin and fast green.

Characters (Cm) <i>Caractères</i>	Female <i>Femelle</i>	Mutant <i>Mutant</i>
Growth habit/ Croissance		
Height of the plant <i>Hauteur de la plante</i>	165.20	221
Number of branches <i>Nombre de branches</i>	3	5
Internodal distance <i>Distance internodale</i>	4.02	3.80
Sprouting (%) <i>% de débourrement</i>	82.00	81.60
Rooting (%) <i>% d'enracinement</i>	79.00	78.00
Leaf/ Feuille		
Leaf size (cm ²) <i>Grandeur (cm²)</i>	176.35	182.75
Weight of 100 leaves (g) <i>Poids de 100 feuilles (g)</i>	325.00	405.00
Water content of the leaf (%) <i>Teneur en eau (%)</i>	66.25	72.76
No. of stomata per unit area <i>Nbre de stomates par unité de surface</i>	65.25	61.00
Stomatal size (LxW) (μ) <i>Taille des stomates (Lxl)(μ)</i>	14.20 x 12.80	12.80 x 11.72
Leaf texture and colour <i>Texture et couleur</i>	Smooth, green <i>Lisse, verte</i>	Smooth, dark green <i>Lisse, vert foncé</i>
Flower/ Fleur		
Male inflorescence size (LxW) <i>Taille de l'inflorescence mâle (Lxl)</i>	-	3.80 x 1.20
Female inflorescence size (LxW) <i>Taille de l'inflorescence femelle (Lxl)</i>	1.28 x 0.87	1.30 x 0.80
No. of flowers per male inflorescence <i>Nbre de fleurs par inflorescence mâle</i>	-	46
No. of flowers per female inflorescence <i>Nbre de fleurs par inflorescence femelle</i>	26	24
Pollen fertility (%) <i>Fertilité du pollen (%)</i>	-	93.61
Fruit/ Fruit		
Sorosis size (LxW) <i>Taille de la sorose (Lxl)</i>	2.20 x 1.1	2.25 x 1.1
Seed set (%) <i>Graines (%)</i>	82.00	81.07

Table I. Comparative account of morphological characters of female colchicine induced monoecious mutant of var. Kanva-2.

Tableau I. Caractères morphologiques du mutant monoïque femelle de la variété Kanva-2 induit par colchicine.

RESULTS AND DISCUSSION

Mutant of variety Kanva-2

Comparative morphological data of monoecious mutant and original female plant is summarized in Table I. There is an apparent increase in plant height, number of branches (Fig. 1); size, weight and water content of leaves; size of inflorescences and sorosis and reduction in internodal distance; number of stomata per unit area, stomatal size and number of flowers in female inflorescences in mutant over the control. The mutant plant produces 24% female and 76% male inflorescences (Fig. 3) while the control bears 100% female inflorescences. However, sprouting, rooting and seed setting percentage are almost same in both the taxa. The thickness of leaf in mutant (Fig. 2) was increased by 8.37% over that of female parent (Table V).

The somatic cells of the control as well as of the mutant contain $2n = 28$ chromosomes. The diploid nature of the mutant is further confirmed by the presence of fourteen bivalents in its most of the PMCs at metaphase I (Fig. 7). One bivalent was found bigger in comparison to the others (Fig. 7, 8) as also reported by Gill and Gupta (1979) and Dwivedi *et al.* (1986) in *M. alba* and by Das (1966) in *M. indica*. However, Kundu and Sharma (1976) failed to observe a pair of large sized chromosomes in somatic cells of *Morus* spp. Seven types of chromosomal configurations were found (Fig. 7, 8; Table II). Out of 100 cells analysed for anaphase I, 80 cells were normal with equal distribution and in other 20 cells abnormalities like unequal distribution (Fig. 9) with lagging uni and bivalents were observed (Table III). Precocious movement of chromosomes at metaphase I and at metaphase II (Fig. 10) and formation of bridge were also observed. Presence of cytomixis was noticed in 7.01% PMCs at metaphase I, 9.69% PMC at metaphase II, 2.63% PMC at anaphase II (Fig. 11), 1.63% PMCs at dyad and 0.37% PMCs at tetrads stages. Pollen grains are full of starch grains (Fig. 12) and show 91.63% fertility.

No change in respect of chromosome number suggests that the modification of sex from female to monoecious is genic rather than physiological. The monoecious mutant isolated from the female variety of mulberry in present study is similar to soma-clonal variants generated by passage of plants through tissue culture (Downes and Marshall, 1983).

This mutant superior in several economic characters over parent female is being used directly for silkworm rearing and for evolving high yielding tropical varieties of better nutritional value.

Chromosomal configuration <i>Configuration chromosomique</i>	No. of cells <i>Nbre de cellules</i>	% of cells <i>% de cellules</i>
14 II	80	80.00
13 II + 2 I	8	8.00
12 II + 1 III + 1 I	3	3.00
12 II + 1 IV	3	3.00
12 II + 4 I	4	4.00
12 II + 1 IV + 2 I	1	1.00
11 II + 6 I	1	1.00

Table II. Chromosomal configuration at metaphase I in colchicine induced monoecious mutant of var. Kanva-2.

Tableau II. Configuration chromosomique en métaphase I chez le mutant monoïque induit par colchicine de la variété Kanva-2.

Fig. 1. Mutant plant of var. Kanva-2.

Fig. 1. Plant mutant de la variété Kanva-2.

Fig. 2. A twig of mutant of var. Kanva-2.

Fig. 2. Une branche de mutant de la variété Kanva-2.

Fig. 3. A twig of mutant of var. Kanva-2 showing male and female inflorescences.

Fig. 3. Une branche de mutant de la variété Kanva-2. avec inflorescences mâles et femelles.

Fig. 4. Mutant plant of var. S41.

Fig. 4. Plant mutant de la variété S41.

Fig. 5. A twig of mutant var. S41 showing fasciation and bifurcation.

Fig. 5. Une branche de mutant de la variété S41 présentant fasciation et bifurcation.

Fig. 6. A twig of mutant of var. S41 showing male and female inflorescences.

Fig. 6. Une branche de mutant de la variété S41 avec inflorescences mâles et femelles.



Fig. 7. Metaphase I, 14 bivalents.

Fig. 7. Métaphase I, 14 bivalents.

Fig. 8. Metaphase I, IV + 12 II.

Fig. 8. Métaphase I, IV + 12 II.

Fig. 9. Unequal distribution of chromosomes.

Fig. 9. Distribution inégale des chromosomes.

Fig. 10. Precocious movement of chromosomes at metaphase II.

Fig. 10. Mouvement précoce des chromosomes en métaphase II.

Fig. 11. Cytomixis at anaphase II.

Fig. 11. Cytomixie en anaphase II.

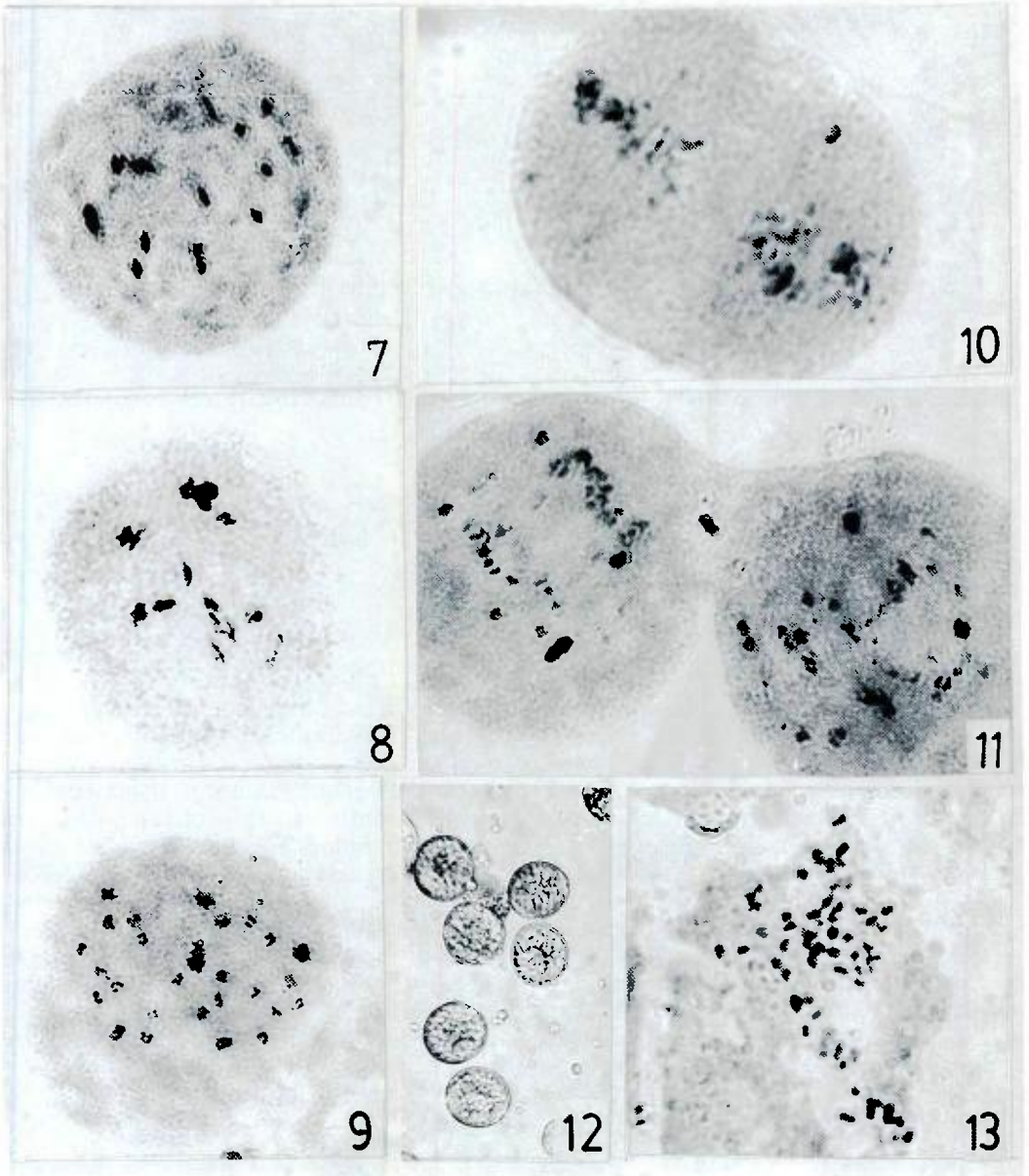
Fig. 12. Pollen grains.

Fig. 12. Grains de pollen.

Fig. 13. Metaphase I, $2n = 56$; Female mutant of var. S41.

Fig. 13. Métaphase I, $2n = 56$; Mutant femelle de la variété S41.

*Figs. 7-12 : Mutant of var. Kanva-2. / Mutant de la variété Kanva-2.
Figs. 7-11 & 13 : x 2000; Fig. 12 : x 1000.*



Distribution of chromosomes <i>Répartition des chromosomes</i>	No. of cells <i>Nbre de cellules</i>	% %
14 : 14	79	79.00
15 : 13	8	8.00
14 : 12 : 1 B	5	5.00
14 : 12 : 2 U	4	4.00
12 : 12 : 2 B	2	2.00
16 : 16	1	1.00
12 : 12 : 4 U	1	1.00
Total	100	100.00

B = lagging bivalent/ *Bivalent retardataire* U = lagging univalent/ *Univalent retardataire*

Table III. Chromosome distribution at anaphase I in colchicine induced monoecious mutant of var. Kanva-2.

Tableau III. Répartition chromosomique en anaphase I chez le mutant monoïque induit par colchicine de la variété Kanva-2.

Mutant of variety S41

Comparative morphological data of female autotetraploid mutant and original aneuploid male plant is summarised in Table IV. The mutant shows slow growth with thick, large, entire, coarse and dark green leaves (Fig. 4, 5). It exhibits increase in weight and water content of leaf and size of stomata and reduction in plant height, number of branches, internodal distance, number of stomata per unit area, sprouting and rooting percentage over the control. The mutant bears 100% female inflorescences (Fig. 6) and shows 63.33% seed set and 72.67% seed germination. The stem of mutant shows fasciation and bifurcation (Fig. 5). The thickness of leaf was increased by 13.23% over that of control (Table V) and was due to larger size of component tissues viz., epidermis, palisade and spongy parenchyma. The thickness in cell size was seen not only in length but in width too.

The somatic cells of female mutant contain $2n = 56$ chromosomes (Fig. 13) which confirms its autotetraploid nature. The present observation emphasises the possible mutagenic effect of colchicine on male variety of mulberry. The female autotetraploid plant was obtained as a result of somatic mutation after colchicine treatment. The mutant is also quite similar to somaclonal variants generated by passage of plants, through tissue culture (Downes and Marshall, 1983). Having considerable potential in hybridization programme this mutant is being utilized for evolution of triploids by crossing with different desirable diploid strains of mulberry.

Characters (Cm) <i>Caractères</i>	Male <i>Mâle</i>	Mutant <i>Mutant</i>
Growth habit/ Croissance		
Height of the plant <i>Hauteur de la plante</i>	161.20	125.70
Number of branches <i>Nombre de branches</i>	4	2
Internodal distance <i>Distance internodale</i>	3.6	3.09
Sprouting (%) <i>% de débourrement</i>	81	79
Rooting (%) <i>% d'enracinement</i>	78	68
Leaf/ Feuille		
Leaf size (cm ²) <i>Grandeur (cm²)</i>	179.21	209.35
Weight of 100 leaves (g) <i>Poids de 100 feuilles (g)</i>	465	650
Water content of the leaf (%) <i>Teneur en eau (%)</i>	70.60	75.20
No. of stomata per unit area <i>Nbre de stomates par unité de surface</i>	54.20	48.25
Stomatal size (LxW) (μ) <i>Taille des stomates (Lxl) (μ)</i>	15.80 x 11.50	22.31 x 16.90
Leaf texture and colour <i>Texture et couleur</i>	Coarse, dark green <i>Rugueuse, vert foncé</i>	coarse, dark green <i>Rugueuse, vert foncé</i>
Flower/ Fleur		
Male inflorescence size (LxW) <i>Taille de l'inflorescence mâle (Lxl)</i>	3.90 x 1.30	-
Female inflorescence size (LxW) <i>Taille de l'inflorescence femelle (Lxl)</i>	-	1.70 x 0.90
No. of flowers per male inflorescence <i>Nbre de fleurs par inflorescence mâle</i>	54	-
No. of flowers per female inflorescence <i>Nbre de fleurs par inflorescence femelle</i>	-	42
Pollen fertility (%) <i>Fertilité du pollen (%)</i>	69.75	-
Fruit/ Fruit		
Sorosis size (LxW) <i>Taille de la sorose (Lxl)</i>	-	3.90 x 1.90
Seed set (%) / <i>Graines (%)</i>	-	63.33
Seed germination (%) / <i>Germination (%)</i>	-	72.67

Table IV. Comparative account of morphological characters of female colchicine induced monoecious mutant of var. S41.

Tableau IV. Caractères morphologiques du mutant monoïque femelle de la variété S41 induit par colchicine

Taxon <i>Taxon</i>	Epidermis <i>Epiderme</i>		Palisade <i>Palissade</i>	Spongy Parenchyme <i>spongieux</i>	Total leaf blade <i>Epaisseur totale de la feuille</i>
	Upper <i>Supérieur</i>	Lower <i>Inférieur</i>			
Female (Kanva-2) <i>Femelle Kanva-2</i>	21.52-26.91	8.07-13.45	43.04-48.42	21.52-26.91	102.22-110.29
Mutant (Kanva-2) <i>Mutant Kanva-2</i>	24.21-29.59	13.45-16.14	48.42-53.80	24.21-34.97	115.67-121.05
Male (S41) <i>Mâle S41</i>	20.82-25.99	8.24-13.25	44.05-47.88	20.90-25.99	103.35-110.10
Mutant (S41) <i>Mutant S41</i>	30.92-37.28	10.48-16.45	46.49-50.89	49.50-50.40	130.30-150.37

Table V. Thickness of different tissues of leaf (μ).*Tableau V. Epaisseur des différents tissus de la feuille (μ).*

REFERENCES

- DAS B.C. (1966) Cytological studies on *Morus indica* L. and *M. laevigata* Wall. *Caryologia*, 14, 159-162.
- DOWNES R.W., MARSHALL D.R. (1983) Colchicine induced true breeding chimeral sectors in flax. *J. Heredity*, 47, 229-233.
- DWIVEDI N.K., SIKDAR A.K., DANDIN S.B., SASTRY C.R. (1984) Modification of sex expression in mulberry by colchicine. *Curr. Sci.*, 53, 1936-1937.
- DWIVEDI N.K., SIKDAR A.K., DANDIN S.B., SASTRY C.R., JOLLY M.S. (1986) Induced tetraploidy in mulberry. I. Morphological, anatomical and cytological investigations in cultivar RFS-135. *Cytologia*, 51, 493-401.
- DWIVEDI N.K., SIKDAR A.K., JOLLY M.S. (1987) Floral vasculature and trichome studies in female and colchicine induced male and abnormal flowers of mulberry var Kanva-2 (*Morus alba* L.). *Indian J. Seric.* (in press).
- GILL B.S., GUPTA R.C. (1979) Cytological studies on the sex types of *Morus alba* L. (Moraceae). *Curr. Sci.*, 48, 35-36.
- KUNDU D., SHARMA A. (1976) Recent advance in Botany, pp. 348.

ETUDES SUR LES MUTANTS DU MURIER INDUITS PAR LA COLCHICINE

N.K. DWIVEDI, N. SURYANARAYANA, B.N. SUSHEELAMMA, A.K. SIKDAR et M.S. JOLLY

Mulberry Breeding and Genetics Section, Central Sericultural Research & Training Institute, Mysore 570 008, Inde.

*Des études cytomorphologiques et anatomiques ont été effectuées chez un mutant monoïque diploïde présentant des caractéristiques économiques supérieures et un mutant autotétraploïde femelle ayant un bon potentiel d'hybridation, isolés respectivement à partir de polyploïdes induits par colchicine chez la variété femelle Kanva-2 de *Morus alba* L. et chez la variété mâle S41 de *M. indica* L., dont les bourgeons axillaires ont été traités avec une solution de colchicine à 0,4 % durant 8 heures pendant trois jours consécutifs. L'effet mutagène de la colchicine est discuté.*

INTRODUCTION

Les deux variétés de mûrier à haut rendement, Kanva-2 (*Morus alba* L.) et S41 (*M. indica* L.) portent respectivement des fleurs uniquement femelles et des fleurs uniquement mâles. Des inflorescences de type mâle et de type mixte ont été induites par la colchicine chez la variété Kanva-2 (Dwivedi *et al.*, 1984). Dwivedi *et al.* (1987) ont étudié la vascularisation florale et les trichomes chez les fleurs femelles, les fleurs mâles induites par la colchicine et les fleurs anormales de cette variété. Le travail présenté ici porte sur l'étude cytomorphologique et anatomique chez un mutant diploïde monoïque de la variété diploïde femelle Kanva-2 et chez un mutant autotétraploïde femelle de la variété aneuploïde mâle S41 isolés à partir des polyploïdes induits par la colchicine de ces variétés au cours d'un programme de sélection.

MATERIELS ET METHODES

Les bourgeons axillaires non dépliés de la variété femelle Kanva-2 (*Morus alba* L.) et de la variété mâle S41 (*M. indica* L.) ont été traités par une solution aqueuse de colchicine à 0,4 % (Loba, Inde) pendant 8 heures durant trois jours consécutifs, en utilisant de la ouate de coton pour maintenir les bourgeons humides. Après le traitement, une branche portant à la fois des inflorescences mâles et femelles chez la variété Kanva-2 et une branche portant des inflorescences femelles chez la variété S41 ont été prélevées et multipliées par bouturage pour l'étude détaillée. Pour les études mitotiques, des morceaux de racine ont été traités dans une solution de 0,002 M de 8-hydroxyquinoléine pendant une heure à 15°C et lavés dans de l'eau distillée, fixés dans une solution d'alcool-acide acétique (1:3) pendant 24 heures, puis hydrolysés dans l'acide chlorhydrique 1N à 60°C pendant 15 minutes, colorés dans une solution d'orceïne acétique à 2 % pendant 24 heures et écrasés dans une solution à 45 % d'acide acétique. Pour les études méiotiques, les inflorescences mâles sont fixées dans du Carnoy et les anthères sont colorées par une solution à 1 % de carmin acétique. La fertilité du pollen est également évaluée dans une solution à 1 % de carmin acétique. Pour l'étude des stomates, la couche épidermique abaxiale est épluchée et placée sur une lame en verre dans une goutte d'eau. L'épaisseur des feuilles est observée en coupant des sections. Les sections sont colorées par la safranine et le "fast green".

RESULTATS ET DISCUSSION

Mutant de la variété Kanva-2

Le Tableau I compare les composantes morphologiques du mutant monoïque et du plant femelle initial. On observe une augmentation apparente de la hauteur de la plante, du nombre de branches (Fig. 1) ; de la taille, du poids et de la teneur en eau des feuilles ; de la taille des inflorescences et de la sorose et une diminution de la distance internodale, du nombre de stomates par unité de surface, de la taille des stomates et du nombre de fleurs par inflorescence femelle chez le mutant par rapport au témoin. Le plant mutant produit 24 % d'inflorescences femelles et 76 % d'inflorescences mâles (Fig. 3) alors que le témoin porte 100 % d'inflorescences femelles. Cependant le débourrement, la prise de racines et le pourcentage de production de graines sont à peu près identiques chez les deux taxa. L'épaisseur de la feuille chez le mutant (Fig. 2) est supérieure de 8,37 % à celle du parent femelle (Tableau V).

Les cellules somatiques du témoin comme celles du mutant contiennent $2n = 28$ chromosomes. La nature diploïde du mutant est confirmée par la présence de 14 bivalents dans la plupart de ses PMC à la métaphase I (Fig. 7). Un bivalent est plus gros que les autres (Figs. 7, 8) comme l'ont observé Gill et Gupta (1979) et Dwivedi *et al.* (1986) chez *M. alba* et Das (1966) chez *M. indica*. Cependant Kundu et Sharma (1976) n'ont pas observé une paire de chromosomes de grande taille chez les cellules somatiques de *Morus*. Sept types de configuration chromosomique ont été observés (Figs. 7, 8 ; Tableau II). Sur 100 cellules analysées à l'anaphase I, 80 sont normales et de distribution égale et 20 autres présentent des anomalies comme une distribution inégale (Fig. 9) avec des mono et des bivalents retardataires (Tableau III). Le déplacement précoce des chromosomes à la métaphase I et à la métaphase II (Fig. 10) et la formation d'un pont ont également été observés. La présence de cytomixis a été remarquée chez 7,01 % des PMC à la métaphase I, 9,69 % des PMC à la métaphase II, 2,63 % des PMC à l'anaphase II (Fig. 11), 1,63 % des PMC au stade dyade et 0,37 % des PMC au stade tétrade. Les grains de pollen sont remplis de grains d'amidon (Fig. 12) et sont fertiles à 91,63 %.

Le nombre de chromosomes n'étant pas modifié, suggère que la modification sexuelle de femelle à monoïque est plus génétique que physiologique. Le mutant monoïque isolé ici à partir de la variété femelle de mûrier est similaire aux variantes somatiques clonales générées par la culture *in vitro* (Downes et Marshall, 1983).

Ce mutant supérieur au parent femelle en ce qui concerne les caractères économiques est directement employé pour l'élevage du ver à soie et pour mettre au point des variétés tropicales productives à haute valeur nutritionnelle.

Mutant de la variété S41

Le Tableau IV compare les composantes morphologiques du mutant autotétraploïde femelle et du plant mâle aneuploïde initial. On observe chez le mutant une croissance lente, avec des feuilles épaisses, grandes, à lobe entier, rugueuses et vert foncé (Figs. 4, 5). On observe une augmentation du poids et de la teneur en eau des feuilles et de la taille des stomates, et une réduction de la hauteur du plant, du nombre de branches, de la distance internodale, du nombre de stomates par unité de surface, du pourcentage de débourrement et de prise de racines par rapport au témoin. Le mutant porte 100 % d'inflorescences femelles (Fig. 6) qui donnent 63,33 % de production de graines et 72,67 % de germination des graines. Le tronc du mutant montre fasciation et bifurcation (Fig. 5). L'épaisseur de la feuille augmente de 13,23 % par rapport au témoin (Tableau V) et est due à la plus grande taille des tissus qui la composent : l'épiderme, les parenchymes palissadique et spongieux. L'accroissement de l'épaisseur des cellules s'observe en longueur et en largeur.

Les cellules somatiques du mutant femelle contiennent $2n = 56$ chromosomes (Fig. 13) ce qui confirme sa nature autotétraploïde. L'observation présente met l'accent sur l'effet mutagène de la colchicine sur la variété mâle de mûrier. La plante autotétraploïde femelle obtenue est le résultat d'une mutation somatique après le traitement à la colchicine. Le mutant est aussi assez similaire à des variantes somatiques clonales générées par la culture *in vitro* (Downes et Marshall, 1983). Ce mutant possède un potentiel important pour les programmes d'hybridation et est utilisé pour la mise au point de triploïdes par croisement avec différentes souches diploïdes adéquates de mûrier.

A STUDY ON THE EFFECT OF A JUVENILE HORMONE ANALOGUE ON THE BIVOLTINE SILKWORM, *B. MORI* L.

G. SUBBA RAO, S.K. DAS, S.K. SEN, S. NANDI*, R. SOMPOMU* and S.K. SEN

Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore 742 101, India.

A commercially developed juvenile hormone analogue, Manta was tested on silkworm to see the effect on the silk production and some other quantitative traits. Larvae of *Bombyx mori* L. were treated topically after 48, 72 and 96 hours of 4th moult with a dose of 0.3125 µg per larva. Data on the different quantitative traits were recorded. The treatment after 48 hours of 4th moult was found most effective. In all cases the larval period or feeding duration was increased by one day. The larval weight, cocoon weight, shell weight, Silk ratio % and filament length increased by 12.39, 12.25, 16.27 and 10.97 % respectively when treatment was done after 48 hours of 4th moult. As control, larvae of same age were treated topically with distilled water at the same rate. An absolute control was also kept. The detailed data have been analysed and discussed.

Keywords: *Bombyx mori*, juvenile hormone analogue, Manta, topical, larval period, quantitative traits.

INTRODUCTION

The induction of prolonged larval instar and feeding period by applying juvenile hormone was first reported by Akai and Kobayashi (1971). They studied the influence of juvenile hormone on the growth and metamorphosis of silkworm. Both cocoon and shell weight were increased in the treated batch. The most effective stage of treatment of the hormone was about 72 hours after 4th moult with a dose between 1-10 µg per g of body weight. When the larvae were treated with a large dose (10 µg) of hormone, some of them survived for 26 days in the 5th instar. Akai *et al.* (1971) reported that a single application of the hormone during the first half of 5th instar brought about increase of feeding period. The shell weight increased about 30% over the control. They suggested for a topical application. Murakoshi *et al.* (1972) obtained giant cocoons by topical application of some compounds which are structurally related to juvenile hormone analogue. The effect of Manta on the silk production was studied (Shibukawa and Akai, 1981). More recently the practical application of the juvenile hormone analogue in sericulture has been tested by several workers (Akai *et al.*, 1973, 1981 and 1984; Nihmura *et al.*, 1974; Kurata and Dailie, 1978; Kurata, 1981; Gaaboub *et al.*, 1985; Okuda *et al.*, 1986). Several informations have encouraged the studies on the effect of juvenile hormones and their analogues on silk production.

With a view to see the effect of the hormone analogue on the Indian bivoltine silkworm in the local climatic condition of Kalimpong hills which is about 4000 ft. above the sea level, the present experiment was undertaken.

* Regional Sericultural Research Station, Kalimpong, West Bengal, India.

MATERIAL AND METHODS

The bivoltine silkworm race, P₅ maintained at the Regional Sericultural Research Station, Kalimpong for more than 15 years was used for the present experiment. Silkworms were reared during the spring season at 24°C by feeding them four times a day with mulberry leaf, and other standard methods were followed during rearing.

The synthetic juvenile hormone analogue, methoprene, commercially developed by Ohtsuka Pharmaceutical Company, Japan was used. The concentration was 6.25 mg/2.5 litre water. A dose of 6.25 mg/2.5 litre water/20 000 was topically treated i.e. 0.3125 µg per larva after 48, 72 and 96 hours of 4th moult. For control, silkworms of all the three hours were topically treated with distilled water (2.5 litre/20 000 worms). As an absolute control untreated silkworms were kept. For each set 5 replications each containing 200 worms were kept.

For standardization, the experiment was repeated for 3 years.

RESULTS

The detailed average rearing performance data in respect of some quantitative traits have been represented in Table I. The increases in larval weight, cocoon weight, shell weight, silk ratio, filament length and survival percentage over the control have been represented in Table II.

In all the treated lots the larval period was increased by one day at 5th instar.

Larval weight: The increase over the control was 12.39, 6.73 and 3.52% in batches treated after 48, 72 and 96 hours of 4th moult respectively.

Cocoon weight: The increase was 12.25, 6.89 and 6.34% in batches treated after 48, 72 and 96 hours respectively.

Cocoon shell weight: The increase was 16.27, 6.97 and 4.54% at 48, 72 and 96 hours respectively.

Silk ratio: The increases noticed were 2.68, 0.14 and 1.72% at 48, 72 and 96 hours respectively.

Filament length: The increases over the control were 10.97, 4.22 and 6.48% in case of 48, 72 and 96 hours respectively.

The treatment after 48 hours of 4th moult was found most effective to get more silk content. In case of 48 hours, though average cocoon weight was 2.29 g, a large cocoon weighing 3.05 g with a shell weight of 0.60 g was obtained.

DISCUSSION

The involvement of juvenile hormone in the control of the development and activity of silk gland is obvious (Prudhomme *et al.*, 1985). The earlier workers (Akai and Kobayashi, 1971; Akai *et al.*, 1971, 1973, 1981 and Kurata, 1981) indicated that the topical application of the juvenile hormone or of structural analogue during 5th instar cause extension of last larval instar and able to increase silk production. In most Lepidoptera such prolongation of last instar occurs regularly when small or moderate doses of juvenile hormone or of a structural analogue are administered to the last instar before onset of spinning (Gaaboub *et al.*, 1985). During the extended period, the larvae grow and synthesise silk so that they produce bigger cocoons than the control (Akai *et al.*, 1981; Gaaboub *et al.*, 1985; Horie and Watanabe, 1980). The juvenile hormone has been described as the only experimental factor capable of promoting a higher silk production than in control animals (Prudhomme *et al.*, 1985). When applied early in the 5th larval instar, juvenile hormone induces a longer duration of the larval instar and a 30% increase in the cocoon weight (Prudhomme *et al.*, 1985).

In our present experiment a low dose (0.3125 µg/larva) when applied after 48 hours of 4th moult at 5th instar caused maximum increase of cocoon weight and silk content when compared with that of 72 hours and 96 hours.

It is well known that at the end of larval life the 5th instar is characterised by hypertrophy of the silk gland and an increasing rate of silk synthesis until cocoon spinning (Prudhomme *et al.*, 1985). Following food intake after the 4th moult, the exponential growth of the gland is accompanied by a parallel increase in the cellular content of DNA, RNA and protein (Prudhomme and Couple, 1979).

	Larval period (days) <i>Période larvaire (jours)</i>	No. of worms at 3rd stage <i>Nbre de larves au 3ème âge</i>	Wt. of 10 matured worms <i>Pds de 10 larves matures (g)</i>	Survival <i>Taux de survie (%)</i>	Single cocoon weight <i>Pds du cocon simple (g)</i>	Single shell weight <i>Pds de la coque simple (g)</i>	Silk ratio <i>Richesse soyeuse (%)</i>	Non-breakable filament length <i>Longueur de filament sans cassure (m)</i>
A. At 48th hour after 4th moult/ Traitement 48 heures après la 4e mue								
Treated	26	200	57.95	92.33	2.29	0.50	21.82	1406
<i>Traitées</i>			± 1.51	± 2.12	± 0.05	± 0.00	± 0.34	± 10.59
Control	25	200	51.56	93.50	2.04	0.43	21.25	1267
<i>Témoin</i>			± 0.38	± 0.57	± 0.02	± 0.000	± 0.43	± 31.62
B. At 72nd hour after 4th moult/ Traitement 72 heures après la 4e mue								
Treated	26	200	54.83	91.66	2.17	0.46	21.28	1306
<i>Traitées</i>			± 0.89	± 1.69	± 0.01	± 0.00	± 0.24	± 29.44
Control	25	200	51.37	93.00	2.03	0.43	21.31	1253
<i>Témoin</i>			± 0.31	± 0.28	± 0.01	± 0.00	± 0.11	± 29.05
C. At 96th hour after 4th moult/ Traitement 96 heures après la 4e mue								
Treated	26	200	52.90	86.16	2.18	0.46	21.09	1412
<i>Traitées</i>			± 0.36	± 1.58	± 0.01	± 0.00	± 0.23	± 34.33
Control	25	200	51.10	91.66	2.05	0.44	21.46	1326
<i>Témoin</i>			± 0.49	± 0.88	± 0.00	± 0.00	± 0.11	± 14.46
D. Absolute control/ Témoin absolu								
	25	200	50.00	92.83	2.01	0.43	21.39	1260
			± 0.26	± 0.44	± 0.02	± 0.00	± 0.23	± 22.37

Data represent mean values ± standard error/ Les données représentent des valeurs moyennes ± écart-type

* water sprayed/ brumisées avec de l'eau

Table I. Treatment: Manta (6.25 mg methoprene in 12.5 litre water/20 000 worms, i.e. 0.3125 µg/larva)

Tableau I. Traitement : Manta (6,25 mg de méthoprène dans 12,5 l d'eau/ 20 000 larves, c'est-à-dire 0,3125µg/larve)

The topical application of juvenile hormone analogue during the first 3 days of the fifth larval instar has shown that it induces a decrease in silk gland growth. But when the topical treatment is stopped, a compensatory hypertrophy of the organ is observed, both the size of the gland and its RNA content increasing beyond control values. Probably this mechanism explains the extra production of silk (Kurata and Daillic, 1978 and Daillic, 1979). In our experiment the feeding period was increased for one day during which period the silkglands synthesised increased quantity of silk after consumption of extra food. It may be argued that silk gland is the target tissue of juvenile hormone because during the first periods of hormone treatment silk gland growth is inhibited, the other organs continue to grow as in control animals (Prudhomme, 1985).

The experiment was conducted during the spring season as this has been suggested by the earlier workers (Koneko and Ohkubo, 1980) as the best to get more silk content.

Characters <i>Caractères</i>	48 hours <i>48 heures</i>	72 hours <i>72 heures</i>	96 hours <i>96 heures</i>
Larval weight <i>Poids larvaire</i>	12.39%	6.73%	3.52%
Single cocoon weight <i>Pds du cocon simple</i>	12.25%	6.89%	6.34%
Single shell weight <i>Pds de la coque</i>	16.27%	6.97%	4.54%
Silk ratio % <i>Richesse soyeuse</i>	2.68%	-0.14%	-1.72%
Filament length <i>Longueur de la bave</i>	10.97%	3.07%	11.44%
Floss <i>Blaze</i>	-18.69%	-25.0%	-25.0%
Effective rate of rearing % <i>Taux effectif d'élevage</i>	-1.08%	-1.63%	-6.39%

Larval period increased by 1 day in treated batches.

La période larvaire augmente d'un jour chez les lots traités.

Table II. Quantitative increase in percentage over control (water sprayed).

Tableau II. Augmentation quantitative en pourcentage par rapport au lot témoin (brumisation d'eau).

The rate of increase of single shell weight ranged from 4.5 to 16.27% and that of filament length ranged from 3.07 to 11.44%. The present findings agree with the findings of earlier workers (Akai *et al.*, 1973 and Kurata, 1981) who indicated the increase of 10 to 20% and 5 to 15% of silk production respectively by application of juvenile hormone. It is interesting to note here that in case of treatment

after 48 hours of 4th moult the shell weight increased by 16.27% and filament length increased by 10.97%, whereas in case of treatment of 96 hours of 4th moult shell weight increased by 4.54% and filament length increased by 11.44%. Lower filament length in cocoons with higher shell weight in case of 48 hours may be due to the larger cross-section of cocoon filament as observed by earlier workers (Akai *et al.*, 1984) in *Bombyx mori* after treatment with the similar juvenoid though no such attempt was made in our study to examine the cross-section of filament. Moreover, as a parameter, non-breakable filament length was recorded in our study (Table I). The possibility of longer filament length can not be eliminated in case of treatment after 48 hours. The present study also indicates that the effect of the juvenile hormone analogue also depends on the time of application.

Two types of controls viz., absolute control (without any treatment) and water-treated control were kept to see if there is any effect of sole water spray since the hormone was dissolved in water for spraying. When two types of controls are compared it is evident that some parameters are influenced slightly by sole water spraying. But no significant difference was found among the two types of controls for any of the characters when analysed statistically.

The advantages of the shell weight increase can be estimated having regard to the extra expenditure for additional food. Maximum gain in respect of shell weight was found when treatment was done after 48 hours of 4th moult (Table I). A net profit of Indian Rs. 74.55 could be achieved for production of 1 kg. of raw silk considering expenditure for additional food when treatment is done after 48 hours of 4th moult; Moreover, with the application of the hormone analogue, the larval spinning can be deferred, if necessary for management of crop during spinning.

REFERENCES

- AKAI H., KOBAYASHI M. (1971) Induction of prolonged larval instar by the juvenile hormone in *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombycidae). Appl. Ent. Zool., 6, 138-139.
- AKAI H., KIGUCHI K., MORI K. (1971) Increased accumulation of silk protein accompanying JH induced prolongation of larval life in *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombycidae). Appl. Ent. Zool., 6, 218-220.
- AKAI H., KIGUCHI K., MORI K. (1973) The influence of juvenile hormone on the growth and metamorphosis of *Bombyx* larvae. Bull. Seri. Exp. Stn. Japan, 25, 287-305.
- AKAI H., KIGUCHI K., KOBARI Y. (1981) Practical utilization of juvenoids for increasing silk production, pp. 781-792. In: Regulation of insect development and behaviour, F. Sehnal, A. Zabza, J.J. Menn and B. Cymborowski eds., Technical University of Wrocław.
- AKAI H., KIMURA K., KIGUCHI K., SHIBUKAWA A. (1984) Effect of antijjuvenoid on cocoon and cocoon filaments in *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn., 53(6), 545-546.
- DAILLIE J. (1979) Juvenile hormone modifies larvae and silk gland development in *Bombyx mori*. Biochimie, 61, 275-281.
- GAABOUB I.A., HELALY M.S. El, MOSTAFA S.M. (1985) Food utilization, rate of larval growth, and fecundity of *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombycidae) fed mulberry leaves treated with methoprene, Triprene and Diflubenzuron. J. Econ. Entomol., 78, 1182-1186.
- HORIE Y., WATANABE H. (1980) Recent advances in sericulture. In: Ann. Rev. Entomol., vol. 25, E.A. Steinhaus and R.F. Smith eds., pp. 49-71, Ann. Review Inc., U.S.A.
- KURATA K., DAILLIE J. (1978) Effect of exogenous juvenoid on the growth of the silkgland and the synthesis of nucleic acid and silk protein by the silkgland of *Bombyx mori*. Bull. Seri. Exp. Stn. Japan, 27, 507-530.
- KANEKO K., OHKUBO N. (1980) Nagano sanshi Yoho, 16, 42-47.
- KURATA K. (1981) Effect of application of juvenile hormone analogue on the silk production of silkworm, *Bombyx mori*. Sericologia, 21(4), 323-332.
- MURAKOSHI S., CHANG C.F., TAMURA S. (1972) Agr. Biol. Chem., 35, 695-696. In: The silkworm, an important laboratory tool, Kodansa, Tokyo.
- NIHMURA M., AOMORI Y., OZAWA K., MORI K., MATSUI M. (1974) Appl. Ent. Zool., 9, 34-40. In: The silkworm, an important laboratory tool, Kodansa, Tokyo.

OKUDA K., KAJIURA Z., YAMASHITA O. (1986) Induction of perfect super larvae by the application of juvenile hormone analogue to starved larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol., 32(12), 1065-1073.

PRUDHOMME J.C., COUBLE P. (1979) The adaptation of the silk gland cells to the production of fibroin in *Bombyx mori* L. Biochimie, 6, 215-227.

PRUDHOMME J.C., COUBLE P., GAREL J.P., DAILLIE J. (1985) Silk synthesis. In: Comprehensive Insect physiology, biochemistry and pharmacology, vol. 10, G.A. Kerkut and L.I. Gilbert eds., pp. 371-395, Pergamon Press.

SHIBUKAWA A., AKAI H. (1981) Effect of Manta on the silk production of a silkworm race producing heavy cocoon shells. J. Seric. Sci. Jpn., 50(2), 73-76.

ETUDES SUR L'EFFET D'UN ANALOGUE DE L'HORMONE JUVENILE SUR LE VER A SOIE *BOMBYX MORI* L. BIVOLTIN

G. SUBBA RAO, S.K. DAS, S.K. SEN, S. NANDI*, R. SOMPOMU* et S.K. SEN

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

Un analogue de l'hormone juvénile disponible dans le commerce, Manta, a été testé chez le ver à soie pour en étudier l'effet sur la production de soie et d'autres caractères quantitatifs. Les larves de Bombyx mori L. ont été traitées par application locale à la 48ème, 72ème et 96ème heures après la 4ème mue avec une dose de 0,3125 µg par larve. Les valeurs obtenues pour chaque caractère quantitatif ont été enregistrées. Le traitement le plus efficace s'avère être celui à la 48ème heure après la 4ème mue. Dans tous les cas la période larvaire ou période d'alimentation a été allongée d'un jour. Le poids larvaire, le poids du cocon, le poids de la coque, la richesse soyeuse (%) et la longueur du filament ont augmenté respectivement de 12,39, 12,25, 16,27 et 10,97 % lorsque le traitement a eu lieu à la 48ème heure après la 4ème mue. Des larves du même âge traitées localement à l'eau distillée dans les mêmes proportions ont été prises comme témoins. Un lot témoin absolu a également été maintenu. Les résultats détaillés sont analysés et discutés.

INTRODUCTION

Akai et Kobayashi (1971) ont les premiers décrit l'induction d'une période larvaire prolongée par le traitement à l'hormone juvénile. Ils ont étudié l'influence de l'hormone juvénile sur la croissance et la métamorphose du ver à soie. Le poids du cocon et le poids de la coque augmentent dans les lots traités. La période la plus efficace de traitement se situe environ 72 heures après la 4ème mue pour une dose de 1 à 10 µg/g de poids corporel. Lorsque les larves reçoivent une forte dose (10 µg) d'hormone, certaines survivent 26 jours au 5ème âge. Akai *et al.* (1971) ont observé qu'un traitement hormonal unique au cours de la première partie du 5ème âge provoquait l'allongement de la période d'alimentation. Le poids de la coque augmente d'environ 30 % par rapport au témoin. Ces chercheurs recommandent une application locale de l'hormone. Murakoshi *et al.* (1972) ont obtenu des cocons géants par application locale de certains composés reliés structurellement à l'analogue de l'hormone juvénile. L'effet de Manta sur la production de soie a été étudié (Shibukawa et Akai, 1981).

Plus récemment, l'application pratique d'analogues de l'hormone juvénile a été testée en sériciculture par plusieurs chercheurs (Akai *et al.*, 1973, 1981 et 1984 ; Nihmura *et al.*, 1974 ; Kurata et Daillie, 1978 ; Kurata, 1981 ; Gaaboub *et al.*, 1985 ; Okuda *et al.*, 1986). Plusieurs informations ont encouragé l'étude de l'effet de l'hormone juvénile et de ses analogues sur la production de soie.

Afin de connaître l'effet d'un analogue de l'hormone sur le ver à soie bivoltin indien dans les conditions climatiques locales des montagnes de Kalimpong (environ 4 000 pieds au-dessus du niveau de la mer), nous avons entrepris la présente expérience.

* Regional Sericultural Research Station, Kalimpong, West Bengal, Inde.

MATERIEL ET METHODES

La race de ver à soie bivoltine P₅ maintenue dans les stations de recherches séricicoles de Kalimpong pendant plus de 15 ans est utilisée pour la présente expérience. Les vers à soie sont élevés au printemps à 24°C avec quatre repas par jour de feuilles de mûrier, et les techniques d'élevage habituelles.

Nous avons utilisé un analogue de synthèse de l'hormone juvénile, le méthoprène, commercialisé par la société japonaise Ohtsuka Pharmaceutical. La concentration est de 6,25 mg/2,5 litres d'eau. Une dose de 6,25 mg/2,5 litres d'eau/20 000 a été appliquée localement, soit 0,3125 µg par larve à la 48^{ème}, 72^{ème} et 96^{ème} heures après la 4^{ème} mue. Le lot témoin est formé de vers à soie traités avec de l'eau distillée (2,5 l d'eau/20 000 vers) aux trois mêmes heures de traitement. Un lot témoin absolu est aussi maintenu, composé de vers à soie non traités. Pour chaque lot trois replications sont faites, se composant de 200 vers chacune.

Pour établir une moyenne, l'expérience a été renouvelée pendant trois ans.

RESULTATS

Le Tableau I donne les résultats détaillés des performances d'élevage enregistrées pour plusieurs caractères quantitatifs. Le Tableau II montre les augmentations du poids larvaire, du poids du cocon, du poids de la coque, de la richesse soyeuse, de la longueur du filament et du pourcentage de survie par rapport au témoin.

Dans tous les lots traités, la période larvaire est prolongée d'un jour au 5^{ème} âge.

Poids larvaire : l'augmentation par rapport au témoin est respectivement de 12,31, 6,73 et 3,52 % chez les lots traités à la 48^{ème}, la 72^{ème} et la 96^{ème} heures après la 4^{ème} mue.

Poids du cocon : l'augmentation est respectivement de 12,25, 6,89 et 6,34 % chez les lots traités à la 48^{ème}, la 72^{ème} et la 96^{ème} heures après la 4^{ème} mue.

Poids de la coque : l'augmentation est respectivement de 16,27, 6,97 et 4,54 % chez les lots traités à la 48^{ème}, la 72^{ème} et la 96^{ème} heures après la 4^{ème} mue.

Richesse soyeuse : l'augmentation est respectivement de 2,68, 0,14 et 1,72 % chez les lots traités à la 48^{ème}, la 72^{ème} et la 96^{ème} heures après la 4^{ème} mue.

Longueur du filament : l'augmentation est respectivement de 10,97, 4,22 et 6,48 % chez les lots traités à la 48^{ème}, la 72^{ème} et la 96^{ème} heures après la 4^{ème} mue.

Le traitement à la 48^{ème} heure après la 4^{ème} mue s'est avéré le plus efficace pour obtenir une augmentation de la production de soie. Lors de ce traitement à la 48^{ème} heure, bien que le poids du cocon moyen soit de 2,29 g, on a obtenu un gros cocon d'un poids de 3,05 g avec un poids de la coque de 0,60 g.

DISCUSSION

Le rôle de l'hormone juvénile dans le développement et l'activité de la glande séricigène est évident (Prudhomme *et al.*, 1985). Précédemment, des chercheurs (Akai et Kobayashi, 1971 ; Akai *et al.*, 1971, 1973, 1981 ; Kurata, 1981) ont indiqué que l'application locale d'hormone juvénile ou d'un analogue structural au cours d'un 5^{ème} âge provoquait l'allongement du dernier âge larvaire et une augmentation possible de la production de soie. Chez la plupart des Lépidoptères, on obtient régulièrement une telle prolongation du dernier âge larvaire quand on administre des doses faibles ou modérées d'hormone juvénile ou d'un analogue structural pendant le dernier âge larvaire avant le début du filage du cocon (Gaaboub *et al.*, 1985). Pendant la période prolongée, les larves se développent et synthétisent de la soie et produisent donc des cocons plus gros que ceux des lots témoins (Akai *et al.*, 1981 ; Gaaboub *et al.*, 1985 ; Horie et Watanabe, 1980). L'hormone juvénile a été décrite comme étant le seul facteur expérimental capable de promouvoir une production de soie plus importante que chez les lots témoins (Prudhomme *et al.*, 1985). Lorsqu'elle est administrée au début du 5^{ème} âge, l'hormone juvénile induit une prolongation plus importante de l'âge larvaire et une augmentation de 30 % du poids du cocon (Prudhomme *et al.*, 1985).

Lors de la présente expérience, une faible dose (0,3125 µg/larve) donne une augmentation maximum du poids du cocon et de la production de soie lorsqu'elle est administrée à la 48ème heure après la 4ème mue.

On sait que à la fin de la période larvaire, le 5ème âge se caractérise par une hypertrophie de la glande séricigène et l'accroissement de la synthèse de la soie jusqu'au filage du cocon (Prudhomme *et al.*, 1985). Après la prise de nourriture qui suit la 4ème mue, la croissance exponentielle de la glande est accompagnée par une augmentation parallèle du contenu cellulaire en ADN, ARN et protéines (Prudhomme et Couble, 1979). L'application locale d'un analogue de l'hormone juvénile pendant les trois premiers jours du 5ème âge larvaire induit une réduction de la croissance de la glande séricigène. Mais lorsque le traitement local est arrêté, on observe une hypertrophie compensatrice de cet organe, la taille de la glande et son contenu en ARN augmentent bien au-delà des valeurs obtenues chez le témoin. Ce mécanisme explique probablement la production supplémentaire de soie (Kurata et Daillie, 1978 ; Daillie, 1979). Dans la présente expérience, la période d'alimentation augmente d'un jour au cours duquel les glandes séricigènes synthétisent une quantité accrue de soie après consommation de nourriture supplémentaire. On peut argumenter que la glande séricigène est le tissu cible de l'hormone juvénile parce qu'au cours des premières périodes du traitement hormonal, la croissance de la glande séricigène est inhibée, alors que les autres organes continuent de se développer comme chez les animaux témoins (Prudhomme, 1985).

L'expérience a été conduite au printemps comme l'avaient suggéré Koneko et Ohkubo (1980) car c'est la meilleure saison pour obtenir le plus de soie.

Le taux d'augmentation du poids de la coque soyeuse va de 4,5 à 16,27 % et celui de la longueur du filament va de 3,07 à 11,44 %. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus antérieurement par d'autres chercheurs (Akai *et al.*, 1973 ; Kurata, 1981) lesquels indiquaient respectivement une augmentation de la production de soie de 10 à 20 % et de 5 à 15 % par application d'hormone juvénile. Il est intéressant de noter ici que dans le cas du traitement à la 48ème heure après la 4ème mue, le poids de la coque augmente de 16,27 % et la longueur du filament de 10,97 % alors que dans le cas du traitement à la 96ème heure après la 4ème mue, le poids de la coque augmente de 4,54 % et la longueur du filament de 11,44 %. La longueur du filament moins importante chez les cocons avec le poids de la coque le plus élevé lors du traitement à la 48ème heure s'explique peut-être par la section plus grosse du filament comme l'ont observé antérieurement d'autres chercheurs (Akai *et al.*, 1984) chez *Bombyx mori* après traitement avec un juvénoïde similaire bien que nous n'ayons pas examiné ici la section du filament. De plus, nous avons observé comme paramètre la longueur de filament sans cassures (Tableau I). La possibilité d'une longueur de filament plus grande ne peut être exclue dans le cas du traitement à la 48ème heure. La présente étude indique aussi que l'effet de l'analogue de l'hormone juvénile dépend également du moment de l'application.

Deux types de témoins, témoin absolu (sans traitement) et témoin traité à l'eau distillée, ont été maintenus pour voir s'il existait un effet quelconque de la vaporisation d'eau seule étant donné que l'hormone est dissoute dans l'eau pour être vaporisée. Lorsqu'on compare les deux types de témoins, il est évident que certains paramètres sont légèrement affectés par la vaporisation d'eau. Mais on n'observe pas de différence significative entre les deux types de témoins pour aucun des caractères, à l'analyse statistique.

Les avantages de l'augmentation du poids de la coque peuvent être évalués par rapport à la dépense supplémentaire de nourriture. Le gain maximum en poids de la coque est obtenu lorsque le traitement est appliqué à la 48ème heure après la 4ème mue (Tableau I). Un bénéfice net de 74,55roupies indiennes par kg de soie grège produit peut être obtenu, en prenant en compte la dépense supplémentaire de nourriture, dans le cas du traitement à la 48ème heure après la 4ème mue. De plus, l'application d'hormone juvénile permet de reporter le stade du filage si cela est nécessaire à la gestion des récoltes au moment du filage.

EFFECT OF JUVENILE HORMONE ANALOGUE ON THE SILK GLAND OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

S.K. SARANGI

Research & Development Programme in Sericulture, Bangalore University, P.K. Block,
Bangalore 560 009, India.

Manta (Isopropyl 11-methoxy 3,7,11-trimethyl 2,4-dodecadienoate), a chemical analogue of juvenile hormone, was sprayed on the fifth instar larvae of bivoltine and multivoltine silkworm races and their silk glands were analysed for fibroin and total protein content. Application of *Manta*, though increased non significantly with the single dose, had a marked influence on the fibroin content of the silk gland of bivoltine race. In case of multivoltine race, the fibroin content increased with the single dose and decreased with the chronic dose of the chemical used. The total protein content of the silk gland showed almost a similar pattern as the change in the fibroin content in both the silkworm races studied.

Keywords: *Bombyx mori*, bivoltine, multivoltine, silk gland, fibroin, total protein.

INTRODUCTION

Quantitative variation in the concentration of fibroin has been reported in the silk gland of different races of the silkworm, *Bombyx mori* (Shigematsu and Takeshita, 1968; Tashiro *et al.*, 1968; Moriuchi *et al.*, 1972; Sarangi, 1985). Hormones like ecdysterone (Shigematsu & Moriyama, 1970; Shigematsu *et al.*, 1974) and juvenile hormone (Shigematsu, 1978; Daillie, 1979; Garel, 1983) have been shown to influence the concentration of fibroin, proteins and nucleic acids in the silk gland of bivoltine race. Further, these hormones and their chemical analogues have been commercially exploited for the improvement in silk production. Even though juvenile hormone analogues improve the commercial characters in multivoltine race, there is no information on the effect of these chemicals on quantitative variation in the silk gland of this race. The present communication deals with a comparative account of the effect of a chemical analogue of juvenile hormone, on the concentration of fibroin and total protein in the silk gland of bivoltine and multivoltine races of *Bombyx mori* during fifth instar development.

MATERIALS AND METHODS

Silkworms:

Bivoltine (NB₁₈) and multivoltine (Pure Mysore) races of *Bombyx mori* were maintained under standard laboratory conditions at a temperature of 25-28°C and a relative humidity of 75-90% on mulberry leaves (M₅ variety). The fifth instar larvae were first divided into three batches of 50 worms each. Batch I served as normal. Batch II was sprayed with a single dose (5 ppm at 48 hr, 10 ml) and Batch III was sprayed with three doses (5 ppm, 10 ml each at 48 hr, 72 hr and 96 hr of fifth instar development) of *Manta* (Isopropyl 11-methoxy 3,7,11-trimethyl 2,4-dodecadienoate) on the body uniformly using a hand sprayer. The larvae were kept in dark for 30 minutes before resumption of feeding to ensure maximum absorption. Pilot experiments were carried out to standardize optimum

dose and time of spraying for enabling the worms to spin cocoons. The larvae of average body weight were used at different time intervals of fifth instar development for the estimations.

Analyses of the silk gland:

The silk gland was dissected and washed with 0.9% NaCl. The intraglandular fibroin was extracted separately from middle and posterior parts of the silk gland according to the procedure of Tashiro *et al.* (1968). After complete extraction of fibroin, the extracts from both parts of the silk gland were pooled, weighed and expressed in terms of percentage with relation to the silk gland. The total protein from the silk gland was extracted by the reduction of disulfide bonds according to the procedure of Gamo *et al.* (1977) and estimated according to the method of Lowry *et al.* (1951). 4-5 larvae were taken individually for the determination of fibroin and total protein content of the silk gland during each spraying and the average value of four determinations along with standard deviation is presented in the table. Student 't' test was conducted to assess the level of significance.

RESULTS

Table I shows that the fibroin content of the silk gland of bivoltine race increased significantly, to about 3.6 fold, from the beginning to the end of fifth instar development. Single dose of Manta had no significant effect on the total fibroin content of the silk gland while the chronic dose had a marked influence on the fibroin content, increasing it significantly over the normal set. In case of multivoltine, the fibroin content increased significantly from 72 hr upto the spinning stage. However, the increase from the beginning to the end of fifth instar was only 2.7 fold. The concentration of fibroin, though increased with the single dose and decreased with the chronic dose, was not significantly affected by the spraying of Manta.

As shown in Table II, the total protein content of the silk gland of bivoltine race increased significantly from 24 hr to 120 hr, followed by a slight increase thereafter upto the spinning stage. The effect of Manta, however, was not significant with both doses used, except for an increase at the late fifth instar stage. In case of Mysore race, there was a significant increase in total protein content of the silk gland from the beginning to the end of fifth instar. Single dose of Manta had no significant effect on the protein content except for an increase at 168 hr. The chronic dose of Manta, on the other hand, decreased the total protein content of the silk gland throughout the fifth instar development.

DISCUSSION

Topical application of JH and its analogue have been shown to prolong the feeding period of fifth instar larvae of *Bombyx mori* with concomitant increase in cocoon shell weight (Akai *et al.*, 1971; Chang *et al.*, 1972). In the present experiment, a 5-6 hrs and about 20-24 hrs delay in spinning was observed with single and chronic dose of Manta, respectively. The concentration of fibroin increases from beginning to the end of fifth instar in different silkworm varieties (Sarangi, 1985) reaching the peak towards late part of fifth instar development (Garel, 1983). Present study shows that the synthesis and accumulation of fibroin in the silk gland is more in bivoltine compared to multivoltine. The effect of JH and JH analogues on silk synthesis has been reviewed (Garel, 1983). It is clear from the results that the single dose of Manta very slightly increased the concentration of fibroin in the silk gland of both the races studied. The chronic dose of Manta significantly increased the fibroin content in bivoltine whereas in multivoltine, there was an inhibitory effect. Further the spraying of Manta has an immediate inhibitory effect on the fibroin content decreasing its concentration at 72 hour in both the races studied, which is in accordance with the earlier reports (Shigematsu, 1978; Daillie, 1979).

Bivoltine and multivoltine showed a significant difference ($p < .001$) in the concentration of total protein throughout the fifth instar development. This confirms the high rate of synthesis and high degree of accumulation of both fibroin and sericin in bivoltine compared to multivoltine. The increase in the concentration of total protein in bivoltine after spraying of Manta may be due to an increased synthesis of silk proteins (Garel, 1983). Calvez (1981) has clearly elucidated the fact that JH does not affect the larval developmental programme and thus the increase in the concentration of total protein in the silk gland might be due to the increased food intake by the treated larvae. Interestingly, in case

Race	Treatment	24 hr Mean	SD	p	72 hr Mean	SD	p	120 hr Mean	SD	p	168 hr Mean	SD	p
Race	Traitement	Moyenne	E.T.	p	Moyenne	E.T.	p	Moyenne	E.T.	p	Moyenne	E.T.	p
NB ₁₈	Normal	6.53	±0.50		12.00	±0.72	<.005 ^c	20.80	±1.60	<.001 ^c	23.78	±1.32	<.05 ^c
	Sprayed*	6.42	±0.56	NS ^a	11.28	±0.91	NS ^a	22.43	±0.98	NS ^a	24.97	±1.98	NS ^a
	Brumisées*												
	Sprayed**	6.34	±0.60	NS ^b	10.53	±0.83	<.05 ^b	24.86	±1.23	<.025 ^b	26.35	±0.95	<.025 ^b
Mysore	Normal	5.75	±0.35		6.98	±0.63	NS ^c	10.63	±0.91	<.005 ^c	15.85	±1.10	<.005 ^c
	Sprayed*	5.59	±0.40	NS ^a	6.59	±0.50	NS ^a	12.28	±0.86	NS ^a	17.17	±1.54	NS ^a
	Brumisées*												
	Sprayed**	5.68	±0.41	NS ^b	5.69	±0.40	NS ^b	9.26	±0.70	NS ^b	13.98	±0.98	NS ^b
	Brumisées**												

* Single dose/ *Traitement dose unique* ** Chronic dose/ *Traitement continu*

a, b, and c denote the 'p' values between Normal and Single dose, Normal and Chronic dose and different times of fifth instar development, respectively./ a, b, et c représentent respectivement les valeurs de "p" entre les traitements Normal et Dose unique, Normal et Traitement continu, et les différents stades du développement au 5ème âge.

Table I. Effect of Manta on the fibroin content of the silk gland.

Tableau I. Effet de Manta sur le contenu en fibroïne de la glande séricigène.

Race	Treatment	24 hr Mean Moyenne	SD E.T.	p	72 hr Mean Moyenne	SD E.T.	p	120 hr Mean Moyenne	SD E.T.	p	168 hr Mean Moyenne	SD E.T.	p
Race	Traitement												
NB18	Normal	40.69	±3.82		87.87	±6.31	<.001 ^c	180.15	±7.98	<.001 ^c	185.64	±5.69	NS ^c
	Normales												
	Sprayed*	41.12	±2.10	NS ^a	91.75	±6.36	NS ^a	187.65	±6.73	NS ^a	193.92	±4.64	NS ^a
	Brumisées*												
Mysore	Sprayed**	39.76	±3.80	NS ^b	85.69	±6.36	NS ^b	190.64	±5.51	NS ^b	200.01	±6.75	<.025 ^b
	Brumisées**												
	Normal	30.35	±2.40		84.72	±6.99	<.001 ^c	122.23	±9.68	<.001 ^c	136.12	±6.36	<.05 ^c
	Normales												
	Sprayed*	33.33	±2.57	NS ^a	86.48	±4.92	NS ^a	128.30	±8.80	NS ^a	150.50	±6.85	<.025 ^a
	Brumisées*												
	Sprayed**	30.12	±1.67	NS ^b	80.02	±5.00	NS ^b	116.63	±9.74	NS ^b	120.98	±7.69	<.025 ^b
	Brumisées**												

* Single dose/ *Traitement dose unique* ** Chronic dose/ *Traitement continu*

a, b, and c denote the 'p' values between Normal and Single dose, Normal and Chronic dose and different times of fifth instar development, respectively./ a, b, et c représentent respectivement les valeurs de "p" entre les traitements Normal et Dose unique, Normal et Traitement continu, et les différents stades du développement au 5ème âge.

Table II. Effect of Manta on the total protein content (mg/g wet wt.) of the silk gland.

Tableau II. Effet de Manta sur le contenu total en protéines (mg/g de pds frais) de la glande séricigène.

of multivoltine, single dose of manta increased the total protein content while the chronic dose produced an inhibitory effect. It is not clearly understood at present, whether such inhibition is a result of sustained inhibitory effect of JH or there exist certain inhibitory factor(s) that affect the physiological process of silk synthesis in multivoltine. As such inhibition does not exist in bivoltine, the latter suggestion needs to be investigated further. Thus it can be surmised from the present study that there exist a differential response towards Manta by different races of *Bombyx mori*. This difference may be due to prolonged larval life by JH associated with increased food intake as postulated by Garel (1983) or the difference in the chemical composition of cells that co-ordinate JH action in the silk gland.

ACKNOWLEDGEMENT

The author acknowledges World Bank for financial assistance and the Co-ordinator, R & D Programme in Sericulture, Bangalore University for facilities. Thanks are due to Sarabhai Chemicals, India, for supplying Manta as a sample.

REFERENCES

- AKAI H., KIGUCHI K., MORI K. (1971) Increased accumulation of silk protein accompanying JH-induced prolongation of larval life in *Bombyx mori*. Appl. Ent. Zool., 6, 218-220.
- CALVEZ B. (1981) Progress of developmental programme during the last larval instar of *B. mori*, relationship with food intake, ecdysteroids and juvenile hormone. J. Insect Physiol., 27, 233-239.
- CHANG C.F., MURAKOSHI S., TAMURA S. (1972) Giant cocoon formation in the silkworm, *Bombyx mori*, topically treated with methylenedioxyphenyl derivatives. Agric. Biol. Chem., 36, 692-694.
- DAILLIE J. (1979) Juvenile hormone modifies larvae and silk gland development. Biochimie, 61, 275-281.
- FUKUDA T., FLORKIN M. (1959) Contribution to silkworm biochemistry. VII. Ordered progression of fibrinogen in the reservoir of the silk gland during the fifth instar. Arch. int. Physiol. Biochem., 67, 214-222.
- GAMO T., INOKUCHI T., LAUFER H. (1977) Polypeptides of fibroin and sericin secreted from different sections of the silk gland in *Bombyx mori*. Insect Biochem., 7, 285-295.
- GAREL J.P. (1983) Endocrinological aspects of silk production. Experientia, 39, 461-466.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- MORIUCHI A., KOGA K., YAMADA T., AKUNE S. (1972) DNA synthesis and activities of pyrimidine synthesizing enzymes in the silk gland of *Bombyx mori*. J. Insect Physiol., 18, 1463-1476.
- SAKAGUCHI B. (1978) In: The silkworm, an important laboratory tool (ed. Y. Tazima), 31-51, Kodansha Ltd., Tokyo.
- SARANGI S.K. (1985) Studies on the silk gland of *Bombyx mori*; a comparative analysis during fifth instar development. Proc. Ind. Acad. Sci., 94, 413-419.
- SHIGEMATSU H. (1978) The nature of juvenoid effects on growth and changes of proteins, amino acids and nucleic acid content in *Bombyx mori*. On the application of excessive dose. J. Sericult. Sci. Japan, 47, 292-300.
- SHIGEMATSU H., MORIYAMA H. (1970) Effect of ecdysterone on fibroin synthesis in the posterior division of silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol., 16, 2015-2022.
- SHIGEMATSU H., TAKESHITA H. (1968) Formation of silk proteins by the silkworm, *Bombyx mori*, after gamma ray irradiation in embryonic stage. J. Insect Physiol., 14, 1013-1024.
- SHIGEMATSU H., MORIYAMA H., ARAI N. (1974) Growth and silk formation of silkworm larvae influenced by photo-ecdysterones. J. Insect Physiol., 20, 867-875.
- TASHIRO Y., MORIMOTO T., MATSUMURA S., NAGATA S. (1968) Studies on the posterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Cell Biol., 38, 574-587.

EFFET D'UN ANALOGUE DE L'HORMONE JUVENILE SUR LA GLANDE SERICIGENE DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L.

S.K. SARANGI

Research & Development Programme in Sericulture, Bangalore University, P.K. Block,
Bangalore 560 009, Inde.

Le Manta (Isopropyl 11-méthoxy 3,7,11-triméthyl 2,4-dodécadiénoate), un analogue chimique de l'hormone juvénile est vaporisé sur des larves de races bivoltines et polyvoltines de ver à soie au 5ème âge. Le contenu en fibroïne et en sérécine des glandes sérécigènes est ensuite analysé. L'application du Manta a une influence marquée sur le contenu en fibroïne de la glande sérécigène de la race bivoltine, bien que l'augmentation observée avec l'application d'une dose unique ne soit pas significative. Dans le cas de la race polyvoltine, le contenu en fibroïne augmente avec une dose unique et diminue avec une application continue du produit chimique. Le contenu en protéines totales de la glande sérécigène montre une évolution presque similaire à celle du contenu en fibroïne observé chez les deux races de ver à soie.

INTRODUCTION

La variation quantitative de la concentration de fibroïne a été décrite chez la glande sérécigène de différentes races du ver à soie *Bombyx mori* (Shigematsu et Takeshita, 1968 ; Tashiro *et al.*, 1968 ; Moriuchi *et al.*, 1972 ; Sarangi, 1985). Il a été démontré que les hormones telles que l'ecdystérone (Shigematsu et Moriyama, 1970 ; Shigematsu *et al.*, 1974) et l'hormone juvénile (Shigematsu, 1978 ; Daillie, 1979 ; Garel, 1983) influencent la concentration en fibroïne, protéines et acides nucléiques chez la glande sérécigène des races bivoltines. De plus ces hormones et leurs analogues chimiques ont été exploités commercialement pour améliorer la production de soie. Bien que les analogues de l'hormone juvénile améliorent les caractères économiques chez les races polyvoltines, on ne connaît pas l'effet de ces produits chimiques sur la variation quantitative dans la glande sérécigène de ces races. Cette communication donne une comparaison de l'effet d'un analogue chimique de l'hormone juvénile sur la concentration de fibroïne et de protéines totales dans la glande sérécigène des races bivoltines et polyvoltines de *Bombyx mori* au cours du développement au 5ème âge.

MATERIELS ET METHODES

Vers à soie :

Des races de *Bombyx mori* bivoltine (NB₁₈) et polyvoltine (Pure Mysore) sont élevées en conditions de laboratoire à une température de 25-28°C et une humidité relative de 75-90 % sur des feuilles de mûrier (variété M₅). Les larves du 5ème âge sont d'abord divisées en trois lots de 50 individus chacun. Le lot I sert de témoin. Le lot II reçoit une dose unique (5 ppm à la 48ème heure, 10 ml) et le lot III, trois doses (5 ppm, 10 ml chaque fois à la 48ème, la 72ème et la 96ème heures du développement larvaire au 5ème âge) de Manta (Isopropyl 11-méthoxy 3,7, 11-triméthyl 2,4-dodécadiénoate) brumisées sur le corps de manière uniforme à l'aide d'un vaporisateur manuel.

Les larves sont gardées dans l'obscurité pendant 30 minutes avant qu'elles ne recommencent à se nourrir afin d'assurer une absorption maximum. Des expériences pilotes ont été effectuées afin de déterminer la dose et le moment de vaporisation les meilleurs pour que les vers à soie puissent filer leur cocon. Des larves de poids corporel moyen ont été utilisées à différents stades du développement du 5ème âge pour les estimations.

Analyses de la glande séricigène :

La glande séricigène est disséquée et lavée avec une solution à 0,9 % de Na Cl. La fibroïne intraglandulaire est extraite séparément du réservoir et du sécréteur de la glande séricigène selon le procédé de Tashiro *et al.* (1968). Après extraction complète de la fibroïne, les extraits des deux parties de la glande séricigène sont pesés et exprimés en pourcentages relatifs à la glande séricigène. Les protéines totales de la glande séricigène sont extraites par réduction des ponts disulfure selon le procédé de Gamo *et al.* (1977) et estimées selon la méthode de Lowry *et al.* (1951). Quatre à cinq larves sont prises individuellement pour déterminer quel est le contenu en fibroïne et protéines totales à chaque vaporisation. La valeur moyenne de quatre déterminations et l'écart-type sont présentés dans les tableaux. Le test "t" de Students est effectué pour connaître le niveau de signification.

RESULTATS

Le Tableau I montre que le contenu en fibroïne de la glande séricigène de la race bivoltine augmente de manière significative (environ 3,6 fois) du début à la fin du développement au 5ème âge. La dose unique de Manta n'a pas d'effet significatif sur le contenu en fibroïne totale de la glande séricigène tandis que la dose chronique a une influence marquée et augmente de manière significative le contenu en fibroïne au-delà de la normale. Dans le cas des polyvoltins, le contenu en fibroïne augmente de manière significative à partir de la 72ème heure jusqu'au stade du filage. Cependant, l'augmentation du début à la fin du 5ème âge est de seulement 2,7 fois. La concentration de fibroïne, bien qu'augmentée par la dose unique et diminuée par la dose chronique de Manta, n'est pas affectée de manière significative par la vaporisation de Manta.

Comme le montre le Tableau II, le contenu total en protéines de la glande séricigène de la race bivoltine, augmente de manière significative à partir de la 24ème heure jusqu'à la 120ème heure, suivie ensuite d'une légère diminution jusqu'au stade du filage. L'effet de Manta, cependant, n'est pas significatif avec les deux doses employées, sauf pour l'augmentation survenant à la fin du 5ème âge. Dans le cas de la race Pure Mysore, on observe une augmentation significative du contenu en protéines totales de la glande séricigène, du début à la fin du 5ème âge. La dose unique de Manta n'a pas d'effet significatif sur le contenu en protéines totales à l'exception d'une augmentation à la 168ème heure. La dose chronique, d'un autre côté, fait diminuer le contenu en protéines totales de la glande séricigène pendant tout le développement du 5ème âge.

DISCUSSION

Il a été montré (Akai *et al.*, 1971 ; Chang *et al.*, 1972) que des applications locales d'hormone juvénile et de ses analogues prolongent la période d'alimentation des larves au 5ème âge de *Bombyx mori* avec une augmentation concomitante du poids de la coque soyeuse. Lors de la présente expérience, un retard de 5 à 6 h et de 20 à 24 h a été respectivement observé avec la dose unique et avec la dose chronique de Manta. La concentration de fibroïne augmente du début à la fin du 5ème âge chez différentes variétés de ver à soie (Sarangi, 1985) avec un maximum dans la deuxième partie du développement au 5ème âge (Garel, 1983). Notre étude montre que la synthèse et l'accumulation de fibroïne dans la glande séricigène est plus importante chez les bivoltins que chez les polyvoltins. L'effet de l'hormone juvénile et de ses analogues sur la synthèse de la soie a été étudié (Garel, 1983). Les résultats montrent clairement que la dose unique de Manta augmente légèrement la concentration de fibroïne chez la glande séricigène des deux races étudiées. La dose chronique de Manta augmente de manière significative le contenu en fibroïne chez les bivoltins tandis que chez les polyvoltins, on observe un effet inhibiteur. De plus, la vaporisation de Manta a un effet inhibiteur immédiat sur le

contenu en fibroïne, lequel diminue à la 72ème heure chez les deux races étudiées, ce qui est en accord avec les résultats publiés antérieurement (Shigematsu, 1978 ; Daillie, 1979).

Les races bivoltine et polyvoltine ont une concentration en protéines totales significativement différente ($p < 0.001$) d'un bout à l'autre du développement au 5ème âge larvaire. Ceci confirme le taux élevé de synthèse et le haut degré d'accumulation de la fibroïne et de la séricine chez les bivoltins par rapport aux polyvoltins. L'augmentation des protéines totales chez les bivoltins après la vaporisation de Manta est peut-être due à la synthèse accrue des protéines de la soie (Garel, 1983). Calvez (1981) a clairement démontré que l'hormone juvénile n'affecte pas le programme de développement larvaire et l'augmentation des protéines totales dans la glande séricigène est peut être due à l'augmentation de la prise de nourriture chez les larves traitées. Il est intéressant de noter que, chez les polyvoltins, la dose unique de Manta accroît le contenu en protéines totales tandis que la dose chronique a un effet inhibiteur. On ne sait pas très bien pour le moment si une telle inhibition est le résultat de l'effet inhibiteur soutenu de l'hormone juvénile ou s'il existe certains facteurs inhibiteurs affectant le processus physiologique de la synthèse de la soie chez les polyvoltins. Comme cela n'est pas le cas chez les bivoltins, une telle hypothèse devra être étudiée. De la présente étude, on peut conclure qu'il existe une différence de réponse au Manta selon les races de *B. mori*. Cette différence est peut-être due à la prolongation de la période larvaire par l'hormone juvénile, associée à l'augmentation de la prise de nourriture comme l'a suggéré Garel (1983), ou à la différence de composition chimique des cellules coordonnant l'action de l'hormone juvénile dans la glande séricigène.

EFFECT OF LARVAL NUTRITION ON SURVIVAL, GROWTH AND REPRODUCTION IN THE SILKWORM *BOMBYX MORI* L.*

M.A. HANIFFA, M. THOMAS PUNITHAM and S. ARUNACHALAM

Research Department of Zoology, St. Xavier's College, Palayankottai 627 002, Tamil Nadu, India.

* This paper was presented in the Third All India symposium on Invertebrate Reproduction at Jamal Mohamed College (Tiruchirappalli) during May, 1984.

*When the number of feeds was restricted from 8 to 1 per day, **Bombyx mori** extended its larval period; however the pupal duration remained constant in all the groups. Those supplied one feed/day suffered heavy mortality. Increase in number of feeds enhanced the larval weight, the rates of feeding, assimilation, metabolism and conversion; it also produced elevated values in weight, length and diameter of cocoons. Restriction in feed number resulted in delayed onset of oviposition and reduced fecundity in virgin and mated **B. mori**. Maximum live weight of 3.49 mg live weight was noticed for the first instar larvae belonging to 8 feeds pairs and it decreased to 2.87 mg for 2 feeds pairs.*

INTRODUCTION

In recent years, adverse effects of restrictions of feeding duration and/or ration level on Lepidopterans have been reported by several authors (e.g. Mathavan and Muthukrishnan, 1976; Muthukrishnan *et al.*, 1978; Pandian *et al.*, 1978) and most of them accumulated data on bioenergetics and neglected aspects with regard to reproduction even though nutritional factors interfered with reproductive function (see Walker, 1976; Slansky, 1980; Shahi and Krishna, 1981). The fact that the number of eggs produced depends upon the amount of ingested food has been demonstrated by a few authors in heteropterans (e.g. Khalifa, 1952; Slansky, 1980), hemipterans (Friend *et al.*, 1965) and coleopterans (Ives, 1981) which more or less rely on imaginal food intake for egg production, but similar work on lepidopterans which accumulate reserve food energy during the larval period to tide over the subsequent non-feeding pupal and adult stage and to lay eggs (autogeny) are still limited and the present study examines larval nutrition and autogeny in the silkworm *Bombyx mori*. In addition, some observations are presented on mortality, stadium, body weight, food utilization, fecundity and fertility.

MATERIALS AND METHODS

Fresh eggs of *B. mori* were brought from a local sericulture farm at Nannakaram (Tenkasi, Tirunelveli District) and acclimated to the laboratory conditions. After hatching, the first instar larvae were collectively reared on leaves of *Morus alba*. After one week, the larvae were weighed individually and 125 individuals were recruited and divided into 5 groups of 25 larvae each. Five series of feeding experiments, with five groups in each were commenced. Larvae in the I series were fed *ad libitum* once a day (hereafter referred as one feed/day); those in the II, III, IV and V series were fed 2, 4, 6 and 8 times/day (hereafter referred as 2, 4, 6 and 8 feeds/day) and old unfed leaves were removed before each fresh feeding.

Faecal pellets from the different groups were separately collected daily and dried to constant weight at 80°C for 2 days. From the mean (dry) weight of faeces egested/larva/day, food consumption

/larva/day in the different groups was calculated following the methods suggested by Mathavan and Pandian (1974), Schroder (1976) and Haniffa *et al.* (1982). The scheme of energy budget followed here is the slightly modified IBP formula represented as $C = P + R + F + U$, where C is the food energy consumed, P the growth, R the energy lost as heat due to metabolism, F the undigested food and U the nitrogenous end products.

The final dry weight of the test larvae minus the respective initial dry weight gave the amount of dry food converted. Rates of feeding, assimilation and conversion were calculated by dividing the respective amounts of dry weights by the product of mid body weight (see Waldbauer, 1968) of the larva and duration of instar. After cocoon formation, they were weighed and length and diameter were also measured. After emergence males and females of different groups were allowed to mate in different combinations for an optimum mating duration of 6 hours (Haniffa *et al.*, 1986; Haniffa and Stephen Jose, 1987; Thomas Punitham *et al.*, 1986). Mated females were allowed to lay eggs separately and the number of eggs laid by each individual was also recorded. The time taken by the imago after emergence till it started egg laying was recorded as pre-oviposition period for each female. After oviposition each female was weighed and life span (post-oviposition life span) was recorded separately.

RESULTS AND DISCUSSION

Mortality was reduced considerably with the increase in feeds (Fig. 1). When *B. mori* received one feed/day, 57% of the test individuals died during the larval stage and the remaining succumbed after pupation. Adult survival was 47% for those supplied 2 feeds/day and it increased to 97% when fed on 8 feeds/day. With the increase in feeds, a decrease in larval period was noticed in all the instars. For instance, the 2nd instar period was 98 hrs for *B. mori* received 1 feed/day and it decreased to 72 hours for those supplied 8 feeds/day; the corresponding decreases in the 3rd, 4th and 5th instars were from 170 to 117, 192 to 129 and 178 to 127 hours. Total larval period (excluding 1st instar period) recorded for different feeds was 27, 24, 21, 20 and 19 days respectively and pupal duration was the same (10 days) in all the test individuals irrespective of the number of feeds (Fig. 2). Mathavan and Muthukrishnan (1976) and Mathavan *et al.* (1987) too reported extension of larval period and a constant pupal period in the silkworm *Bombyx mori* as a function of restriction of feeding duration.

Table I reports the energy budget of *B. mori* as a function of feed number. Increase in feeds enhanced the rates of feeding (189 to 298 mg/g/day), assimilation (104 to 142 mg/g/day), conversion (19 to 36 mg/g/day) and metabolism (86 to 107 mg/g/day); it also produced elevated values in weight (673 to 2327 mg), length (2.4 to 3.7 cm) and diameter (1.1 to 1.9 cm) of cocoons (Fig. 3). Fig. 4 shows the live weight of larvae as a function of feeds. Individuals supplied 8 feeds/day increased from a mean initial body weight of 3.3 mg to 2641 mg at the end of the larval period, whereas those supplied 6, 4, 2 and 1 feed/day attained 2012, 1428, 1161 and 770 mg respectively and became pupae. Samson *et al.* (1980) reported the effect of starvation for different durations in different instars of *B. mori* and confirmed that increase in starvation period resulted in significant decrease in the larval weight and significant increase in larval duration.

Table II reports the data on fecundity of *B. mori* supplied different number of feeds and mated in different combinations. Virgin *B. mori* supplied 8 feeds/day took 14 hrs to lay eggs after emergence, whereas those fed twice took 17 hrs for eggs laying. They laid 162 eggs, when supplied 8 feeds and 145, 112 and 73 eggs when fed 6, 4 and 2 feeds/day. Correspondingly the post-oviposited life span also showed a decrease from 248 hrs to 122 hrs. Total number of eggs laid was the highest (562) for pairs given 8 feeds/day and the least (217) for those supplied 2 feeds/day. Whereas increase in feed accelerated the egg output in all combinations, decrease in feed enhanced the pre-oviposition period. Hohansson (1958) too found that restricted feeding of virgin females *Oncopeltus fasciatus* to 3 hrs or less/day resulted in delayed onset of oviposition and reduced fecundity compared to bugs with continual access to seeds (Slansky, 1980). Samson *et al.* (1980) reported that percentage of eggs laid and weight of eggs decreased significantly due to starvation particularly in the worms that were subjected to prolonged starvation. Newmann (1976) also reported that starvation lowered the fecundity of crowded females. Wigglesworth (1936) showed that in females of the heteropteran *Rhodnius prolixus*, the cells of corpus allatum shrink after prolonged fasting and if fed they became

swollen and the reproductive organs became active. In *Oncopeltus* sp. and *Leucophaea* sp. egg production was inhibited in starved females and was induced by implantation of a corpus allatum from a sexually mature female (Johansson, 1954, 1955).

Feed/ day <i>Nbre de repas par jour</i>	Food consumed <i>Nourriture consommée</i>	Food assimilated <i>Nourriture assimilée (mg/g/day)</i>	Food converted <i>Nourriture convertie (mg/g/jour)</i>	Food metabolized <i>Nourriture métabolisée</i>	Conversion efficiency <i>% de conversion (%)</i>
1	189.3	104.1	18.5	85.5	17.8
2	218.9	120.4	22.2	98.3	18.4
4	272.6	149.9	29.8	85.5	19.9
6	286.9	135.8	33.9	107.9	20.5
8	297.9	142.3	35.5	96.7	20.9

Each value represents the average performance of 3 to 5 individuals and all the values are expressed as mg dry weight/g live insect/day.

Chaque valeur représente la moyenne des résultats obtenus chez 3 à 5 individus et toutes les données sont exprimées en mg de poids sec/g du poids de l'insect vivant/jour.

Table I. Effect of feed number on the energy budget of the silkworm *B. mori* fed on leaves of *M. alba* at 30±2°C.

Tableau I. Influence du nombre de repas sur la répartition énergétique chez le ver à soie *B. mori*

It is possible to suggest that the number of eggs and egg weight seemed to be buffered against the changes due to food limitation and hence more time was required to accumulate sufficient energy and nutrients to produce a similar egg number/biomass with low food intake. The reduction in egg production in *B. mori* could not be due to the interruption of vitellogenesis with subsequent oosorption (DeWilde and DeLoof, 1973a, b). Slansky (1980) also suggested that the delayed onset and reduced rate of egg production by pairs of *Oncopeltus fasciatus* on low feeding caused a high proportion of the assimilated food to be metabolized for maintenance and resulted in the low gross egg production efficiency. The gross production efficiency of egg (egg number/ingestion x 100)* and/or young one (total weight of newly hatched/ingestion x 100) remained high (10.22 and 33.7%) for pairs on 6 feeds/day, only a little less than that for pairs on 8 feeds/day (10.6 and 36.8%) indicating that it was the rate but not the efficiencies of assimilation and conversion of food into eggs which reduced and resulted in the decreased rate of egg production for pairs on 2 or 4 feeds/day (Table III).

The factors controlling autogeny are unknown in many species of autogenous insects although nutritional factors during the larval instars (Robbins and Shortine, 1962; Laurence, 1964; Lea, 1964; Larsen *et al.*, 1966) and the genetic constitution of the individual (Laven, 1951; Spielman, 1957) are known. Engelman (1970) and Calow (1973) reported that normal reproduction in adult insects is a physiological syndrome with nutritional and neuroendocrine interactions and ecological implications. In several species of insects (Engelmann, 1970) copulation is a stimulus that triggers the hormones responsible for vitellogenesis; on the other hand, nutrition can act equally on the endocrine system

* Eggs were not weighed since handling affected normal hatching.

Feed/day Nb de repas/jour		Pre-oviposition period (hrs) Période avant la ponte (h)	Number of egg laid Nb de d'oeufs pondus	% of hatching % d'éclosion	Post oviposited life span (hrs) Durée de vie après la ponte (h)	Body weight of 1st instar (mg live wt) Pds corporel au 1er âge (mg pds vivant)
Male Mâle	Female Femelle			Virgin/ Vierges		
	8	14.3±3.12	162.4±13.20	0	248±27	
	6	15.0±2.62	144.8± 9.60	0	199±39	
	4	17.1±2.81	112.4±11.40	0	180±5	
	2	16.1±1.47	72.5± 6.50	0	122±5	
				Mated/ Accouplées		
8	8	7.0± 0.21	562.3± 34.42	92.7± 3.4	223± 22	3.49± 0.003
8	6	8.2± 1.01	482.2± 21.74	95.3± 1.6	197± 15	3.35± 0.002
6	6	7.6± 0.82	493.5± 29.26	98.1 ± 0.4	194± 26	3.31 ± 0.004
8	4	8.4± 0.51	381.1± 19.47	100	152± 30	3.08± 0.009
6	4	9.3± 0.75	377.7± 26.73	98.4 ± 0.2	170± 14	3.11± 0.004
4	4	8.6± 0.92	389.5± 31.66	100	168± 16	3.06± 0.007
2	2	8.7± 1.82	217.0± 39.17	100	123± 7	2.78± 0.006

Each value represents the mean ± SD from 3-5 observations/ Chaque valeur représente la moyenne ± écart-type de 3 à 5 observations.

Table II. Effect of feed number on pre-oviposition period, egg output, hatching, post-oviposited life span and body weight of first instar in the silkworm *B. mori*.

Tableau II. Influence du nombre de repas sur la durée de la période avant la ponte, la production d'oeufs, l'éclosion, la durée de vie après la ponte et le poids corporel au premier âge chez le ver à soie *B. mori*.

which in turn releases the gonadotrophic hormones. Hence in the present investigation copulation was allowed for an optimum period of 6 hours (Thomas Punitham *et al.*, 1986). Food limitation (total starvation in the extreme cases) affects the onset and extent of egg production indirectly through influencing the neuroendocrine system (Ralph, 1976; Rankin, 1978) and directly through limiting the supply of energy (Walker, 1976; Slansky, 1980).

Feed/ day <i>Nbre de repas/jour</i>	Ingestion (dry mg) <i>Ingestion (mg pds sec)</i>	Number of eggs* <i>Nbre d'oeufs*</i>	Wt of newly hatched* <i>Pds des larves néonates* (mg)</i>	Production efficiency (PE) <i>Productivité</i> Egg** <i>Oeuf**</i>	Young one*** <i>Larve néonate***</i>
2	3084.1	217	2.78	7.0	19.5
4	4022.0	389	3.06	9.7	29.5
6	4849.2	494	3.30	10.2	33.7
8	5331.2	563	3.49	10.6	36.8

*per female/ *par femelle*

**Gross egg production efficiency in relation to number/ *Productivité brute en nombre d'oeufs*

*** Gross (young one) production efficiency in relation to weight/ *Productivité brute en larves néonates calculée en poids.*

Table III. Mean food consumption and conversion (egg and young one) by mated female *B. mori* offered increased feeds.

Tableau III. Consommation et conversion (en oeufs et en larves néonates) moyennes de la nourriture chez des femelles accouplées de *B. mori* selon le nombre de repas.

The fact that hatching of eggs was cent per cent in under-fed groups and it decreased to 93% in maximum fed individuals was quite interesting and unexpected. From Table II, it seems that percentage of hatching was not much affected by feeds even though a negative trend was noticed. Maximum body weight of 3.49 mg live weight was noticed for the first instar larvae belonging to 8 feeds pairs and it decreased to 2.87 mg for 2 feeds pairs. Post-ovipositioned life span also showed a decrease from 223 hrs to 123 hrs with the decrease in feeds from 8 to 2/day. In the present experiment food intake of pairs given 4 to 8 feeds/day was sufficient to stimulate the normal onset of egg production normally attained throughout life but pairs given 2 feeds/day was not sufficient to stimulate the normal onset nor to achieve and maintain the normal rate of egg production. Mated female *B. mori* laid more eggs than virgins and although the male controls the frequency of copulation, infrequent matings were sufficient to stimulate normal egg production and even males starved from eclosion were also fertile. This observation in *B. mori* is supported by the reports of previous authors, who worked on insects (e.g. Johansson, 1958; Gordon and Loher, 1968; Ralph, 1976; Walker, 1976; Walker, 1978; Thomas Punitham *et al.*, 1986). Hence it seems that the effects of food limitation (decrease in feed number) upon reproduction in *B. mori* (extension of pre-oviposition period, decrease in egg output, etc) are due to the effect upon female, which requires a high food intake to initiate and maintain reproduction compared to males (Slansky, 1980).

Previous authors reported that in insects, reduced ration levels resulted in a number of negative effects such as heavy mortality, extension of stadia and decrease in final body weight (Muthukrishnan and Delvi, 1974; Mathavan and Muthukrishnan, 1976; Haniffa and Periasamy, 1981). Most of the authors, who collected data on influence of quantity of food on bioenergetics of lepidopterans

Parameter/ <i>Paramètre</i>	Probability/ <i>Probabilité</i>	Statistical analysis/ <i>Analyse statistique</i>				
Regression & Student's 't'/ <i>Régression et test 't' de Student</i>						
Mortality <i>Mortalité</i>	p	Before cocoon <i>Avant stade cocon</i>		After cocoon <i>Après stade cocon</i>		Total <i>Total</i>
		< 0.02		< 0.10		< 0.05
Instar period/ <i>Ages larvaires</i>	p	II	III	IV	V	Total
		< 0.001	< 0.002	< 0.02	< 0.05	< 0.01
Energy budget <i>Répartition énergétique</i>	p	FR	AR	CR	MR	CE
		< 0.05	> 0.1	< 0.002	> 0.10	< 0.01
Pupa/ <i>Chrysalide</i>	p	Weight/ <i>Poids</i>		Length/ <i>Longueur</i>		Diameter/ <i>Diamètre</i>
		< 0.001		< 0.01		< 0.01
Analysis of variance/ <i>Analyse de variance</i>						
Body weight of instars <i>Poids corporel des larves</i>	p	Time effect/ <i>Effet du temps</i>			Feed effect/ <i>Effet de la nourriture</i>	
		< 0.01			< 0.01	

FR : Feeding rate/ Taux d'ingestion ; AR : Assimilation rate/ Taux d'assimilation ; CR : Conversion rate/ Taux de conversion ;
MR : Metabolic rate/ Taux de métabolisme ; CE : Conversion efficiency/ Efficacité de conversion.

p < 0.05 : significant/ significatif ; p < 0.001 : highly significant/ très significatif ; p > 0.05 : not significant/ non significatif

Table IV. Statistical analyses for the effect of feed number on mortality, larval period, larval weight, energy budget and pupal size in the silkworm *B. mori*.

Tableau IV. Analyse statistique de l'influence du nombre de repas sur la mortalité, la durée de la période larvaire, le poids larvaire, la répartition énergétique et la taille de la chrysalide chez le ver à soie *B. mori*.

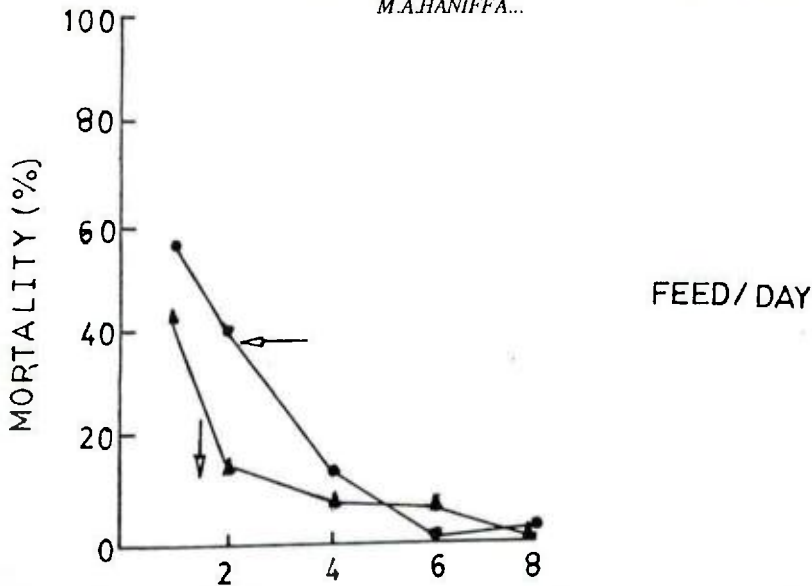


Fig. 1. Effect of feed number on mortality of larva and pupa of *B. mori*.

Fig. 1. Influence du nombre de repas sur la mortalité larvaire et nymphale de B. mori.

Each value represents the average performance of 3-5 observations.
 Chaque valeur représente la moyenne des résultats de 3 à 5 observations.

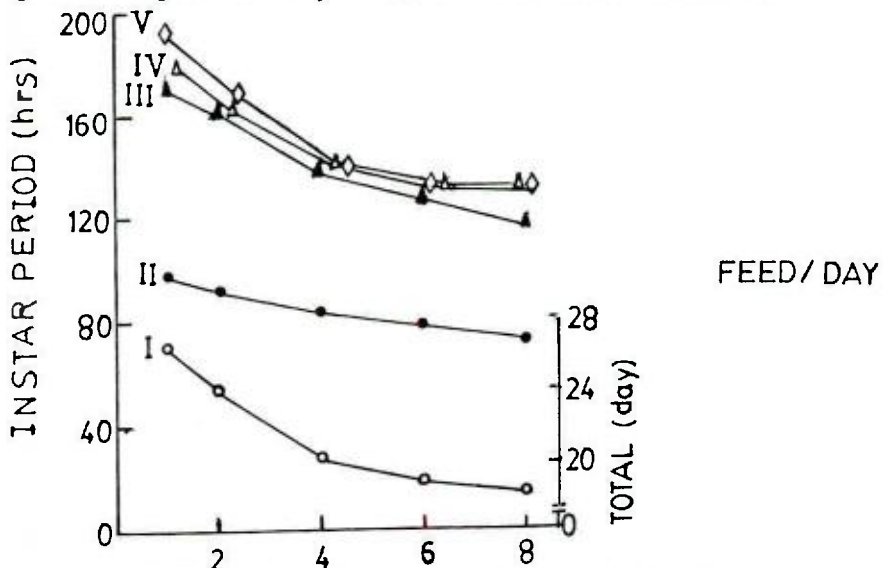


Fig. 2. Effect of feed number on instar period on *B. mori*.

Fig. 2. Influence du nombre de repas sur la durée des âges larvaires chez B. mori.

Each value (mean $\pm$ SD) represents the average performance of a minimum of 3-5 observations.

Chaque valeur (moyenne $\pm$ écart-type) représente la moyenne des résultats de 3 à 5 observations au moins.

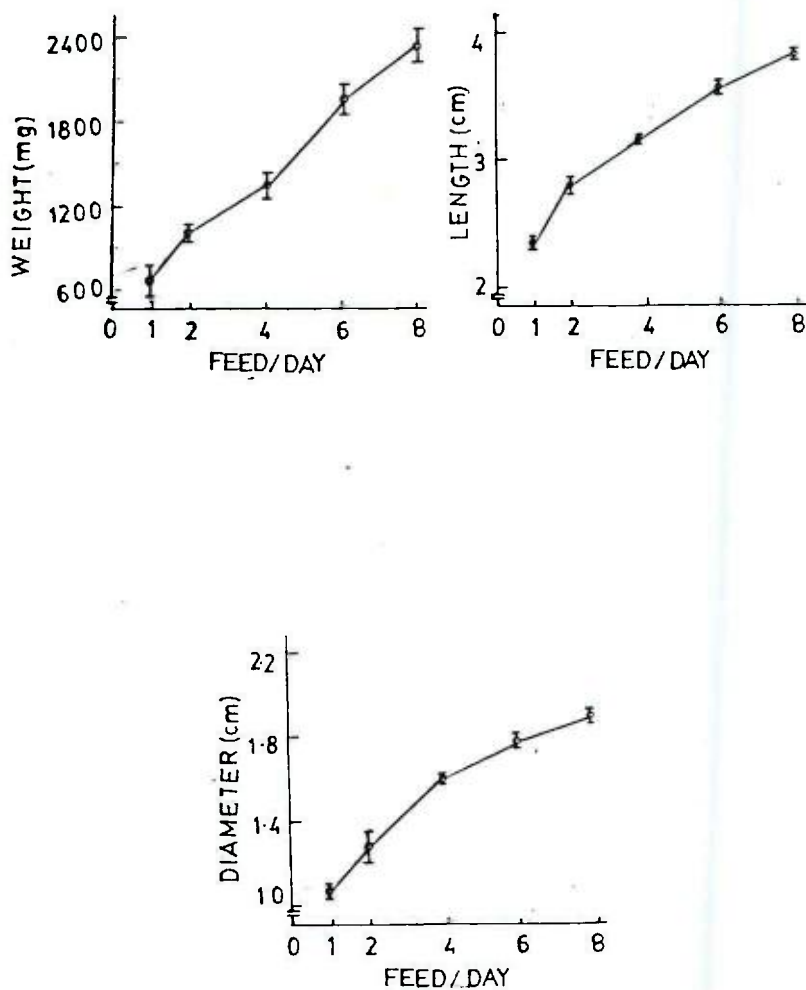


Fig. 3. Effect of feed number on weight, length and diameter of *B. mori* cocoons.

Fig. 3. Influence du nombre de repas sur le poids, la longueur et le diamètre des cocons de B. mori.

Each value (mean $\pm$ SD) represents the average performance of a minimum of 3-5 observations.

Chaque valeur (moyenne $\pm$ écart-type) représente la moyenne des résultats de 3 à 5 observations minimum.

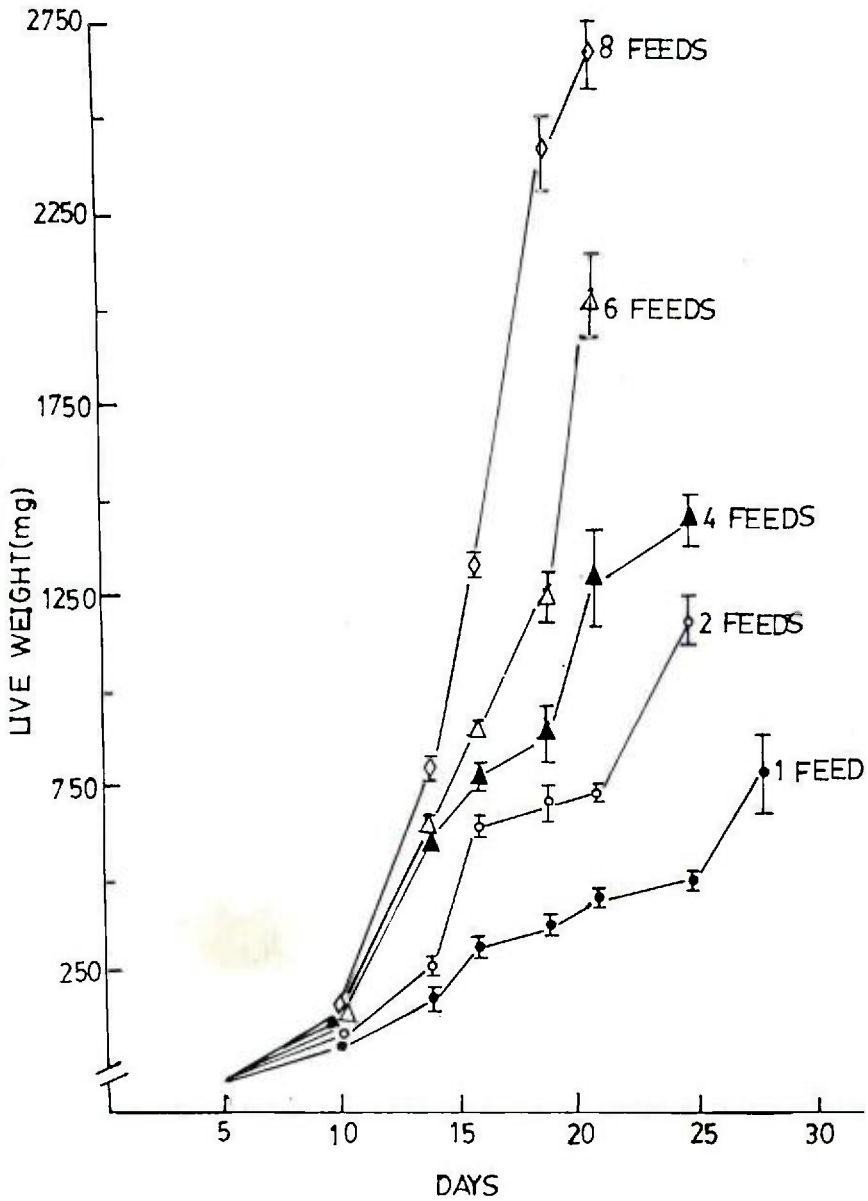


Fig. 4. Live weight of *B. mori* larvae as a function of feed number.

Fig. 4. Poids d'une larve de *B. mori* vivante en fonction du nombre de repas.

Each value (mean $\pm$ SD) represents the average performance of a minimum of 3-5 observations.

Chaque valeur (moyenne $\pm$ écart-type) représente la moyenne des résultats de 3 à 5 observations au moins.

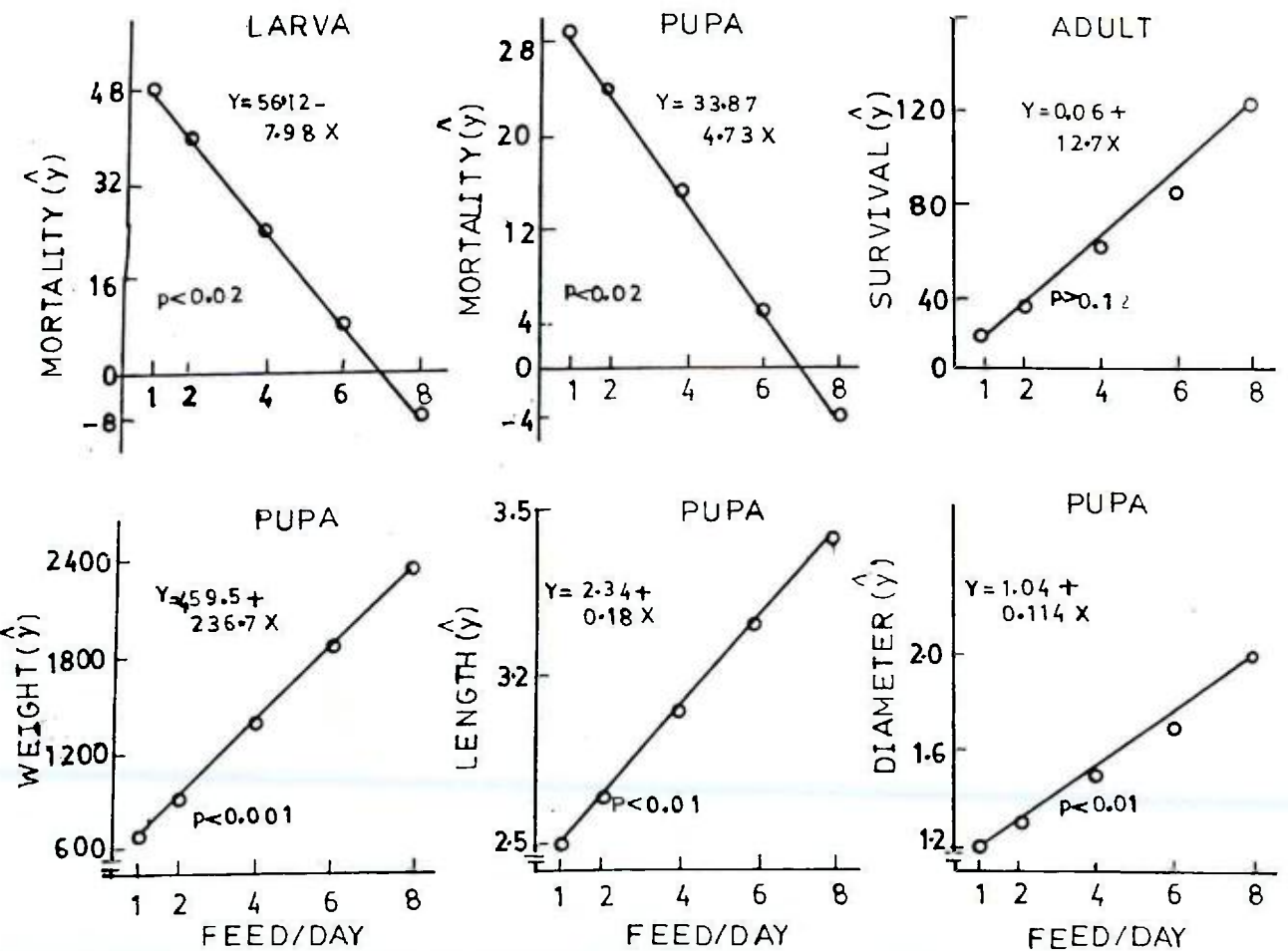


Fig. 5. Regressions and student's 't' as a function of feed number versus mortality and pupal dimensions of *B. mori*.

Fig. 5. Test 't' de régression de Student sur le nombre de repas en fonction de la mortalité et des dimensions des nymphes de *B. mori*.

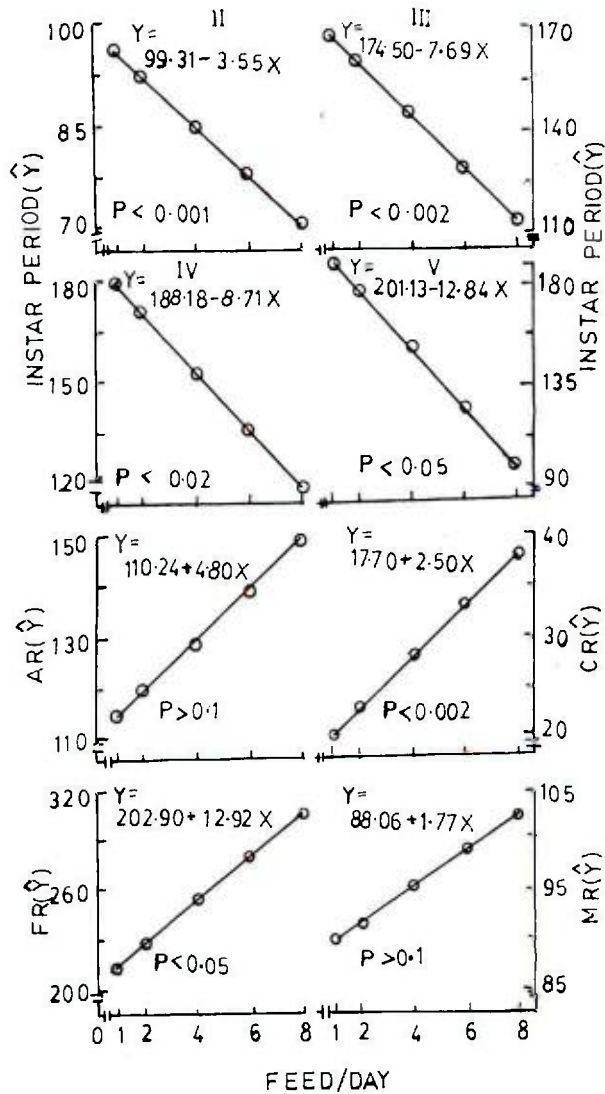


Fig. 6. Regressions and student's 't' as a function of feed number versus instar period and rates of feeding (FR), assimilation (AR), metabolism (MR) and conversion (CR) of *B. mori*.

Fig. 6. Test 't' de régression de Student sur le nombre de repas en fonction de la durée de la période larvaire et des taux d'ingestion (FR), d'assimilation (AR), de métabolisme (MR) et de conversion (CR) chez *B. mori*.

concentrated ration levels rather than number of feeds. When the test larvae are fed on leaves in laboratory, the leaves dry within a few hours and hence data obtained for the energy budget may not reflect the actual food intake. Hence in the present study, nutritional stress was given through number of feeds instead of ration levels. Regression and student's 't' test analyses confirmed that food limitation influenced survival ($p < 0.05$), larval period ($p < 0.05$), pupal size ($p < 0.01$) and energy budget significantly (Fig. 5 & 6). Analysis of variance showed that both the time and feed number significantly affected the live weight of *B. mori* ($p < 0.01$; Table IV). The present data on food limitation also support the hypothesis of reciprocal interaction between nutrient intake and egg production (Engelmann, 1970; DeWilde and DeLoof, 1973 a, b; Walker, 1976; Slansky, 1980).

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Rev. Fr. G. Packiaraj, S.J. (St. Xavier's college) for offering facilities and Dr. S. Mathavan (Madurai Kamaraj University) for valuable suggestions. Thanks are due to Mr. A.G. Murugesan (SRF, CSIR) for help.

REFERENCES

- CALOW P. (1973) The relationship between fecundity, phenology and longevity: a system approach. *Am. Nat.*, 107, 559-574.
- DEWILDE J., DELOOF A. (1973a) Reproduction. In: *The Physiology of insects*, Academic Press, vol. 1, 11-95.
- DEWILDE J., DELOOF A. (1973b) Reproduction-endocrine control. In: *The Physiology of insects*, Academic Press, vol. 1, 97-157.
- ENGELMANN F. (1970) *The Physiology of insect reproduction*, Pergamon Press, New York.
- FRIEND W.G., CHOY C.T.H., CARTWRIGHT E. (1965) The effect of nutrient intake on the development and egg production of *Rhodnius prolixus* Stahl (Hemiptera : Reduviidae). *Can. J. Zool.*, 43, 891-904.
- GORDON H.T., LOHER W. (1968) Egg production and male activation in new laboratory strains of milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*. *Am. ent. Soc. Am.*, 61, 1573-1578.
- HANIFFA M.A., PERIASAMY K. (1981) Effect of ration level on nymphal development and food utilization in *Acrotylus insubricus* (Scopoli) (Orthoptera : Acrididae). *Acrida*, 10, 91-102.
- HANIFFA M.A., NATHER KHAN I.S.A., BALAKRISHNANN. (1982) Effect of space on food utilization and morphological features of the butterfly *Polydorus aristocochiae* (Lepidoptera: Papilionidae). *Entomon.*, 7, 155-162.
- HANIFFA M.A., DEVARAJ M., MURUGESAN A.G., THOMAS PUNITHAM M. (1986) Inhibition of pupal development and egg production in the silkworm *Bombyx mori* (L) following application of insecticide and secondary plant substance. *Mitt. Zool. Mus; Berl.*, 62, 337-342.
- HANIFFA M.A., STEPHEN JOSE S. (1987) Inhibition of egg production and fertility in the house cricket *Gryllodes sigillatus* Walker (Orthoptera : Gryllidae) following topical application of cythion. *Anzei fur. Schad. Pflanz. Umwelts.*, 60, 136-139.
- IVES P.M. (1981) Feeding and egg production of two species of coccinellids in the laboratory. *Can. Ent.*, 113, 999-1005.
- JOHANSSON A.S. (1954) Corpus allatum and egg production in starved milkweed bugs. *Nature*, 174, 89.
- JOHANSSON A.S. (1955) The relationship between corpora allata and reproductive organs in starved female *Leucophaga moderata* (Blattaria). *Biol. Bull. Woods. Hole.*, 108, 40-44.
- JOHANSSON A.S. (1958) Relation of nutrition to endocrine reproductive functions in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* (Dallas) (Heteroptera : Lygaeidae). *Nytt. Mag. Zool.*, 7, 3-132.
- KHALIFA A. (1952) A contribution to the study of reproduction in the bed bug (*Cimex lectularius* L) (Hemiptera : Homoptera). *Bull. Soc. Fouad. Ent.*, 36, 311-336.
- LAURENCE B.R. (1964) Autogeny in *Aedes (Finlava) togoi* Theobald (Diptera : Culicidae). *J. Insect Physiol.*, 10, 319-331.

- LARSEN J.R., PFADT R.E., PETERSON L.G. (1966) Olfactory and oviposition responses of the housefly to domestic manure with notes on an autogenous strain. *J. econ. Ent.*, 59, 610-615.
- LAVEN H. (1961) Untersuchungen und Deutungen Zum *Culex pipens* Komplex. *Trans. R. ent. Soc. Lon.*, 102, 365-368.
- LEA A. (1964) Studies on the dietary and endocrine regulation of autogenous reproduction in *Aedes taeniorhynchus* (Wied). *J. med. Ent.*, 1, 40-44.
- MATHAVAN S., MUTHUKRISHNAN J. (1976) Effects of ration levels and restriction of feeding duration on food utilization in *Danaus chrysippus* (Lepidoptera : Danidae). *Ent. exp. Appl.*, 19, 155-162.
- MATHAVAN S., SANTHI G., NAGARAJA SETHURAMAN B. (1987) Effects of feeding regime on energy allocation to reproduction in the silkworm *Bombyx mori*. *Proc. Indian Acad. Sci.*, 96, 333-340.
- MUTHUKRISHNAN J., DELVI M.R. (1974) Effect of ration level on food utilization in the grasshopper *Poecillocerus pictus*. *Oecologia*, 16, 227-236.
- MUTHUKRISHNAN J., MATHAVAN S., NAVARATHNA JOTHI V. (1978) Effects of the restriction of feeding duration on food utilization, emergence and silk production in *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombycidae). *Monitore Zool. Ital.*, 12, 87-94.
- NEWMANN F.G. (1976) Egg production, adult longevity and mortality of stick insect *Diolymuria violascens* (Leach) *phasmatoda* inhabiting mountain ash forest in Victoria. *J. Aust. Entomol.*, 15, 183-190.
- PANDIAN T.J., PITCHAIRAJ R., MATHAVAN S., PALANICHAMY R. (1978) Effects of temperature and leaf ration on the water budget of the final instar larva on *Danaus chrysippus* L. (Lepidoptera : Danidae). *Monitore Zool. Ital.*, 12, 17-28.
- PETRUSEWICZ K., MACFADYEN A. (1970) Productivity of terrestrial animals. IBP Hand Book No. 13, Blackwell, Oxford, pp.190.
- RALPH C.P. (1976) Natural food requirements of the large milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera : Lygaeidae) and their relation to gregariousness and host plant morphology. *Oecologia*, 26, 157-175.
- RANKIN M.A. (1978) Hormonal control of insect migratory behaviour. In: *Evolution of insect migration and diapause*, Springer, New York, 5-32.
- ROBBINS W.E., SHORTINO T.J. (1962) Effect of cholesterol in the larval diet on ovarian development in the adult housefly. *Nature*, 194, 502-503.
- SAMSON M.V., NATARAJ B., BAIG M., KRISHNASWAMY S. (1980) Starvation of *Bombyx mori* L. on cocoon crop and incidence of loss due to diseases. *Proc. Seric. Symp. sem. TNAU Coimbatore*, 163-167.
- SCHROEDER L.A. (1976) Effect of food deprivation in the efficiency of utilization of dry matter, energy and nitrogen by larvae of the cherryscallop moth *Calocalpe indulata*. *Ann. ent. Soc. Am.*, 69, 55-58.
- SHAI K.P., KRISHNA S.S. (1981) Influence of adult nutrition on sexual activity and subsequent reproductive programming in the red cotton bug *Dusdercus koenigii*. *J. Adv. Zool.*, 2, 25-31.
- SLANSKY F.Jr. (1980) Effect of food limitation on food consumption and reproductive allocation by adult milk weed bugs *Oncopeltus fasciatus*. *J. Insect Physiol.*, 26, 79-84.
- SPIELMAN A. (1957) The inheritance of autogeny in the *Culex pipens* complex of mosquitoes. *Am. J. Hyg.*, 65, 404-435.
- THOMAS PUNITHAM M., HANIFFA M.A., ARUNACHALAM S. (1986) Effect of mating duration on fecundity and fertility of eggs in *Bombyx mori*. *Entomon.*, 12, 55-58.
- WALDBAUER G.P. (1968) The consumption and utilization of food by insect. *Adv. Insect Physiol.*, 5, 229-288.
- WALKER W.F. (1976) Juvenoid stimulation of egg production in *Oncopeltus fasciatus* on non-host diets. *Env. ent.*, 5, 599-603.
- WALKER W.F. (1978) Mating behaviour in *Oncopeltus fasciatus* (Dallas). Effects of diet, photoperiod, juvenoids and precocene II. *Physiol. Ent.*, 3, 147-155.
- WIGGLESWORTH W.B. (1936) The function of the corpus allatum in the growth and reproduction of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *O. JI. Microsc. Sci.*, 79, 91-121.

EFFET DE LA NUTRITION AU STADE LARVAIRE SUR LE TAUX DE SURVIE, LA CROISSANCE ET LA REPRODUCTION DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L.

M.A. HANIFFA, M. THOMAS PUNITHAM et S. ARUNACHALAM

Research Department of Zoology, St. Xavier's College, Palayankottai 627 002, Tamil Nadu, Inde.

Lorsqu'on diminue le nombre de repas de 8 à 1 par jour, *Bombyx mori* prolonge sa vie larvaire ; cependant la durée de la nymphose reste constante chez tous les groupes. Les groupes qui ont eu un repas par jour présentent une forte mortalité. L'augmentation du nombre de repas accroît le poids larvaire, les taux d'alimentation, d'assimilation, de métabolisme et de conversion ; elle entraîne aussi des valeurs élevées pour le poids, la longueur et le diamètre des cocons. La réduction du nombre de repas provoque un retard dans le démarrage de la ponte et une diminution de la fécondité chez les femelles vierges et les femelles accouplées de *B. mori*. Nous avons enregistré un poids corporel maximum de 3,49 mg chez les larves du 1er âge provenant de parents appartenant au groupe 8 repas par jour, la valeur étant de 2,87 mg pour celles provenant de parents appartenant au groupe 2 repas par jour.

INTRODUCTION

Récemment, plusieurs auteurs ont décrit les effets néfastes des réductions de la durée de la période d'alimentation et/ou de la quantité des rations chez les Lépidoptères (par exemple, Mathavan et Muthukrishnan, 1976 ; Muthukrishnan *et al.*, 1978 ; Pandian *et al.*, 1978) mais la plupart d'entre eux ont accumulé les données bioénergétiques et ont négligé les aspects concernant la reproduction bien que les facteurs nutritionnels interfèrent dans cette fonction (Walker, 1976 ; Slansky, 1980 ; Shahi et Krishna, 1981).

Le fait que le nombre d'oeufs produits dépende de la quantité de nourriture ingérée a été démontré par quelques auteurs chez les Hétéroptères (Khalifa, 1952 ; Slansky, 1980), les Hémiptères (Friend *et al.*, 1965) et les Coléoptères (Ives, 1981) lesquels dépendent plus ou moins de la quantité de nourriture ingérée par l'adulte pour la production d'oeufs. Mais chez les Lépidoptères, qui accumulent des réserves énergétiques au cours de leur période larvaire pour subvenir aux besoins des périodes nymphale et adulte pendant lesquelles ils ne s'alimentent pas et pondent leurs oeufs (autogénie), les travaux similaires sont encore limités. Nous avons donc entrepris cette étude pour examiner le problème de la nutrition larvaire et de l'autogénie chez le ver à soie *Bombyx mori*. De plus nous présentons certaines observations sur la mortalité, la durée des âges larvaires, l'utilisation de la nourriture, la fécondité et la fertilité.

MATERIELS ET METHODES

Des oeufs frais de *B. mori* ont été collectés dans une magnanerie à Nannakaram (Tenkasi, district de Tirunelveli) et acclimatés aux conditions du laboratoire. Après l'éclosion, les larves du 1er âge sont élevées ensemble sur des feuilles de *M. alba*. Au bout d'une semaine, les larves sont pesées une par une et 125 individus sont pris et répartis en cinq groupes de 25 larves chacun. L'expérience a été répétée 5 fois avec 5 groupes. Les larves de la série I ont été nourries à satiété une fois par jour (groupe

1 repas par jour) ; celles des lots II, III, IV et V ont été respectivement nourries 2, 4, 6 et 8 fois par jour (groupes 2, 4, 6 et 8 repas/jour) et les feuilles inutilisées ont été enlevées avant chaque nouveau repas.

Les matières fécales des différents groupes ont été recueillies chaque jour, séparément, et séchées pour obtenir un poids constant après deux jours à 80°C. A partir du poids sec moyen des fèces produits par larve et par jour, nous avons calculé la consommation de nourriture par larve et par jour en suivant la méthode de Mathavan et Pandian (1974), Schroder (1976) et Haniffa *et al.* (1982). Le bilan énergétique est calculé en prenant la formule IBP légèrement modifiée, représentée ainsi : $C = P + R + F + U$, où C est l'énergie consommée, P la croissance, R l'énergie perdue en chaleur par métabolisme, F la nourriture non digérée et U les produits azotés terminaux.

Le poids sec final des larves testées moins le poids sec initial donne la quantité de nourriture convertie. Les taux d'alimentation, d'assimilation et de conversion sont calculés en divisant la quantité respective du poids sec par le produit du poids corporel médian (Waldbauer, 1968) et la durée de l'âge larvaire. Après la formation des cocons, ceux-ci sont pesés et leur longueur et diamètre sont mesurés. Après l'émergence, les mâles et les femelles des différents groupes sont accouplés avec différentes combinaisons pendant une durée optimale de 6 heures (Haniffa *et al.*, 1986 ; Haniffa et Stephen Jose, 1987 ; Thomas Punitham *et al.*, 1986). Chaque femelle accouplée est placée à part pour pondre et on enregistre le nombre d'oeufs pondus par individu. La durée de la période allant de l'émergence de l'adulte au début de la ponte (période avant la ponte) est enregistrée chez chaque femelle. Après la ponte, chaque femelle est pesée et la durée de vie après la ponte est enregistrée à part.

RESULTATS ET DISCUSSION

La mortalité diminue de manière importante avec l'augmentation du nombre de repas (Fig. 1). Quand on donne un repas par jour chez *B. mori*, 57 % des individus testés meurent au cours du stade larvaire et le reste meurt après la nymphose. Le taux de survie des adultes est de 47 % pour le groupe à 2 repas par jour et s'élève à 97 % chez le groupe à 8 repas par jour. On observe en même temps que l'augmentation des repas, une réduction de la durée de la vie larvaire pour tous les âges larvaires. Par exemple, la durée du 2ème âge est de 98 heures chez le groupe à 1 repas par jour et s'abaisse à 72 heures chez le groupe à 8 repas par jour. Les valeurs correspondantes aux 3ème, 4ème et 5ème âges sont respectivement 170 à 117, 192 à 129 et 178 à 127 heures. La période larvaire totale (sans le 1er âge) observée selon les groupes est respectivement de 27, 24, 21, 20 et 19 jours et la durée de la nymphose est la même (10 jours) chez tous les individus testés sans relation avec le nombre de repas fournis (Fig. 2). Mathavan et Muthukrishnan (1976) et Mathavan *et al.* (1987) ont également observé une augmentation de la durée de la vie larvaire et une durée de nymphose constante chez le ver à soie *B. mori* en fonction de la réduction de la durée de la période d'alimentation.

Le Tableau I donne le bilan énergétique chez *B. mori* en fonction du nombre de repas. L'augmentation du nombre de repas favorise les taux d'alimentation (189 à 298 mg/g/jour), d'assimilation (104 à 142 mg/g/jour), de conversion (19 à 36 mg/g/jour), et de métabolisme (86 à 107 mg/g/jour) ; ainsi que le poids (673 à 2 327 mg), la longueur (2,4 à 3,7 cm) et le diamètre (1,1 à 1,9 cm) des cocons (Fig. 3). La Figure 4 donne le poids larvaire en fonction des repas. Le poids larvaire moyen des individus qui ont eu 8 repas par jour passe de 3,3 mg (poids initial) à 2 641 mg à la fin de la période larvaire, alors que ces valeurs sont respectivement de 2 012, 1 428, 1 161 et 770 mg chez les individus à 6, 4, 2 et 1 repas par jour. Samson *et al.* (1980) ont observé l'effet du jeûne de durées différentes à différents âges larvaires chez *B. mori* et ont confirmé que l'augmentation de la période de jeûne a comme résultat une diminution significative du poids larvaire et une augmentation significative de la durée de la vie larvaire.

Le Tableau II donne les valeurs obtenues pour la fécondité. La période avant la ponte est de 14 heures chez les femelles vierges de *B. mori* du groupe 8 repas par jour, alors qu'elle est de 17 heures chez celles du groupe 2 repas par jour. Elle pondent 162 oeufs (groupe 8 repas par jour) et respectivement 145, 112, et 73 oeufs pour les groupes 6, 4 et 2 repas par jour. La durée de vie après la ponte chez les mêmes échantillons baisse de 248 à 122 heures. Le nombre total d'oeufs pondus est le plus élevé (562) chez les paires du groupe 8 repas par jour et le moins élevé (217) chez celles du groupe 2 repas par jour. Alors que l'augmentation des repas augmente la production d'oeufs dans

toutes les combinaisons, la diminution du nombre de repas accroît la durée de la période avant la ponte. Johansson (1958) a également observé que la diminution du temps d'alimentation à 3 heures ou moins par jour chez les femelles vierges de *Oncopeltus fasciatus* provoquait un retard dans la ponte et une diminution de la fécondité par rapport aux individus qui avaient un accès libre à la nourriture (Slansky, 1980). Samson *et al.* (1980) rapportent que le pourcentage d'oeufs pondus et le poids des oeufs diminuent de manière significative consécutivement au jeûne et plus particulièrement chez les larves soumises à un jeûne prolongé. Newmann (1976) a également observé que le jeûne affectait la fécondité des femelles en surnombre. Wigglesworth (1936) a montré que, chez les femelles de l'hétéroptère *Rhodnius prolixus*, les cellules du corpus allatum rétrécissent après un jeûne prolongé et que lorsque l'alimentation reprend, elles gonflent et les organes reproducteurs deviennent actifs. Chez *Oncopeltus* sp. et *Leucophaea* sp. la production d'oeufs est inhibée chez les femelles qui jeûnent et est induite par l'implantation d'un corpus allatum provenant d'une femelle mature sur le plan sexuel (Johansson, 1954, 1955).

On peut suggérer que le nombre d'oeufs et le poids des oeufs sont réduits pour faire face aux changements occasionnés par la restriction alimentaire et qu'il faut donc plus de temps pour accumuler l'énergie et les éléments nutritifs nécessaires à une production similaire en nombre d'oeufs ou en biomasse avec une prise de nourriture moins importante. La diminution de la production d'oeufs chez *B. mori* ne peut être due à l'interruption de la vitellogenèse suivie d'une ovosorption (DeWilde et DeLoof, 1973a,b). Slansky (1980) a également suggéré que le retard et la diminution du taux de la production d'oeufs par couple chez *Oncopeltus fasciatus* quand la nourriture est réduite, fait qu'une forte proportion de la nourriture assimilée est métabolisée pour la survie et que ceci entraîne la faible productivité globale. La productivité globale d'oeufs (nombre d'oeufs/ingestion x 100) (les oeufs ne sont pas pesés car cette manipulation affecte l'éclosion) et/ou de la jeune larve (poids total des larves néonates/ingestion x 100) reste élevée (10,2 et 33,7 %) pour les couples du groupe 6 repas par jour, juste un petit peu moins que pour les couples du groupe 8 repas par jour (10,6 et 36,8 %). Ceci indique que c'est le taux mais non l'efficacité de l'assimilation et de la conversion de la nourriture pour la production d'oeufs qui est réduit et cela entraîne la diminution du taux de production d'oeufs pour les couples des groupes à 2 et 4 repas par jour (Tableau III).

Les facteurs contrôlant l'autogénie sont inconnus chez beaucoup d'espèces d'insectes autogènes bien que l'on connaisse les facteurs nutritionnels de la période larvaire (Robbins et Shortine, 1962 ; Laurence, 1964 ; Lea, 1964 ; Larsen *et al.*, 1966) et la constitution génétique de l'individu (Laven, 1951 ; Spielman, 1957). Engelman (1970) et Calow (1973) ont observé qu'une reproduction normale chez les insectes adultes est un syndrome physiologique avec des interactions nutritionnelles et neuroendocrines et des implications écologiques. Chez plusieurs espèces d'insectes (Engelman, 1970), la copulation est un stimulus qui déclenche les hormones responsables de la vitellogenèse ; d'un autre côté, la nutrition peut agir aussi sur le système endocrine, lequel produit les hormones gonodotrophiques. Pour cette raison, dans notre expérience, la copulation a été maintenue pendant une durée optimale de 6 heures (Thomas Punitham *et al.*, 1986). La limitation de la nourriture (le jeûne complet dans les cas extrêmes) affecte indirectement la mise en route et l'importance de la production d'oeufs en influençant le système neuroendocrine (Ralph, 1976 ; Rankin, 1978) et directement en limitant l'approvisionnement énergétique (Walker, 1976 ; Slansky, 1980).

Le fait que l'éclosion des oeufs soit de 100 % chez les groupes sous-alimentés et diminue jusqu'à 93 % chez les individus les mieux nourris est assez intéressant et inattendu. D'après le Tableau II, il semble que le pourcentage d'éclosion ne soit pas très affecté par le nombre de repas bien que l'on observe une tendance négative. Le poids corporel maximal de 3,49 mg de poids vif pour les larves du 1er âge est observé chez les paires du groupe 8 repas par jour et il descend à 2,87 mg chez les paires du groupe 2 repas par jour. La durée de vie après la ponte diminue également de 223 heures à 123 heures avec la réduction de 8 à 2 repas par jour. Dans notre expérience, la prise de nourriture des paires des groupes avec 4 à 8 repas par jour suffit pour stimuler la mise en route normale de la production d'oeufs avec un déroulement normal mais, chez les paires du groupe 2 repas par jour, cela n'est pas suffisant pour stimuler le déclenchement normal, ni pour obtenir et maintenir un taux normal de la production d'oeufs. Les femelles accouplées de *B. mori* ont pondu plus d'oeufs que les femelles vierges et bien que la fréquence de copulation soit contrôlée par le mâle, les accouplements non-fréquents suffisent pour stimuler une production d'oeufs normale, et les mâles ayant jeûné depuis

l'éclosion restent fertiles. Cette observation chez *B. mori* est en accord avec les rapports antérieurs d'auteurs travaillant sur les insectes (par exemple, Johansson, 1958 ; Gordon et Lohr, 1968 ; Falph, 1976 ; Walker, 1976 ; Walker, 1978 ; Thomas Punitham *et al.*, 1986). Il semble donc que les effets de la limitation de nourriture (diminution du nombre de repas) sur la reproduction chez *B. mori* (prolongation de la période avant la ponte, baisse de la production d'oeufs, etc) sont dûs à l'effet sur la femelle, laquelle, plus que le mâle, a besoin d'une prise de nourriture importante pour démarrer et maintenir la production (Slansky, 1980).

Des auteurs ont observé que chez les insectes, la diminution des rations a des conséquences négatives telles que mortalité élevée, allongement des stades, et diminution du poids corporel final (Muthukrishnan et Delvi, 1974 ; Mathavan et Muthukrishnan, 1976 ; Haniffa et Periasamy, 1981). La plupart des auteurs qui ont rassemblé des données sur l'influence de la quantité de nourriture sur la bio-énergie des Lépidoptères se sont plus intéressés à l'importance des rations qu'au nombre de repas. Lorsque les larves expérimentales sont nourries avec des feuilles dans le laboratoire, les feuilles sèchent en quelques heures et les données obtenues pour le bilan énergétique ne reflètent pas forcément la prise de nourriture réelle. Nous avons donc observé ici le stress nutritionnel à partir du nombre de repas plus que sur la ration. Les analyses de régression et du test "t" de Student ont confirmé que le rationnement de la nourriture influence la survie ($p < 0,05$), la période larvaire ($p < 0,05$), la taille de la chrysalide ($p < 0,01$) et le bilan énergétique de manière significative (Fig. 5 et 6). L'analyse de variance montre que le moment et le nombre des repas affectent de manière significative le poids corporel de *B. mori* ($p < 0,01$; Tableau IV). Les données présentées ici sur la restriction de nourriture confirment aussi l'hypothèse d'une interaction réciproque entre l'ingestion des éléments nutritifs et la production d'oeufs (Engelman, 1970 ; DeWilde et DeLoof, 1973a,b ; Walker, 1976 ; Slansky, 1980).

**NEW RECORD OF A PUPAL PARASITE *BRACHYMERIA*
ATRIDENS (WATERSTON) FROM TACHINID PARASITE OF
ANTHERAEA PROYLEI JOLLY (LEPIDOPTERA : SATURNIDAE)**

K.B. RAJPUT and B.L. TIKOO

Regional Tasar Research Station, Imphal, Manipur, 795002, India.

Keywords: Pupal parasite, tachinid parasite

Genus *Brachymeria* of the family Chalcididae includes a number of species which serve as natural enemies of certain Lepidopteran pests e.g. *Brachymeria ovata ovata* for *Archips argyrospilus*, *Heliothis zea*, *Colias eurytheme*, *Thyridopteryx ephemeraeformis* and *Grapholitha molesta*; *B. intermedia* for *A. argyrospilus* (Davidson and Lyon, 1978) and *B. criculae* for *Metanastria hyrtaca* (Joshi *et al.*, 1982). Several hosts of Brachymerians from Oriental region were also reported by Joy and Joseph (1972, 1973), Joy *et al.* (1973), Joseph *et al.* (1973) and Narendran and Joseph (1975, 1976). The information about Tachinid host of *Brachymeria* are scarce.

During the present study *Brachymeria atridens* (Waterston) (Chalcididae : Hymenoptera) has been recorded for the first time as pupal parasite of *Exorista sorbillans* Wiedemann, a notorious pest of oak-tasar silk worm *Antheraea proylei* Jolly from Manipur. The number of emerging parasites from the infected fly pupae were noted to be one from each pupae. Nothing is known about the biology of the chalcid parasite.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Dr. T.C. Narendran, Department of Zoology, University of Calicut, Kerala, India, for confirmation of the identity of the chalcid parasite.

REFERENCES

- DAVIDSON R.H., LYON W.F., (1978), Insect pests of Farm, Garden and Orchard. John Wiley & Sons, New York, xi, 596.
- JOSEPH K.J., NARENRAN T.C., JOY P.J. (1973), Oriental *Brachymeria* (Hymenoptera: Chalcididae). Zoological Monograph N° 1, Department of Zoology, University of Calicut, 1-119.
- JOSHI R.C. RAO P.K., RAO B.H.K., (1982), New record of a chalcid pupal parasite *Brachymeria* (*Matsumurameria*) *criculae* (Kohl) on *Metanastria hyrtaca* Cr. (Lasiocampidae : Lepidoptera). Entomon., 7 (4), 499.
- JOY P.J., JOSEPH K.J., (1972), Notes on a new host record of *Brachymeria excarinata* Gahan and first record of *Brachymeria* (= *Neobrachymeria*) *nosatoi* Habu (Hymenoptera : Chalcididae) in India. Indian J. agric. Sci., 42(7), 637-638.
- JOY P.J., JOSEPH K.J., (1973), Notes on the biology of *Brachymeria* (= *Neobrachymeria*) *nosatoi* Habu and its importance in the control of *Nephantis serinopa*. Entomophaga, 18(3), 317-319.
- JOY P.J., NARENRAN T.C., JOSEPH K.J., (1973), New records of *Brachymeria lasus* (Walker) and *B. excarinata* Gahan as pupal parasite of *Nephantis serinopa* (Myer), the black headed caterpillar pest of coconut in south India. Indian J. Ent., 35 (1), 69-70.
- NARENRAN T.C. JOSEPH K.J., (1975), New records and new host records of some *Brachymeria* species (Hymenoptera : Chalcididae). Agri. Res. J. Kerala, 13, 70-73.
- NARENRAN T.C. JOSEPH K.J. (1976), New host records for the Chalcid parasite *Brachymeria lasus* (Walker) (Hymenoptera : Chalcididae). Agric. Res. J. Kerala 14 (1), 81-82.

**OBSERVATION NOUVELLE DE *BRACHYMERIA ATRIDENS*
(WATERSTON) COMME PARASITE DE LA PUPE DU
TACHINIDE PARASITE D'*ANTHERAEA PROYLEI* JOLLY
(LEPIDOPTERA : SATURNIDAE)**

K.B. RAJPUT et B.L. TIKOO

Regional Tasar Research Station, Imphal, Manipur, 795002, Inde.

Le genre *Brachymeria* de la famille des Chalcidae comprend un certain nombre d'espèces qui sont des ennemis naturels de certains parasites de lépidoptères, par exemple : *Brachymeria ovata* pour *Archips argyrospilus*, *Heliothis zea*, *Colias eurytheme*, *Thyridopteryx ephemeraeformis* et *Grapholitha molesta* ; *B. intermedia* pour *A. argyrospilus* (Davidson et Lyon, 1978) et *B. criculae* pour *Metanastria hyrtaca* (Joshi *et al.*, 1982). Plusieurs hôtes des Brachymériens des régions orientales ont également été enregistrés par Joy et Joseph (1972, 1973), Joy *et al.* (1973) et Narendran et Joseph (1975, 1976). Les informations concernant l'hôte tachinidé de *Brachymeria* sont rares.

Dans cette étude, *Brachymeria atridens* (Waterston) (Chalcidae : Hymenoptera) a été identifié pour la première fois comme parasite de la puppe d'*Exorista sorbillans* Wiedmann, un parasite très connu du ver à soie du chêne *Antheraea proylei* Jolly de Manipur. On a noté qu'il émergeait un parasite de chaque puppe infectée. On ne sait rien de la biologie des parasites chalcides.

REVUE SIGNALÉTIQUE

BIBLIOGRAPHY

INDICATIFS DES LANGUES UTILISÉES LANGUAGE SYMBOLS USED

(Bg) Bulgare, Bulgarian.

(D) Allemand, German.

(F) Français, French.

(K) Coréen, Korean.

(Pt) Portuguais, Portuguese.

(Ro) Roumain, Rumanian.

(C) Chinois, Chinese.

(E) Anglais, English.

(J) Japonais, Japanese.

(Pl) Polonais, Polish.

(R) Russe, Russian

(S) Espagnol, Spanish.

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

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

Sériciculture générale

General sericulture

Indonesian silk: expected to come to the fore.

Soie indonésienne : attendue sur le devant de la scène.

An.

1988 Business News, 18th November 1988.

Recent situation of overseas sericultural researches.

Situation des recherches séricicoles dans le monde.

An.

Committee for overseas sericultural information, Japanese Society of Sericulture Science.

1987 J. Seric. Sci. Jpn., 56(3), 177-195. (J)

Central Silk Board Annual report : 1987-88.

Rapport annuel du Central Silk Board : 1987-88.

An.

Central Silk Board, 39 Mahatma Gandhi Road, Bangalore 560 001, INDIA.

1988 C.S.B., Bangalore, 43 p.

Recent situation of overseas sericultural researches.

Mise à jour des recherches séricicoles menées dans le cadre de la coopération.

An.

Japanese Society of Sericulture Science, Fac. of Agriculture, Univ. of Tokyo, JAPAN.

1987 J. Seric. Sci. Jpn., 56, 177-195. (J)

Proceedings. Seminar on prospect of mulberry sericulture in the Eastern region of India.

Actes du Séminaire sur les perspectives de la sériciculture mûrier dans l'est de l'Inde.

An.

C.S.R.&T.I., Berhampore, West Bengal, INDIA.

1987 C.S.R.T.I., Central Silk Board, 5-6 May 87.

A brief report on the present status of Indian sericulture, its silk production and exports.

Bref compte-rendu de la situation actuelle de la sériciculture en Inde, de la production et des exportations de soie.

An.

Central Silk Board, 39, M.G. Road, Bangalore 560 001, INDIA.

1988 ISA/AIS Congress, Krefeld, sept. 88. (E)

Proceedings of seminar on prospects of mulberry sericulture in Eastern India.

Comptes-rendus du séminaire sur les perspectives de la sériciculture mûrier dans l'Est de l'Inde.
An.

Central Silk Board, 39 M. Gandhi Rd, Bangalore 560 001, INDIA.

1987 Central Silk Board, Berhampore, India, 5-6 May 1987.

Brazilian sericulture.

Sériciculture brésilienne.

An.

Associação brasileira de fiaveiros de seda, R. R. Simonsen, 62, CEP 01017, SAO PAULO, BRAZIL

1988 ISA/AIS Congress, Krefeld, sept. 88. (E)

Proceedings of first international congress on tropical sericulture practices.

Comptes-rendus du premier congrès international sur les pratiques séricicoles en zone tropicale.
An.

Central Silk Board, 39 M. Gandhi Rd, Bangalore 560 001, INDIA.

1988 Central Silk Board, Bangalore, Inde, 18-23 Feb. 1988.

Silk : a survey of international trends in production and trade.

Soie : rapport sur les tendances internationales de la production et du marché.

An.

Internat. Trade Center, Place des Nations, 1211 Geneva 10, SWITZERLAND.

1988 International Trade Center UNCTAD/GATT, Geneva, 54 p.

L'economia dell'allevamento del baco da seta.

Economics of silkworm rearing. (Economie de la sériciculture.)

CAPPELLOZZA L.

Istituto Sperimentale per la Zoologia agraria, Padova, ITALY.

1988 Terra e Sole, 547, 196-203. (I)

Jedwabnictwo w szkole rolniczej.

Sericulture taught at agricultural school./La sériciculture au lycée agricole.

FRENTZEL J., KRZECZKO A.

W.P.O.S.W.iS., Oddział Jedwabnictwa, ul. Brzozowa 3, 05 822 Milanówek, POLAND.

1987 W.P.O.S.W.iS., 110 p. (Pl)

Jedwabnictwo w szkole rolniczej : poradnik dla nauczycieli.

Sériciculture dans l'enseignement agricole : manuel de l'enseignant/ Sericulture in agricultural school: handbook for the teacher.

FRENTZEL J., KRZECZKO A.

1987 Milanówek. 108 p. (Pl)

The story of silkworm guts in the Nilgiri Hills.

Histoire du "crin de Florence" dans les montagnes de Nilgiri.

SATYANARAYANA RAJU Ch.

1988 CSR&TI Newsletter, 3(2), 2. (E)

USSR and sericulture.

L'U.R.S.S. et la sériciculture.

SENGUPTA K., CHATTERJEE S.N.

1988 CSR&TI Newsletter, 3(2), 3-5. (E)

Development of sericulture in Taihu Lake region.

Développement de la sériciculture dans la région du Lac de Taihu.

SHUAI J., et al.

1988 Canye Kexue, 14(3), 159. (C,e)

Sericulture in Gujarat State.

Sériciculture dans l'Etat du Gujarat.

TEWARI S.K.

1988 CSR&TI Newsletter, 3(2), 6-7. (E)

Mulberry sericulture gets established in Kerala.

La sériciculture mûrier est implantée au Kérala.

VENU GOPALA PILLAI S.

1988 CSR&TI Newsletter, 3(2), 2,6. (E)

Jedwab naturalny.

Soie naturelle/ Natural silk.

ZULAWSKA Z.

Instytut Krajowych Włókien Naturalnych, 05 807 Podkowa Lesna, POLAND.

1988 Milanówek, 84 p. (Pl)

Mûrier

Mulberry

DNA melting temperature and nucleotide constituents of diploidal and polyploidal mulberry.
Température de fusion de l'ADN et constituants nucléotidiques des mûriers diploïde et polyploïde.
AKHUNDOVA E.M.

1987 *Dokl. Akad. Nauk. Az. SSR*, 43(3), 58-61. (R)

Response of Japanese mulberry varieties propagated through cuttings under Kashmir eco-climate.

Réponse des variétés de mûrier japonaises multipliées par bouturage dans les conditions éco-climatiques du Cachemire.

BINDROO B.B., TIKU A.K., PANDIT R.K.

Div. of Sericulture, Mirgund, S.K. Univ. of Agric. Sci., Srinagar 190 001, INDIA.

1988 *Geobios new Reports*, 7, 36-39. (E)

Osservazioni sul comportamento bio-etologico di *Pseudodendrothrips mori* (Niwa) (Thysanoptera Terebrantia) in alcune zone d'Italia.

Studies on bio-etological behaviour of *Pseudodendrothrips mori* (Niwa) in several areas of Italy.

Etude du comportement bio-étologique de *P. mori* (Niwa) dans plusieurs régions d'Italie.

CAPPELLOZZA L., MIOTTO F.

Istituto Sperimentale per la Zoologia agraria, Firenze, ITALY.

1987 *Redia*, 70, 523-533. (I)

Supervision on fluoride contained in spring mulberry leaves and prediction of its content with computer.

Suivi du fluorure contenu dans les feuilles du mûrier au printemps et prédiction du contenu par ordinateur.

CHEN Q., et al.

1988 *Canye Kexue*, 14(3), 180. (C)

Ifantria : biologica, danni e metodi di lotta.

Hyphantria: biology, damages and control methods. (Hyphantria : biologie, dégâts et méthodes de lutte.)

FERRARI R., TREVISAN M.

Istituto per la Zoologia agraria, Firenze, ITALY.

1988 *Terra e Sole*, 551/552, 497-500. (I)

Specific and cultural differences in division of cells in culture of mulberry mesophyll protoplasts.

Différences spécifiques et culturelles dans la division des cellules en culture de protoplastes du mésophylle du mûrier.

KATAGIRI K.

1988 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 57(5), 445-446. (J)

Detection of mulberry trees by using ultrasonic sensor.

Détection des plants de mûrier par ultrason.

KOBAYASHI T., OHURA M.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, JAPAN.

1988 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 57(4), 304-312. (J,e)

Modification of flower sex and acid phosphatase activity by phtalimides in female plants of *Morus nigra*.

Modification du sexe de la fleur et de l'activité phosphatase acide par des phtalimides chez les plants femelles de *Morus nigra*.

LAL M., JAISWAL V.S.

1988 *Plant Growth Regul.*, 7(1), 29-37. (E)

A list of mulberry diseases in Shandong Province.

Liste des maladies du mûrier présentes dans la province de Shandong.

LI S.

1988 *Canye Kexue*, 14(2), 97. (C)

Prospects of commercial growth promoters and micronutrient formulations in mulberry.

Perspectives de commercialisation de promoteurs de croissance et de formules d'éléments micronutritifs pour le mûrier.

MISHRA R.K., CHOUDHURY P.C., GHOSH A.

Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, INDIA.

1988 *CSR&TI Newsletter*, 3(2), 8. (E)

Le pêcher et la cochenille blanche du mûrier en Roussillon, *Pseudaulacaspis pentagona*.

Peach tree and mulberry white scale, *Pseudaulacaspis pentagona*, in Roussillon area (Southern France).

NICOLAS J.

1988 *Roussillon agricole*, 126, 194-206. (F)

Components of mulberry root skin. Antihypertensive and tumor promoter-inhibiting components.

Composants de la peau de la racine du mûrier. Composants antihypertensifs et inhibiteurs de promoteurs de tumeurs.

NOMURA T.

1988 *Kagaku to Yokugaku no Kyoshitsu*, 2, 25-32. (J)

Occurence of *Holotrichia serrata* on mulberry and its control.

Présence de *Holotrichia serrata* sur le mûrier et méthodes de lutte.

SARATHCHANDRA B.

Regional Sericultural Research Station, Kodathi, Bangalore, INDIA.

1988 *CSR&TI Newsletter*, 3(3), 6. (E)

Polyploidization and modification of sex in mulberry by colchicine.

Polyploïdisation et modification sexuelle chez le mûrier par la colchicine.

SIKDAR A.K., JOLLY M.S., DWIVEDI N.K.

1988 *Curr. Sci.*, 21(4), 736-737. (E)

Technology for intercropping in mulberry.

Technique de culture intercalaire sous le mûrier.

SINHA A.C., SARKAR A., DAS B.C.

C.S.R.&T.I., Berhampore, West Bengal, INDIA.

1987 *Indian Farming*, 36(11), 11-12. (E)

Preliminary report on breeding the new mulberry variety "Yu-71-1".

Rapport préliminaire sur la sélection d'une nouvelle variété de mûrier, "Yu-71-1".

SUN X., et al.

1988 *Canye Kexue*, 14(2), 55. (C)

L'allevamento del baco da seta ha un nuovo nemico.

Sericulture has a new enemy. (La sériciculture a un nouvel ennemi.) (H. cunea)

TREVISAN M.

Istituto per la Zoologia agraria, Padova, ITALY.

1988 *Veneto Agricoltura*, 4(8/9), 29-31. (I)

Chlorophyll content in different mulberry biotypes.

Contenu en chlorophylle chez différents biotypes du mûrier.

VENKATESWARLU M., PADMA M.N.

Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, INDIA.

1988 *CSR&TI Newsletter*, 3(3), 6. (E)

Studies on Rogas japonicus Ashmead.

Etudes sur Rogas japonicus Ashmead.

WU F., et al.

1988 *Canye Kexue*, 14(3), 124. (C)

Chemical forms of heavy metals in polluted mulberry and paddy field soils.

Formes chimiques des métaux lourds dans les sols pollués de mûraies et de rizières.

XIAN X., HOMMA S., KUNO K.

Fac. of Agriculture, Tokyo Univ. of Agriculture & Technology, Fuchu, Tokyo 183, JAPAN.

1988 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 57(5), 379-387. (J,e)

Chilling requirements in the breaking of dormancy in winter buds of four mulberry varieties.

Besoins en froid pour arrêter la dormance chez les bourgeons d'hiver de quatre variétés de mûrier.

YAHIRO M., SHINJO T., TASHIRO K.

Fac. of Agriculture, University of Kagoshima, Kagoshima 890, JAPAN.

1988 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 57(4), 284-288. (J,e)

Relationship between the growth of axillary buds and the cytokinins content in mulberry branches after pruning.

Relation entre la croissance des bourgeons axillaires et le contenu en cytoquinines chez les branches du mûrier après la taille;

YANAGISAWA Y., SHIOIRI H., TAKAHASHI M.

Fac. of Textile Science & Technology, Shinshu University, Ueda 386, JAPAN.

1988 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 57(4), 323-327. (J,e)

Studies on mulberry branch blight disease.

Etudes sur la maladie de flétrissure des branches du mûrier.

ZHANG Y.

1988 *Canye Kexue*, 14(3), 117. (C)

MULBERRY

Cultivation for high yield mulberry crop on the earth dyke in the mountainous districts in North Henan Province.

Culture de mûriers à haut rendement sur les digues en terre dans les districts montagneux du nord de la province du Henan.

ZONG Y., et al.

1988 *Canye Kexue*, 14(3), 175. (C)

B. mori : élevage, nutrition, pathologie

B. mori : rearing, feeding, pathology

Purification of cytoplasmic polyhedrosis virus - Suzhou nuclear polyhedra forming strain of silkworm (*Bombyx mori*).

Purification du virus de la polyédrose cytoplasmique -souche formant des polyèdres nucléaires de Suzhou chez le ver à soie (*Bombyx mori*).

CHEN C., et al.

1988 *Canye Kexue*, 14(3), 150. (C,e)

Production of monoclonal antibodies to pebrine protozoa of domestic silkworm and their application.

Production d'anticorps monoclonaux pour le protozoaire de la pébrine du ver à soie domestique et leur application.

CHEN J., et al.

1988 *Canye Kexue*, 14(3), 168. (C)

Phagia of the silkworm to leaves of *Adenophora tracheloides*.

Appétit du ver à soie pour les feuilles de *Adenophora tracheloides*.

CUI Z., et al.

1988 *Canye Kexue*, 14(2), 114. (C)

Controllo di *Hyphantria cunea* e riflessi su allevamenti di *Bombyx mori*.

Control of *Hyphantria cunea* and influence on *Bombyx mori* rearing. (Contrôle de *Hyphantria cunea* et effet sur l'élevage de *Bombyx mori*.)

FERRARI R., TREVISAN M.

Istituto Sperimentale per la Zoologia agraria, Firenze, ITALY.

1987 *Informatore fitopatologico*, 37(10), 55-58. (I)

Wychow jedwabnikow morwowych.

Mulberry silkworm rearing./Elevage du ver à soie du mûrier.

FRENTZEL J.

W.P.O.S.W. i S., Oddzial Jedwabnictwa, 05 822 Milanówek, ul. Brzozowa 3, POLAND.

1986 *Warszawskie Przedsiębiorstwo Obrotu Surowcami Włókienniczymi i Skorzanymi*, 200p.

Simple device for incubation of silkworm eggs on a large scale.

Dispositif simple pour l'incubation des oeufs de ver à soie à grande échelle.

GEETHA DEVI, GANGADHAR, HIMANTHARAJ, VINDHYA

Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, INDIA.

1988 *CSR&TI Newsletter*, 3(3), 7. (E)

Breeding of *Cordyceps militaris* (L.) Link by use of oak/mulberry silkworms.

Elevage de *Cordyceps militaris* (L.) Link en utilisant des vers à soie du chêne ou du mûrier.

GU H., et al.

1988 *Canye Kexue*, 14(2), 108. (C)

Studies on the law of occurrence of cytoplasmic polyhedrosis of the silkworm, *Bombyx mori*. 4.

Investigation on pathogenic existence, distribution and living ability.

Etudes sur la fréquence d'apparition de la polyédrose cytoplasmique du ver à soie *Bombyx mori*. 4.

Recherche de l'existence du pathogène, de sa distribution et de sa survie.

HUANG K., et al.

1988 *Canye Kexue*, 14(2), 87. (C)

Studies on the law of occurrence of cytoplasmic polyhedrosis of the silkworm, *Bombyx mori* L.

5. Effects of CPB concentration and virulence in the course of infection, the time of disease occurrence and infectivity for mixed rearing.

Etudes sur la loi d'apparition de la polyédrose cytoplasmique chez le ver à soie *B. mori*. 5. Effets de la concentration de CPB et la virulence pendant l'infection, au moment de l'apparition de la maladie et infectivité pendant l'élevage.

HUANG K., et al.

1988 *Canye Kexue*, 14(3), 141. (C)

Studies on occurrence and control of *Mimastra cyanura* Hope.

Etudes de la fréquence d'apparition et de la lutte contre *Mimastra cyanura* Hope;

JIANG Y., et al.

1988 *Canye Kexue*, 14(2), 112. (C)

A study of temperature, feeding allowance and feeding area on rearing silkworms during the fourth and fifth instar and on spinning cocoons. 2) Feeding silkworms under summer and autumn conditions.

Etude de la température, de la quantité de nourriture et de la surface d'élevage pour l'élevage des vers à soie aux 4ème et 5ème âges et à la montée. 2) Nourrissage des vers à soie en été et en automne.

KARAIVANOV S.

Experimental and Control Station of Sericulture, Harmanli, BULGARIA.

1988 *Animal Science*, 25(7), 91-98. (Bg, e)

Development of automatic mulberry-shoot feeder using programable controller.

Développement d'un approvisionneur automatique en rameaux de mûrier avec contrôle programmé.

KOBAYASHI T., ISHIKAWA Y.

1988 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 57(4), 349-350. (J)

Feeding young silkworms with unchopped mulberry leaves in stereo-rearing seats.

Nourrissage des jeunes vers à soie avec des feuilles de mûrier entières.

LI Y., et al.

1988 *Canye Kexue*, 14(3), 164. (C)

Studies on the physicochemical characteristics of the silkworm densovirus in Guangdong province.

Etude des caractères physicochimiques du virus de la denosnucléose du ver à soie dans la province de Guangdong.

LIAO S., et al.

1988 *Canye Kexue*, 14(2), 83. (C)

Study on fast distinguishing *N. bombycis* by SPA coagglutination.

Distinction rapide de *N. bombycis* par coagglutination SPA.

MEI L., et al.

1988 *Canye Kexue*, 14(2), 110. (C)

Biological control of uzi menace.

Lutte biologique contre la mouche ouzi.

PRADIP KUMAR, ANAND KUMAR, RAM KISHORE

Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, INDIA.

1988 *CSR&TI Newsletter*, 3(2), 8. (E)

Observations on life cycle and ecological environment of *Gampsocleis* sp.

Observations sur le cycle et l'environnement écologique de *Gampsocleis* sp.

QU T., et al.

1988 *Canye Kexue*, 14(3), 171. (C)

Feeding the silkworm for two times using artificial diet during entire larval stages.

Nourrissage du ver à soie avec deux repas par jour sur aliment artificiel pendant la totalité de la période larvaire.

SANG Q., et al.

1988 *Canye Kexue*, 14(2), 60. (C,e)

Measurements of digestibility of feedstuffs for artificial diets of the silkworm, *Bombyx mori*.

Mesure de la digestibilité des composants des aliments artificiels pour le ver à soie *Bombyx mori*.

SHIMOGORI Y., URANO M.

1988 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 57(5), 388-392. (J)

Influence of body weights and temperature on digestibility of artificial diets of the silkworm, *Bombyx mori*.

Influence du poids corporel et de la température sur la digestibilité des aliments artificiels chez le ver à soie *Bombyx mori*.

SHIMOGORI Y., URANO M.

1988 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 57(4), 298-303. (J)

Digestive crude proteins and metabolic energy contents in feedstuffs for artificial diets of the silkworm, *Bombyx mori*.

Contenu en protéines brutes digestibles et énergie métabolique dans les composants des aliments artificiels pour le ver à soie *Bombyx mori*.

SHIMOGORI Y., URANO M.

1988 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 57(5), 393-397. (J)

Studies on the technology of artificial diet rearing for parental strains of the silkworm. 1. A search for an optimum feeding amount of diets with special regard to the maximum egg production.

Etude des techniques d'élevage sur aliment artificiel des souches parentales de ver à soie. 1. Recherche d'une quantité de nourriture optimum en vue d'obtenir une production d'oeufs maximale.

TANAKA Y.

Institute of Silkworm Genetics and Breeding, JAPAN.

1988 *Reports Silk Sci. Res. Inst. Jpn.*, 36, 1-9. (J,e)

Analysis of structural proteins of the nuclear polyhedrosis virus of Bombyx mori by Western blotting.

Analyse des protéines structurales du virus de la polyédrose nucléaire de Bombyx mori par blavardage Western.

TANIAI K., INOUE H.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, JAPAN.

1988 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 57(4), 265-269. (J,e)

Comparative observation on pathological changes of DNV and IFV in the midgut of Bombyx mori by using PAP.

Observation comparative des changements pathologiques du DNV et de l'IFV chez l'appareil digestif de Bombyx mori par PAP.

WANG Y., et al.

1988 *Canye Kexue*, 14(3), 146. (C)

Mulberry pyralid, Glyphodes pyloalis : habitual host of non occluded viruses pathogenic to the silkworm Bombyx mori.

La pyrale du mûrier, Glyphodes pyloalis : hôte habituel de virus non occlus pathogènes du ver à soie Bombyx mori.

WATANABE H., KURIHARA Y., WANG Y.

1988 *J. Invert. Pathol.*, 52, 401.

Experiments on mulberry leaves for young silkworm rearing.

Expériences sur les feuilles de mûrier pour l'élevage des jeunes vers à soie.

ZHANG X.

1988 *Canye Kexue*, 14(3), 178. (C)

Studies on pathogenesis of Pacecilomyces fumosa-roseus (Wize) Brown et Smith and Cephalosporium lecanii Zimmerman in Bombyx mori.

Etudes de la pathogenèse de Pacecilomyces fumosa-roseus (Wize) Brown et Smith et de Cephalosporium lecanii Zimmerman chez Bombyx mori.

ZHU Z., et al.

1988 *Canye Kexue*, 14(2), 78. (C)

Séricigènes non-mûrier : élevage, nutrition, pathologie

Non-mulberry silkworms : rearing, feeding, pathology

Acid phosphatase activity in the ovary of the eri silkworm *Philosamia ricini* - a histochemical study.

Activité phosphatase acide chez l'ovaire du ver à soie eri *Philosamia ricini* - étude histochimique.

HURKADLI H.K., HOOLI M.A., NADKARNI V.B.

1987 *Entomon.*, 12(3), 251-254. (E)

A method of egg raising in the wild silkmoth, *Antheraea yamamai*, with wing-cut adults in a net cage.

Une méthode de production d'oeufs chez le ver à soie sauvage *Antheraea yamamai*, utilisant des adultes aux ailes coupées dans une cage.

TAN E., FUJISAWA T., SUZUKI K.

1988 *J. Seric. sci. Jpn.*, 57(4), 351. (J)

Studies on the protection and morphological features of reproductive cocoons of oak silkworm (*Antheraea pernyi*) for summer-autumn rearing in cold storage.

Etudes sur la protection et les composantes morphologiques des cocons du ver à soie *Antheraea pernyi* destinés à la reproduction pour l'élevage d'été-automne conservés au froid.

TONG X., et al.

1988 *Canye Kexue*, 14(3), 173. (C)

Circular dichroism analysis of chorionins of *Antheraea pernyi* and *Dictyoploca japonica*.

Analyse du dichroïsme circulaire des chorionines de *Antheraea pernyi* et *Dictyoploca japonica*.

XIA B., et al.

1988 *Canye Kexue*, 14(3), 166. (C)

Vers à soie : génétique

Silkworms : genetics

Studies on the fluorescent colours of silkworm cocoons. I. Fluorescent colours of different varieties of cocoons.

Etudes sur les couleurs fluorescentes des cocons de ver à soie. I. Couleurs fluorescentes de différentes variétés de cocons.

CHEN K., et al.

1988 *Canye Kexue*, 14(2), 72. (C)

Linkage studies on the "glossy" mutant of *Bombyx mori*.

Etudes de linkage sur le mutant "brillant" de *Bombyx mori*.

DOIRA H., KIHARA H., MASUDA S.

Fac. of Agriculture, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812, JAPAN.

1988 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 57(4), 318-322. (J,e)

The detection of mosaics and polyploids in a hereditary mosaic strain of the silkworm, *Bombyx mori*, using egg colour mutants.

Détection de mosaïques et de polyplôides chez une souche mosaïque héréditaire du ver à soie *Bombyx mori* en utilisant des mutants avec œuf coloré.

EBINUMA H., KOBAYASHI M., KOBAYASHI J., SHIMADA T., YOSHITAKE N.

1988 *Genetical Research*, 51, 223. (E)

Comparative studies on the rDNA of the silkworm, *Bombyx mori* and its presumed ancestor.

Etudes comparatives sur l'ADNr du ver à soie *Bombyx mori* et de son ancêtre présumé.

FUJIWARA H., MAEKAWA H., NINAKI O., TAKADA N., MIYAJIMA N., ISHIKAWA H.

Biology Dpt, College of Arts & Sci., Univ. of Tokyo, Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153, JAPAN.

1987 *Comp. Biochem. Physiol.*, 88B(3), 761-766. (E)

Genetic research on cocoon shell sericin percent of silkworm, *Bombyx mori*.

Recherche génétique sur le pourcentage de séricine dans la coque soyeuse chez le ver à soie *Bombyx mori*.

HUANG L.

1988 *Canye Kexue*, 14(2), 68. (C,e)

The egg size determining gene, Esd, is a unique morphological marker on the W chromosome of Bombyx mori.

Le gène déterminant la taille de l'oeuf, Esd, est un marqueur morphologique unique situé sur le chromosome W de Bombyx mori.

KAWAMURA N.

Lab. of Sericology, Fac. of Agriculture, Hokkaido University, Hokkaido 060, JAPAN.

1988 Genetica, 76, 195-201. (E)

Preliminary research on fluorescent colours of cocoons in the sexually limited silkworm, Bombyx mori.

Etude préliminaire sur les couleurs fluorescentes des cocons chez une souche de ver à soie Bombyx mori marquée en fonction du sexe.

LIU J., et al.

1988 Canye Kexue, 14(2), 107. (C)

On the breeding and characteristics of a silkworm hybrid, "Honen x Kenpaku" for summer and autumn rearing.

Sélection et caractéristiques d'un hybride du ver à soie, "Honen x Kenpaku" pour l'élevage d'été et d'automne.

MIDORIKAWA E., YOKOZUKA S.

Institute of Silkworm Genetics and Breeding, JAPAN.

1988 Reports Silk Sci. Res. Inst. Jpn., 36, 27-40. (J)

Synthesis of a balanced sex-linked lethal strain in the silkworm.

Synthèse d'une souche létale liée au sexe balancée ver à soie.

OHNUMA A.

Institute of Silkworm Genetics and Breeding, JAPAN.

1988 Reports Silk Sci. Res. Inst. Jpn., 36, 17-25. (J,e)

Predictive model for F1 measure of domestic silkworm. I. Proposition and verification of the model.

Modèle prédictif pour l'évaluation des F1 chez le ver à soie domestique. I. Proposition et vérification du modèle.

PAN S., et al.

1988 Canye Kexue, 14(3), 133. (C)

Studies on the nonsusceptibility of Bombyx mori to densovirus (strain of Zhenjiang, China) by using linkage analysis.

Etudes sur la résistance de Bombyx mori au virus de la denso-nucléose (souche de Zhenjiang, Chine) par analyse de linkage.

QIN J., et al.

1988 Canye Kexue, 14(3), 129. (C,e)

Further studies on non-preference mutations in the silkworm. 7. Selective ingestion of artificial diet observed for strains having positive or null modifiers of non-preference mutation.

Etudes sur les mutations non-préférentielles chez le ver à soie. 7. Ingestion sélective de l'aliment artificiel observée chez les souches avec modificateurs positifs ou nuls de mutation non préférentielle.

TAZIMA Y., OHNUMA A., TANAKA Y.

Institute of Silkworm Genetics and Breeding, JAPAN.

1988 Reports Silk Sci. Res. Inst. Jpn., 36, 11-16. (J,e)

Studies on the chromosome engineering and its application in Bombyx mori L. 2. Induction of androgenetic silkworm.

Etudes de l'ingénierie chromosomique et de ses applications chez Bombyx mori L. 2. Induction d'un ver à soie androgénétique.

XU A., et al.

1988 Canye Kexue, 14(2), 93. (C,e)

Breeding and selection of polyhybrids of the silkworm by using of double cross test.

Sélection de polyhybrides du ver à soie par le test de croisement double.

ZHANG P., et al.

1988 Canye Kexue, 14(2), 64. (C)

Vers à soie : physiologie, biochimie

Silkworms : physiology, biochemistry

Induction of spinning from JH-treated eternal larvae of *Bombyx mori* by ecdysteroid administration.

Induction du filage par administration d'ecdystéroïdes chez les larves éternelles de *Bombyx mori* traitées par la JH.

AKAI H., TAKABAYASHI K., KIUCHI M.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, JAPAN.

1988 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 57(4), 341-344. (E)

Syntheses and NMR analyses of 8 geometrical isomers of 10,12,14-hexadecatrienyl acetate, sex-pheromone candidates of the mulberry pyralid.

Synthèse et analyse au NMR de 8 isomères géométriques de 10,12,14-hexadécatriénylacétate, phéromones sexuelles possibles de la pyrale du mûrier.

ANDO T., OGURA Y., KOYAMA M., KURANE M., UCHIYAMA M., SEOL Y.

1988 *Agr. Biol. Chem.*, 52, 2459.

¹³C and ³¹P NMR studies on sugar metabolism in *B. mori* and *P. cynthia ricini* larvae.

Etudes au NMR ¹³C et ³¹P du métabolisme des sucres chez les larves de *Bombyx mori* et *P. cynthia ricini*.

ASKURA T., KAWAGUCHI Y., DEMURA M., OSANAI M.

1988 *Insect Biochem.*, 18, 531.

Measured behavioural latency in response to sex pheromone loss in the large silkmoth *Antheraea polyphemus*.

Mesure du comportement de latence en réponse à la perte de phéromone sexuelle chez le grand papillon *Antheraea polyphemus*.

BAKER J.C., VOGT R.G.

1988 *J. Exp. Biol.*, 137, 29.

Effects of dimecron on the growth rate, molting time, spinning ability and egg-laying capacity of the silkworm *Bombyx mori*.

Effets du dimécron sur le taux de croissance, le moment de la mue, le filage et la ponte chez le ver à soie *Bombyx mori*.

BAKTHAVATHSALAM R., MUTHUKUMARAN A., BALASUBRAMANIAN V.

1988 *Environ. Ecol.*, 6(1), 73-78. (E)

Ultrastructural changes of corpus allatum in the imaginal stages in the silkworm, *Bombyx mori*.
 Changements de l'ultrastructure du corpus allatum aux stades imaginaux chez le ver à soie *Bombyx mori*.

BANNO Y., AKAI H.

Fac. of Agriculture, Kyushu Univ., Higashi-ku, Fukuoka 812, JAPAN.

1988 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 57(5), 431-437. (J,e)

Programmed cell death: cytochemical and X-ray microanalytical characterization of calcium compartments in neuromuscular junctions during the normal breakdown of the intersegmental muscles in the giant silkworm *Antheraea polyphemus*.

Mort programmée des cellules : Caractérisation cytochimique et par microanalyse aux rayons X des compartiments de calcium dans les jonctions neuromusculaires lors de la paralysie normale des muscles intersegmentaires chez *A. polyphemus*.

BEAULATON J.

1988 *Histochemical Journal*, 20, 131. (E)

Free amino acids pool in haemolymph of different silkworm races.

Pool des acides aminés libres de l'hémolymph chez différentes races de ver à soie.

CHATTERJEE S.N., RAO G.P., CHATTERJEE G.K.

Genetics Laboratory, Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, INDIA.

1988 *CSR&TI Newsletter*, 3(3), 4. (E)

Studies on gamma-glutamyltranspeptidase in *Bombyx mori*.

Etudes sur les gamma-glutamyltranspeptidases chez *Bombyx mori*.

CHEN Y., et al.

1988 *Canye Kexue*, 14(2), 111. (C)

Purification of carotenoids binding protein from larval hemolymph of the yellow blood strain of *Bombyx mori*.

Purification de la protéine fixant les caroténoïdes à partir de l'hémolymph de la larve chez la souche à sang jaune de *Bombyx mori*.

FUJII H., MATSUI T., TOCHIHARA S., KAWAGUCHI Y.

Fac. of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812, JAPAN.

1988 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 57(5), 398-404. (J,e)

Small RNAs of the silkworm, *Bombyx mori* as revealed by in vitro capping and in vitro transcription.

Petits ARNs du ver à soie *Bombyx mori* révélés par "capping" in vitro et transcription in vitro.

FUJIWARA H., MAEKAWA H., TAKADA N., MIYAJIMA N., ISHIKAWA H.

1988 *Comp. Biochem. Physiol.*, 91, 383. (E)

Studies on the structure of nucleic acids of densovirus (strain of Zhenjiang, China).

Etudes sur la structure des acides nucléiques du virus de la densonucléose (souche de Zhenjiang, Chine).

GAO Q., et al.

1988 *Canye Kexue*, 14(3), 138. (C,e)

Changes in the moulting character of "Sanminsho" of the silkworm and its endocrine events.

Changements dans le caractère nombre de mues chez le ver à soie "Sanminsho" et les effets endocrines.

GU S.H., IWASHITA Y., KAWASAKI H.

Fac. of Agriculture, Utsunomiya University, Utsunomiya 321, JAPAN.

1988 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 57(4), 328-334. (J,e)

Ecdysteroid conjugates in the ovaries of the silkworm, *Bombyx mori*, 3 phosphates of 2,22-diaeoxy-20-hydroxy ecdysone and of Bombycosterol.

L'ecdystéroïde chez les ovaires du ver à soie *Bombyx mori* se compose de trois phosphates de 2,22-diaéoxy-20-hydroxy ecdysone et de bombycostérol.

HIRAMOTO M., FUJIMOTO Y., KAKINUMA K., IKEKAWA N., OHNISHI E.
1988 *Experientia*, 44, 623. (E)

Prothoracicotropic hormone (PTTH) of the silkworm, *Bombyx mori* : 4K-PTTH.

Hormone prothoracicotrope (PTTH) du papillon *Bombyx mori* : 4K-PTTH.

ISHIZAKI H., MIZOGUCHI A., HATTA M., SUZUKI A., NAGASAWA H., et al.
1987 *UCLA Symp. Mol. Cell. Biol., New Ser.* 49 (*Mol. Entomol.*), 119-128. (E)

A clock-run activation of esterase A-4 by cold in vitro in cholesterol esterase activity.

Une activation par le froid de l'estérase A-4 in vitro en activité cholestérol-estérase.

KAI H., MIAO Y., KAWAI T.

Lab. of Applied Entomology, Fac. of Agriculture, Tottori University, Tottori 680, JAPAN.
1988 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 57(4), 335-340. (E)

Effective acid-treatment in vitro to elevate the time measuring esterase A-4.

Traitement acide in vitro efficace pour augmenter le temps de mesure de l'estérase A-4.

KAI H., MIAO Y., XU P.X., KAWAI T.

Lab. of Applied Entomology, Fac. of Agriculture, Tottori University, Tottori 680, JAPAN.
1988 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 57(4), 313-317. (E)

Effect of methoprene on growth profile of larval organs of the silkworm, *Bombyx mori* L.

Effet du méthoprène sur le profil de croissance des organes larvaires du ver à soie *Bombyx mori* L.

KAMADA A., SHIMADA S.

Earth Chemical Co., Ltd., Kawauchi, Tokushima, 771-01, JAPAN.
1988 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 57(4), 270-274. (J,e)

In vitro translation of RNA from the midgut of the silkworm, *Bombyx mori*, infected with a denonucleosis virus.

Traduction in vitro d'ARN de l'appareil digestif du ver à soie *Bombyx mori* infecté par un virus de la denonucléose.

KOBAYASHI M., HASHIMOTO Y., SEKI H., WATANABE H.
1988 *J. Invert. pathol.*, 52, 259. (E)

Effects of repeated treatments of the anti-JH on dietary efficiency and size of the cocoon filament in precocious trimolter silkworms.

Effets des traitements répétés à l'anti-HJ sur l'efficacité alimentaire et le denier du filament du cocon chez les vers à soie trimuants précoces.

KUBOTA T., KIUCHI M., AKAI H.

Chiba Sericultural Research Center, Tougane, Chiba 283, JAPAN.
1988 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 57(5), 409-414. (J,e)

Induction of precocious metamorphosis by 1,5 disubstituted imidazoles with a non-terpene chain.

Induction d'une métamorphose précoce par imidazoles substitués en 1,5 avec une chaîne non terpénique.

KUWANO E., KIKUCHI M., ETO M.

1988 *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1619-1620. (E)

Two dimensional electrophoretic analysis of structural polypeptides of the Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus.

Analyse électrophorétique à deux dimensions des polypeptides structuraux du virus de la polyédrose nucléaire de Bombyx mori.

LIU D., LI Z.

1988 *Bingduxue Zazhi*, 1, 87-93. (C)

Hydrodynamic characteristics of the 12 S oligomer of the protein of inclusion bodies of a nuclear polyhedrosis virus of the silkworm.

Caractères hydrodynamiques de l'oligomère 12 S de la protéine des corps d'inclusion d'un virus de la polyédrose nucléaire du ver à soie.

LYLO V.V., SEREBRYANYI S.B.

1988 *Biopolim. Kletka*, 4(3), 139-144. (R)

Gene transfer vectors of a baculovirus, Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus, and their use for expression of foreign gene in insect cells.

Vecteurs de transfert de gènes à partir d'un baculovirus, le virus de la polyédrose nucléaire de Bombyx mori, et leur utilisation dans l'expression de gènes étrangers chez les cellules d'insectes.

MAEDA S.

1988 In: *Invertebrate cell system applications*, Mitsuhashi ed., CRC Press, Cleveland.

Study on the alkaline phosphatase in the midgut of domestic silkworm.

Etude sur la phosphatase alcaline chez l'appareil digestif du ver à soie domestique.

MIAO Y.

1988 *Canye Kexue*, 14(3), 154. (C)

hst-1 transforming protein: expression in silkworm cells and characterization as a novel leparin binding growth factor.

Protéine transformante hst-1 : expression chez les cellules du ver à soie et caractérisation comme nouveau facteur de croissance liant la léparine.

MIYAGAWA K., SAKAMOTO H., YOSHIDA T., YAMASHITA Y., MITSUI Y., et al.

1988 *Oncogene*, 3, 383.

Structure and synthesis of bombyxin from the silkworm Bombyx mori.

Structure et synthèse de la bombyxine provenant du ver à soie Bombyx mori.

NAGASAWA H., MARUYAMA K., SATO B., HIETTER H., KATAOKA H., et al.

1987 *Pept. Chem.*, 123-126. (E)

Purification of a beta-1,3-glucan recognition protein in the prophenoloxidase activating system from hemolymph of the silkworm, Bombyx mori.

Purification d'une protéine de reconnaissance du béta-1,3-glucane chez le système activateur de pro-phénoloxydase provenant de l'hémolymphe du ver à soie Bombyx mori.

OCHIAI M., ASHIDA M.

1988 *J. Biol. Chem.*, 263, 12056.

Metabolism of E-N-trimethyllysine in the silkworm Bombyx mori. Free E-N-trimethyllysine as reserve of carnitine.

Métabolisme de la E-N-triméthyllysine chez le ver à soie Bombyx mori. E-N-triméthyllysine libre comme réserve de carnitine.

OSANAI M., YONEZAWA Y.

1988 *Comp. Biochem. Physiol.*, 90, 855.

Les phéromones d'insectes, trente ans de recherches.

Insect pheromones, thirty years of research.

PAIN J.

1988 *Insectes*, 68, 2-5. (F)

Structure and expression of gene coding for sex-specific storage protein of *Bombyx mori*.

Structure et expression du gène codant pour la protéine de stockage spécifique du sexe chez *Bombyx mori*.

SAKURAI H., FUJII T., IZUMI S., TOMINO S.

Dpt of Biology, Tokyo Metropolitan Univ., Setagaya-ku, Tokyo 158, JAPAN.

1988 *J. of Biological Chemistry*, 263(16), 7876-7880. (E)

An enzyme that catalyses the synthesis of lanthionine in the silkworm, *Bombyx mori*.

Un enzyme qui catalyse la synthèse de la lanthionine chez le ver à soie *Bombyx mori*.

SHINBO H.

1988 *Comp. Biochem. Physiol.*, 91, 301.

Induction of spinning from non-spinning larvae reared with an artificial diet by administration of molting hormone.

Induction du filage chez des larves non fileuses élevées sur aliment artificiel par administration d'une hormone de mue.

SUDO M., AKAI H.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, JAPAN.

1988 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 57(5), 405-408. (J,e)

Critical time of endocrine events responsible for larval ecdysis and precocious metamorphosis determined by photostimulation in the third larval instar of the silkworm, *Bombyx mori*.

Moment critique des événements endocrinaux responsables de l'ecdysis larvaire et de la métamorphose précoce déterminé par photostimulation chez les larves du 3ème âge du ver à soie *Bombyx mori*.

TAKEDA S.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, JAPAN.

1988 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 57(5), 415-424. (E)

Fluoride effects on the mulberry silkworm system.

Effets des fluorures sur le système du ver à soie du mûrier.

WANG J., BIAN Y.

1988 *Environ. Pollut.*, 52(1), 11-18. (E)

Effects of fluoroprobes on the phosphorescence of nucleic acids in *Bombyx mori* and *Antheraea pernyi*.

Effets des sondes fluorescentes sur la phosphorescence des acides nucléiques chez *Bombyx mori* et *Antheraea pernyi*.

XIA B., et al.

1988 *Canye Kexue*, 14(2), 90. (C,e)

Vers à soie : oeufs, embryologie

Silkworms : eggs, embryology

Separation of fertile and unfertile eggs in silkworm, *Bombyx mori*.
Séparation des oeufs fécondés et non fécondés chez le ver à soie *Bombyx mori*.
BENCHAMIN K.V., HOLKER P.S., VIJAYALAKSHMI RAO
Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, INDIA.
1988 CSR&TI Newsletter, 3(2), 8. (E)

Identification of a transcriptionally active pseudogene in the chorion locus of the silkworm *Bombyx mori*. Regional sequence conservation and biological function.
Identification d'un pseudogène actif pour la transcription dans le locus du chorion du papillon *Bombyx mori*. Conservation régionale de la séquence et fonction biologique.
FOTAKI M.E., IATROU K.
1988 J. Mol. Biol., 203, 849. (E)

Structural models of the evolutionarily conservative central domain of silkworms chorion proteins.
Modèles structuraux du domaine central conservateur du point de vue de l'évolution des protéines du chorion des papillons séricigènes.
HAMODRAKAS S.J., BOSSHARD H.E., CARLSON C.N.
1988 Protein Engineering, 2, 201.

Changes in ecdysteroid titer in the ontogeny of the eri silkworm *Philosamia cynthia ricini*.
Changements du niveau en ecdystéroïde au cours de l'ontogénèse du ver à soie eri *Philosamia cynthia ricini*.
JIANG R., CAO M.
1988 Kunchong Xuebao, 31(1), 8-14. (C)

Changes of proteins during development of ovary in the small egg 2 mutant of *Bombyx mori*.
Changements des protéines au cours du développement de l'ovaire chez le mutant à petit oeuf 2 de *Bombyx mori*.
KAWAGUCHI Y., MIYAJI Y., DOIRA H., FUJII H.
Fac. of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki Higashi-ku, Fukuoka 812, JAPAN.
1988 J. Seric. Sci. Jpn., 57(4), 289-297. (J,e)

Detection of alkaline phosphatase activity in developing "kidney" embryo of Bombyx mori, a mutant which lacks an endodermal organ.

Détection d'activité phosphatase alcaline chez l'embryon "haricot" de Bombyx mori en développement, un mutant manquant d'un organe endodermique.

NISHIJIMA K., NHO S.K., SAKAGUCHI B.

1988 *Appl. Entomol. Zool.*, 23, 196-198.

Silkworm egg counting system by means of image processing.

Dénombrement des oeufs de ver à soie par système informatique vidéo.

OHURA M., NISHIDE T., TAKIZAWA H.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, JAPAN.

1988 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 57(5), 425-430. (J,e)

Assembly of silkmooth chorion proteins: in vivo patterns of disulfide bond formation.

Assemblage des protéines du chorion du ver à soie : aspects in vivo de formation des liens disulfure.

REGIER J.C., WONG J.R.

Center for Agric. Biotechnology, Univ. of Maryland, College Park, MD20742, U.S.A.

1988 *Insect Biochem.*, 18(5), 471-482. (E)

Developmental arrest induced by juvenile hormone in larvae of Bombyx mori.

Arrêt du développement induit par l'hormone juvénile chez les larves de Bombyx mori.

SAKURAI S., IMOKAWA H.

1988 *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 8, 219. (E)

Gene conversions can generate sequence variants in the late chorion multigene families of Bombyx mori.

Des conversions de gène peuvent générer des variantes séquentielles chez les familles multigéniques tardives du chorion chez Bombyx mori.

XIONG Y., SAKAGUCHI B., EICKBUSH T.H.

1988 *Genetics*, 120, 221. (E)

Increase of production of the silkworm (Bombyx mori) eggs.

Augmentation de la production en oeufs du ver à soie Bombyx mori.

ZHAO Z., et al.

1988 *Canye Kexue*, 14(3), 174. (C)

Changes in the tyrosine aminotransferase activity during ontogenesis of housefly and silkworm.

Changements intervenant dans l'activité tyrosine-aminotransférase pendant l'ontogenèse de la mouche commune et du ver à soie.

ZHIVOTENKO E., KUTUZOVA N.M., FILIPPOVICH Y.B.

1988 *Ontogenez*, 19(3), 296-300. (R)

Vers à soie : glandes séricigènes

Silkworms : silk glands

Strategies of fibroin production.

Stratégies de production de la fibroïne.

CANDELAS G.C., CARRASCO C.E., DOMPENCIEL R.E., ARROYO G., CANDELAS T.

Biology Dept, university of Puerto Rico, Rio Piedras, PUERTO RICO 00931.

1987 In: *Translational regulation of gene expression*, J. Ilan ed., Plenum, 209-228.

L'appareil de traduction de la glande séricigène de Bombyx mori : contribution à la connaissance des ribosomes, de l'adaptation des tRNA et de la transcription des gènes de tRNA¹ Gly.

The silk gland translation complex in Bombyx mori: contribution to the knowledge on ribosomes, tRNAs adaptation, and tRNA¹ Gly gene transcription.

FOURNIER A.

Université Lyon I, 43 bd du 11 novembre, 69100 Villeurbanne, FRANCE.

1988 Thèse, Univ. C. Bernard Lyon I, 75 p. (F)

Specific codon usage pattern and its implication on the secondary structure of silk fibroin mRNA.

Panoplie spécifique d'usage des codons et son implication dans la structure secondaire de l'ARNm de la fibroïne.

MITA K., ICHIMURA S., ZAMA M., JAMES T.C.

1988 *J. Mol. Biol.*, 203, 917. (E)

Silk synthesis.

Synthèse de la soie.

PRUDHOMME J.C., COUBLE P., GAREL J.P., DAILLIE J.

Université Lyon I, 43 bd du 11 novembre 1918, 69100 Villeurbanne, FRANCE.

1985 In: *Comprehensive insect physiol., biochem. & pharmacol.*, 10, 571-594, Pergamon.

DNA supercoiling facilitates formation of the transcription initiation complex on the fibroin gene promoter.

La superhélice de l'ADN facilite la formation du complexe d'initiation de la transcription sur le promoteur du gène de la fibroïne.

TABUCHI H., HIROSE S.

1988 *J. Biol. Chem.*, 263, 15282.

Control of the levels of alanyl-, glycyl-, and seryl-tRNA synthetases in the silk gland of *Bombyx mori*.

Contrôle du niveau des alanyl-, glycyl-, et séryl-tRNA synthétases chez la glande séricigène de *Bombyx mori*.

VISWANATHAN S., DIGNAM S.S., DIGNAM J.D.

Dpt of Biochemistry, Univ. of Mississippi, Medical Center, Jackson, Miss. 39216-4505, USA.

1988 *Dev. Biol.*, 129, 350-357. (E)

Soie

Silk

NMR of silk fibroin. 9) Sequence and conformation analyses of the silk fibroins from Bombyx mori and Philosamia cynthia ricini by ¹⁵N NMR spectroscopy.

NMR de la fibroïne. 9) Analyses de séquence et de conformation des fibroïnes de Bombyx mori et Philosamia cynthia ricini par spectroscopie NMR ¹⁵N.

ASAKURA T., YOSHIMIZU H., YOSHIZAWA F.

1988 Macromolecules, 21(7), 2038-2041. (E)

Suggestions for new grading and standards for raw silk.

Proposition de nouveaux standards et mesures pour la soie grège.

An.

Silk Standards Committee, I.S.A., Lyon, FRANCE.

1988 ISA/AIS Congress, Krefeld, sept. 88. (E)

On the raw silk testing and classification method currently practised in Japan.

Méthode de contrôle et de classification de la soie grège appliquée actuellement au Japon.

An.

Japanese Government Yokohama Agric. & Forestry Production Inspection Institute, JAPAN.

1988 ISA/AIS congress, Krefeld, sept. 88. (E)

Proceedings of the symposium on swelling treatment of raw silk and raw silk fabrics. 3. On the increase of demands for knitted goods.

Actes du symposium sur le traitement gonflant de la soie grège et des tissus de soie grège. 3. Augmentation de la demande de produits en maille.

An.

1988 Reports Silk Sci. Res. Inst. Jpn., 36, 85-96. (J)

Estimation of the staying time distribution of a cooked cocoon in the raw silk reeling machine.

Estimation du temps de stationnement du cocon cuit dans la filature automatique.

BAI L., SHIMAZAKI A.

1988 J. Seric. Sci. Jpn., 57(5), 369-378. (J,e)

Sgommatura della seta con prodotti commerciali liquidi.

Degumming of silk with commercialized liquid detergents. (Décreusage de la soie à l'aide de détergents liquides commerciaux.)

BIANCHI SVILOKOS A., COLONNA G.M.

Stazione sperimentale per la seta, Via Colombo 81, 20133 MILANO, ITALY.

1988 *La Seta*, 1988, 7-16. (I,e,f)

Rapid micro method to quantify free diazonium groups in insoluble proteins.

Méthode rapide de quantification des groupements diazonium libres chez les protéines insolubles.

CORDIER D., GRASSET L., VILLE A.

I.U.T., Université C. Bernard, 43 Bd du 11 Novembre, 69622 Villeurbanne, FRANCE.

1988 *Process Biochemistry*, 23(3), 82-85. (E,f)

La révolution des textiles greffés.

Grafted textiles revolution.

DOUEK L.

1988 *Science et vie*, 852, 98-106. (F)

The hairiness of spun silk yarns.

La bourre des filés de soie.

HATTENSCHWILER P.

1988 *ISA/AIS Congress, Krefeld, sept 88*. (E)

The structure analysis of Philosamia cynthia ricini silk fibroin and its model compounds L-alanine/beta-alanine copolymers, by means of carbon-13 NMR spectroscopy.

Analyse de la structure de la fibroïne de *Philosamia cynthia ricini* et des copolymères L-alanine/beta-alanine de ses composés modèles par spectroscopie NMR au carbone 13.

KASHIBA H., ASAKURA T., KOMOTO T.

1988 *Sen'i Gakkaishi*, 44(2), 379-384. (J)

Synthesis of dimethyloldihydroxyethylene thiourea as a textile processing agent.

Synthèse de diméthyloldihydroxyéthylène thiourée, comme agent de transformation des textiles.

KATO H., YASUDA K., YAMAGUCHI Y.

1988 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 57(4), 345-346. (J)

The occurrence of vertical and horizontal stripes on habutae made of the silk reeled from different cocoon layers.

Apparition de rayures verticales et horizontales sur les taffetas "habutae" faits de soie dévidée à partir de différentes couches du cocon.

MASAGO Y., MATSUMOTO T., NASU T., SAIJO M.

1988 *Reports Silk Sci. Res. Inst. Jpn.*, 36, 51-58. (J)

On the union cloths blended with swelling silk and eri spun yarn.

Les tissus mélangés contenant de la soie gonflante et du filé de soie eri.

MATSUMOTO T., MASAGO Y.

1988 *Reports Silk Sci. Res. Inst. Jpn.*, 36, 47-49. (J)

Studies on the quality improvement of water for use in a filature: preparation of a highly concentrated solution of calcium bicarbonate and its application to an adjusting method for the alkalinity and hardness of water...

Etudes sur l'amélioration de la qualité de l'eau utilisée en filature : préparation d'une solution très concentrée de bicarbonate de calcium et application à une méthode d'ajustement à l'alcalinité et à la dureté de l'eau...

MIYAUCHI K.

1988 *Reports Silk Sci. Res. Inst. Jpn.*, 36, 69-84. (J,e)

Method of manufacture of the hand spun silk yarn by using guide thread (4).

Méthode de fabrication d'un filé de soie à la main en utilisant un guide-fil.

SAIJO M.

1988 *Reports Silk Sci. Res. Inst. Jpn.*, 36, 59-68. (J)

High-resolution solid state NMR.

NMR à l'état solide de haute résolution.

SAITO H.

1988 *Sen'i Gakkaishi*, 44, 219-223. (J)

Amount of metallic ions in the silk with different size and sericin content.

Quantité d'ions métalliques dans des soies de denier et de contenu en sérécine différents.

SHIMIZU F., NAKAI T.

1988 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 57(4), 347-348. (J)

Studies on the relation between silkworm rearing conditions and silk reeling results. 2. Relation between the reelability and neatness score and the weather conditions during cocooning.

Etudes sur la relation entre les conditions d'élevage du ver à soie et les résultats obtenus au dévidage.

2. Relation entre la dévidabilité et la netteté et les conditions climatiques pendant le filage du cocon.

SHIMIZU S., KOBAYASHI M., KUROKAWA T.

1988 *Reports Silk Sci. Res. Inst. Jpn.*, 36, 41-46. (J)

Morphological changes of silk fiber by abrasion.

Changements morphologiques de la fibre de soie par abrasion.

SHIOZAKI H., TSUKADA M.

Textile Research Institute of Kanagawa, Aikawa-Machi, Kanagawa 243-03, JAPAN.

1988 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 57(4), 275-283. (J,e)

Statistical properties of the distribution of the position of dropping ends.

Propriétés statistiques de la distribution des cassures sur le filament du cocon.

SHOU G.

Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, JAPAN.

1988 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 57(5), 355-361. (J,e)

Classification of the distribution type of dropping ends position.

Classification du type de distribution des cassures sur le filament du cocon.

SHOU G.

Fac. of Agriculture, University of Tokyo, Tokyo 113, JAPAN.

1988 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 57(5), 362-368. (J,e)

Structural analysis of Dictyoploca japonica silk fiber.

Analyse de la structure de la fibre de soie de Dictyoploca japonica.

TSUKADA M.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, JAPAN.

1988 *J. Seric. Sci. Jpn.*, 57(5), 438-443. (J,e)

True silk fabric machine-washable finishing.

Apprêtage des tissus de soie pour le lavage en machine.

YE M., LING M.

Zhejiang Silk Science Research Institute, CHINA.

1988 *ISA/AIS Congress, Krefeld, sept. 88.* (E)

Selective permeability of fibroin membrane for amino acids.

Perméabilité sélective d'une membrane de fibroïne aux acides aminés.

YOSHIMURA T., KUROTANI W., SHMIZU Y., YAMAUKA R., HAYASHIYA K.

1988 *Agr. Biol. Chem.*, 52, 2103.

INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

1) Les articles présentés doivent concerner soit des travaux originaux soit des synthèses. Ils doivent être rédigés en français ou en anglais. Ils doivent avoir trait à la sériciculture qui inclut les vers à soie, les plantes nourricières, la filature de la soie quelle que soit la nature des recherches (fondamentales ou appliquées) et des sujets (biochimie, écologie, économie, virologie, génétique, etc.).

2) Les articles doivent être soumis à : Dr. G. CHAVANCY. Les articles soumis au Rédacteur doivent être inédits et ne doivent pas être présentés pour publication chez un autre éditeur. Les articles acceptés pour publication dans SERICOLOGIA ne pourront être publiés ailleurs sous la même forme sans le consentement écrit de l'éditeur.

3) Les manuscrits et illustrations doivent être soumis en double exemplaire, l'auteur conservant une copie. Dans le cas d'une co-rédaction, les auteurs doivent indiquer le nom de celui qui recevra les épreuves.

4) Les manuscrits doivent être dactylographiés avec un double interligne et des marges importantes. Les auteurs sont priés de rédiger des communications aussi concises que possible. Les renvois de bas de page sont à éviter et les caractères en italique ne doivent pas être utilisés pour la mise en relief.

5) L'article doit être présenté de la façon suivante :

- Le titre suivi du nom de l'auteur et de son adresse complète.

- Le résumé qui doit indiquer le contenu et les conclusions de l'article et doit faire référence à des informations nouvelles. Le résumé ne doit pas excéder 200 mots et peut être divisé en paragraphes numérotés.

- Les mots clés. Une petite liste de mots clés permettant une rapide analyse du contenu de l'article et utilisable pour la compilation de l'index.

- Les articles doivent être divisés en : Introduction, Matériel et Méthodes, Résultats et Discussion. Pour les articles de synthèse, les auteurs peuvent choisir la présentation qui leur convient.

- Remerciements.

- Références. Les auteurs doivent suivre le "Harvard system". Les références doivent être données dans l'ordre suivant : nom de l'auteur et ses initiales, date (entre parenthèses), titre de l'article, nom du journal tel qu'il est abrégé dans la liste mondiale des périodiques scientifiques (4ème édit. 1963), le volume et les première et dernières pages de l'article.

Pour les livres, il est nécessaire d'indiquer le nom de l'auteur et ses initiales, la date de publication, le titre, l'édition, le nombre de pages, le nom de l'éditeur et le lieu d'édition.

Dans le texte, les références doivent être indiquées sous la forme suivante : Dupont (1964) ou (Dupont, 1964). Lorsque la référence comprend plus de deux auteurs, par exemple Dupont, Durand et Martin, l'article doit être cité comme Dupont et coll. sauf si cela peut prêter à confusion. Si l'on cite des articles d'un même auteur publiés la même année, ils doivent être distingués par les lettres a, b, etc.

La référence à un article sous presse doit signifier que l'article a été accepté pour publication et elle doit s'écrire de la façon suivante :

SETOYAMA K. (1962) Effect of water on molecular motion of silk fibroin J. Seric. Sci. Jpn. Sous presse.

6) Illustrations. Le manuscrit sera accompagné de toutes les illustrations nécessaires mais celles-ci ne doivent pas être insérées dans le texte. Toutes les photographies, graphiques et diagrammes doivent être numérotés consécutivement en chiffres arabes, dans l'ordre de citation du texte.

Les photographies sur papier brillant, ou les épreuves positives (pas de négatifs ou de diapositives) doivent être envoyées si possible sans montage et en nombre limité.

Les cartes, graphiques ou diagrammes doivent être dessinés nettement à l'encre noire sur le papier ou du carton blanc de bonne qualité. Les inscriptions apparaissant sur les illustrations doivent être complètes et de taille suffisante pour permettre une réduction importante si nécessaire.

Les illustrations ne doivent pas dépasser le format 14 x 19 cm. Au dos de chaque illustration doivent être indiqués le nom de l'auteur, le n° de la figure (en chiffres arabes) et l'orientation de l'illustration si nécessaire.

Les légendes des figures doivent être dactylographiées sur une feuille séparée et non pas au dos de l'original et elles doivent être suffisamment explicites pour éviter que l'on se reporte au texte.

7) Tableaux. Ils doivent être numérotés en chiffres romains et dactylographiés sur des feuilles séparées. Les titres doivent être suffisamment clairs sans qu'il soit nécessaire de se reporter au texte. Tous les tableaux et figures doivent être cités dans le texte.

8) Seules les abréviations normalisées sont autorisées. Lorsque des abréviations particulières sont utilisées, le nom devra d'abord être donné en entier suivi de l'abréviation entre parenthèses.

9) Le nom latin de toutes les espèces étudiées doit être indiqué.

10) Les corrections des épreuves doivent se limiter aux fautes de frappe. Toutes modifications importantes de l'article seront facturées à l'auteur.

11) Un bon de commande de tirés-à-part est fourni en même temps que les épreuves. Les auteurs peuvent ainsi commander des tirés-à-part en renvoyant les épreuves. Il est à noter que 50 tirés-à-part sont envoyés gratuitement par l'éditeur.

INFORMATION FOR CONTRIBUTORS

1) Papers should be in French or in English and be original contributions or reviews in the field of sericulture including silk worm, host plant, silk reeling, whatever the nature of studies (basic or applied) and topics (biochemistry, ecology, economy, virology, genetics, etc.).

2) Papers should be submitted to : **Dr. G. CHAVANCY**. Submission of a paper to the Editor implies that it has not previously been published, that it is not under consideration for publication elsewhere and that, if accepted in *SERICOLOGIA*, it will not be published elsewhere in the same form without the written consent of the Editor.

3) Manuscripts and illustrations should be submitted in duplicate and the author should retain one copy. In the case of multiple ownership, the authors indicate who is to receive the proofs.

4) Manuscripts should be typewritten with double spacing and wide margin. Authors are requested to keep their communication as concise as possible. Footnotes should be avoided and italics should not be used for emphasis.

5) The typescript should contain the following features:

- Title followed by the author's name and full address.
- Abstract which should be a brief summary of the contents and conclusions of the paper and should refer to any new information. It should not exceed 200 words and may be divided into numbered sections.
- Key-words. A short list of keywords provided for rapid scanning of the contents of the paper and used for compiling the index.

- Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion should be given for papers presenting original results. For review, authors may choose the convenient presentation.

- Acknowledgements.

- References. The 'Harvard system' is to be followed. References should be detailed in the following order: author's names and initials, date (in parentheses), the title of the article, the name of the journal as abbreviated in the World List of Scientific Periodicals (4th edit., 1963), the volume and the first and last pages of the article.

For books, the author's names, date of publication, title, edition, number of pages, reference, publisher's name and the place of publication should be given.

In the text, references should be given as Dupont (1964) or (Dupont, 1964). When a citation includes more than two authors, e. g. Dupont, Durand and Martin, the paper should be cited in the text as Dupont *et al.*, provided this is not ambiguous. If papers by the same author(s) in the same year are cited they should be distinguished by the letters a, b, etc.

References to a paper "In press" means that it has been accepted for publication and given as follows:

SETOYAMA K. (1982) Effect of water on molecular motion of silk fibroin. *J. Seric. Sci. Jpn.* In press.

6) Illustrations. All necessary illustrations should accompany the manuscript but should not be inserted in the text. All photographs, graphs and diagrams should be numbered consecutively in arabic numerals in the order in which they are referred to in the text.

Glossy photographs or positive prints (not X-ray, negatives or slides) should be sent, unmounted wherever possible, and should be restricted to the minimum necessary.

Charts, graphs or diagrams should be drawn boldly in black ink on good quality white paper or card. Lettering to appear on the illustration should be given in full and should be of sufficient size to allow for considerable reduction where necessary.

Illustrations should not be larger than 14 x 19 cm. On the back of each illustration should be indicated the author's name, the figure number (in arabic numerals) and the top of illustration, when it is not clear.

Legends to figures should be typed on a separate sheet and not on the back of the original, and should give sufficient data to make the illustration comprehensible without reference to the text.

7) Tables. They should be numbered in roman numerals, typed on separate sheets and should have a title which will make the meaning clear without reference to the text. All tables and figures would be referred to in the text.

8) Only standard abbreviations should be used. Where specialized abbreviations are used, the name should firstly be given in full with the abbreviation indicated in parentheses.

9) The Latin names should be given for all species used in investigation.

10) Corrections to proofs should be restricted to printer's errors only. Other than these, substantial alterations will be charged to the author.

11) A reprint order form will be supplied with the proofs, and authors may order such reprints as they require when the proofs are returned. Please note that 50 free reprints are sent by the Editor.

Directeur Gérant: Dr H. BOUVIER

Dépôt Légal: 4e Trimestre 1988