

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)
MANO Y. (Japon/Japan)
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)

SOMMAIRE - CONTENTS

Revue / Review

- The research channels in the prevention and control of silkworm diseases . . . 287**
 Les voies de recherches sur la prévention et la lutte contre les maladies du ver à soie . . . 297
 LIU S.X., ZHONG W.B.

Articles originaux / Original papers

- HPLC fractionation of Cs peptides of Bombyx mori silk fibroin 307**
 Fractionnement HPLC des peptides chymotrypsiques solubles (Cs) de la fibroïne de Bombyx mori 327
 G. FREDDI, S. FARADÒ, T. MAIFRENI

- Genetic analysis of some quantitative traits by diallel cross in silkworm, Bombyx mori L. 333**
 Analyse génétique de certains traits quantitatifs par croisement diallélique chez le ver à soie Bombyx mori L. 343
 S.B. SATENAHALLI, R. GOVINDAN, J.V. GOUD

- Gibberellic acid improves the commercial characteristics of silkworms . . . 347**
 L'acide gibberellique améliore les caractéristiques commerciales des vers à soie . 353
 M. SANTAKUMARI, V.M. SREEDHARA, R.A. FLETCHER

- Effect of potassium iodide, cobalt chloride, calcium chloride and potassium nitrate on protein, RNA and DNA contents of silkgland of silkworm (Bombyx mori L.), Nistari race 355**
 Effet de l'iodure de potassium, du chlorure de cobalt, du chlorure de calcium et du nitrate de potassium sur les contenus en protéines, ADN et ARN de la glande séricigène du ver à soie (Bombyx mori L.), race nistari 361
 A.K. DASMAHAPATRA, M.K. CHAKRABARTI, A.K. MEDDA

- Effect of Kenchu virus infection during fifth instar in silkworm, Bombyx mori L. 365**
 Effet de l'infection par le virus de Kenchu durant le cinquième âge larvaire chez le ver à soie Bombyx mori L. 369
 R. GOVINDAN, G.K. VEERESH, M.C. DEVAIAH, M.B. SHYAMALA, T.K. NARAYANASWAMY

Studies on the detection of densovirus (DNV) (strain of China) using the biotin-avidin system (BAS) in the silkworm, <i>Bombyx mori</i>	371
Etudes sur la détection du virus de la densovirose (DNV) (souche chinoise) par le système biotine-avidine (BAS) chez le ver à soie <i>Bombyx mori</i>	379
SHI L., DING H.	

Notes brèves / Brief notes

Studies on the transmission of <i>Nosema</i> sp. in tropical Tasar silkworm, <i>Antheraea mylitta</i> D.	383
Etudes sur la transmission de <i>Nosema</i> sp. chez le ver à soie tasar tropical <i>Antheraea mylitta</i> D.	389
U.P. GRIYAGHEY, K. SENGUPTA	

Studies on the cross infection of <i>Bombyx mori</i> L. and <i>Philosamia ricini</i> H. larvae with the <i>Nosema</i> sp. infecting <i>Antheraea mylitta</i> D.	393
Etudes de l'infection croisée des larves de <i>Bombyx mori</i> L. et <i>Philosamia ricini</i> H. par <i>Nosema</i> sp. infectant <i>Antheraea mylitta</i> D.	399
U.P. GRIYAGHEY, K. SENGUPTA	

Studies on the effect of some stress conditions on the incidence of diseases in Tasar silkworm, <i>Antheraea mylitta</i> D.	401
Etudes de l'effet de certaines conditions stressantes sur l'incidence des maladies chez le ver à soie tasar <i>Antheraea mylitta</i> D.	405
U.P. GRIYAGHEY, K. SENGUPTA	

Revue signalétique / Bibliography	407
--	------------

THE RESEARCH CHANNELS IN THE PREVENTION AND CONTROL OF SILKWORM DISEASES

LIU S.X.* & ZHONG W.B.**

* Academy of Agricultural Science in Guangdong Province, Guangzhou, China.

** Regional Sericultural Training Centre for Asia-Pacific South China Agricultural University, Guangzhou, China.

The ultimate aim of silkworm disease research is to find out the channels and methods to prevent and control the occurrence of silkworm diseases in sericulture. With the advance of research on silkworm diseases up to the end of the eighties, the techniques of silkworm disease prevention and control have been developed in different channels, some of them have been used in production, and some of them are on trial. This paper is a general description of the present situation of the research channels on the prevention and control of silkworm diseases.

Keywords : Silkworm diseases, anti-disease breeding, disease treated by chemical methods, disease treated by physical methods, virus interference and immunity, disinfectants, quarantine of silkworm diseases.

I. THE USE OF ANTI-DISEASE VARIETIES

For the utilization of disease-resistant varieties to prevent different kinds of diseases, no specific measures and chemical reagents are needed and it will save labour power, material and expenses, reduce the environmental contamination, and obtain an obvious effect for disease prevention. So that it can easily be accepted, be used and be popularized. In recent years, the research of disease-resistant varieties breeding has been paid much attention to and shows more and more significant advantages in the field of agriculture.

It was concluded by Japanese scientist that different races of silkworms have different resistances to various kinds of diseases. The differences of resistance do not only lie in many kinds of viral diseases such as NPV, CPV, FV, DNV and SFV (small flacherie virus) but also in white muscardine, aspergillus, pebrine, etc. The appearance of which silkworms have different resistances to the diseases indicated that different kinds of anti-disease gene or disease sensitive gene are existing in different races of silkworms, thus it will provide a lot of raw materials for the genetic research in anti-disease variety breeding. Up to now some disease-resistant varieties to different kinds of diseases have been bred by some silkworm breeding units in Japan. According to the epidemic situations in different areas and different seasons, they use different varieties which are able to resist different kinds of diseases correspondingly so that the epidemic diseases could be under control.

Research on disease-resistance breeding has also been taken up in many sericulture institutes in China. Early in 1964, Lu H. *et al.* concluded that different silkworm varieties also have obvious different resistances to NPV. In 1974 Huang J. indicated that different varieties have different resistances to CPV. Zhejiang Sericulture Institute (1978) have made a detail research on the FV resisting ability in different varieties, a similar experiment has also been done by Shanxi Sericulture Institute. Guangdong Sericulture Institute (1978-1979) have made repeated investigation to compare

the ability of silkworm varieties to resist NPV, CPV, sotto-toxin, pebrine diseases, etc. It was concluded that different varieties have different resistances to about four kinds of diseases. They select a batch of varieties which have different anti-disease genes and use them as materials of anti-disease breeding. Hu X. *et al.*, have made a genetic power analysis on a series of silkworm varieties to compare their anti-DNV ability, they thought that the anti-DNV ability for some silkworm varieties are controlled by a pair of recessive genes.

China is a birthplace of sericulture, with a long history, wide sericulture areas and rich sources of silkworm varieties. It provides a favourable condition for the research on anti-disease genes in silkworm breeding. In order to expedite the steps of research and breeding of anti-disease varieties the following suggestions are useful.

(I). Choosing the excellent varieties with different voltinisms, different systems and different anti-disease genes as materials in anti-disease variety breeding through the public appraisal.

(II). Taking up research on the genetic regulation of anti-disease varieties to provide a theoretical basis and breeding method for anti-disease breeding.

(III). Taking up different methods to breed the new varieties with anti-disease characteristics and meeting the need of sericulture production.

In recent years, China has made a gratifying advance in anti-DNV breeding. A batch of varieties with different anti-disease characteristics as a basic material for the use of anti-disease breeding has been selected and some anti-disease varieties have been bred. Fang F. *et al.* (1984-1987) used n^o7532 as a raw material which is more sensitive to DNV, by means of continuously inoculating the larvae with DNV in each generation, and made selection, appraisal and elimination through 6 generations. They have bred a variety, Kang 1, with anti-DNV characteristics. Through propagation of many generations and inoculation with DNV as a toxic testing to confirm its anti-disease characteristics in the case of morbidity, the control group was 100 % and that of Kang 1 was only 3.4-19.5 %. It showed obviously that the former had the anti-DNV appearance. In order to expedite the steps of anti-disease breeding, the use of gene engineering is possible. Huang Z. *et al.* (1985-1987) took experiment in DNA cloning which was extracted from the eggs of Bai Pi Dan variety, an anti-disease race, and injected it into the ovaries of other varieties such as Dong 34, Qiong Shan Hai Nan, etc.. They have obtained a new mutation with anti-disease characteristics, Dong Ji 1. Through the analysis of the lipase-isozymes of haemolymph from F1 hybrid larvae. It was concluded that the genes have been transplanted from one variety to another.

II. SILKWORM DISEASES TREATED BY CHEMICAL METHODS

In the past, it was considered as a non-realistic way to control the diseases by chemical treatment, however, with the development of silkworm pathology in recent years, these methods have been making great progress, some of them have been used in production, and some of them have shown a gratifying prospect.

Since the seventies, the research and exploration of chemical treatment have been used for the prevention and control of the viral diseases and pebrine disease. S. Miyajima (1966) discovered that 5-Fluorouracil was efficient in inhibiting the occurrence of FV ; Kodama Reijiro (1972) concluded that leucomycin and fructosazine were efficient in controlling the FV ; leucomycin mixed with fructosazine was fed to silkworms to control CPV and NPV, it also had effective results. Since the discovery by Hsiao (1973) that benlate was efficient to cure the pebrine of Alfalfa Weevil, W.M. Brooks *et al.* (1978) demonstrated that benlate had efficiency to cure the pebrine disease of the yellow mealworm, fly and corn earworm. Liu Shixian *et al.* (1979) also concluded that benlate and bavistin showed their efficiency in controlling pebrine of the silkworm, *Bombyx mori* L., and Eri silkworm and discovered that seven kinds of analogues with benzimidazole structure also showed efficiency in controlling silkworm pebrine diseases. It showed the same efficiency in controlling the pebrine diseases which were transmitted by the embryo by using bavistin. The larvae which were pebrinized by embryo transmission fed with the artificial diet containing 0.1 mg/g bavistin recovered very obviously. Besides, Helms (1979) discovered that B.T. (*Bacillus thuringiensis*) toxin had efficiency to kill the pebrine disease of the yellow-headed cutworm. From the histological observation it was concluded that the pebrine spores and meronts in the midgut epidermic cells of the yellow-headed

cutworm disappeared and dropped off obviously due to the action of B.T. toxin. Thus it is possible, by using chemistry and bionics methods, to find out another chemical molecular formula which is effective to inhibit the pebrine disease. A primary experiment taken up by Liu Shixian indicated that B.T. toxin was efficient to inactivate the pebrine spores but the concentration of B.T. toxin which the silkworm's body can withstand was very low (about 10 ppm) so that it was difficult to identify the efficiency of the treatment.

In recent years, India has made great progress in controlling Ujifly by chemical treatment. One kind of drug called Ujicide was sprinkled on the worm's body to kill the Ujifly's eggs attached on the surface of the body, thus the Ujifly would possibly be under control (M.N. Seetharama *et al.*)

Generally speaking, the research results on the chemical treatment mentioned above are insufficient, they need to be improved. The major reason is that the time of these chemicals remaining in the silkworm's body is very short, so that the reagent needs to be applied day by day, and this will make a lot of troubles for silkworm rearing and also affect their health. So some of the above methods are not easy to use in production. However, there is no doubt that the above research provides a channel and possibility for the prevention and control of silkworm diseases.

III. SILKWORM DISEASES TREATED BY PHYSICAL METHODS

Progress has recently been made in the control of silkworm diseases by using physical factors. But these physical factors are only limited to the high temperature treatment, there is no report concerning the use of other factors in controlling diseases.

One of the new methods controlling the pebrine diseases by using high temperature treatment was mentioned in a book called 'Genetic and Evolutive Biology' published by Astaurov (1974), Institute of Evolutive Biology, Science Academy of U.S.S.R.. When the eggs laid by pebrinized silkworm mother moth for 24-54 hrs. were treated in 1.055 gravity HCl and kept at 46°C for 30 minutes, the control group was in 1.12 gravity HCl and kept at 30°C for 14 minutes, the results showed that when pebrine spores inspection was taken in these two treatments the average number of spores in the eye field among 90 units of inspection of the control group was 16.8 but among 168 units of inspection in the treatment group the number was only 0.05. It was obvious that 99.7 % of the pebrine spores within the eggs had been killed. This method has been tried in sericulture in the U.S.S.R.. Besides, the pupa was protected at a high temperature of 32-34°C or when the egg's age is 1.5-2.5 days using water treatment at 46°C for 90-150 minutes or at 48°C for 50-70 minutes or at 52°C for 4 minutes, both these treatments were able to inhibit the pebrine diseases at certain degrees.

The hot water treatment of polyvoltine eggs is a very popular method in Guangdong, China, for artificial hatching eggs and it has some efficiency in controlling the pebrine diseases. Howard (1925), Sericulture Department, LiangNan University ; GuiYingxing, Yang Bangjie (1933), Sericulture Department, ZhongShan University ; Lu Yuling *et al.* (1960), South China Agricultural University, have demonstrated the efficiency of hot water treatment in controlling the pebrine diseases in their research and experiments. Li Ai Qun (1962), Sericulture Insitute of GuangDong, also demonstrated the efficiency of hot water treatment in controlling the pebrine diseases of Eri silkworm.

The method in which the eggs are treated by raising the temperature to control the pebrine diseases in bivoltine race has been used in Guangdong, China, already. Liu Shixian (1980) took a research on treating the pebrinized eggs of 18 hrs. of age by using HCl of 1.03-1.09 gravity at 47°C for 10-20 minutes. The results showed that the percentage of pebrine spores in hatched larvae inspection of test group was reduced 97.4-100 % as compared to that of the control group. Lu H. *et al.* (1980), South China Agricultural University, treated the pebrinized eggs of 12-18 hrs. of age by using 48-50°C hot air for 40 minutes, it was able to inhibit the pebrine spores inside the diseased eggs, the chance the pebrine spores were inspected in hatched larvae was only 1 % or 0. All the methods mentioned above have been used in production with efficiency in controlling the pebrine diseases.

Griyaghey (1976), India Tasar Silkworm Research Station, Central Silk Board, took up research on the control of Tasar silkworm pebrine disease by using hot water treatment and obtained a good result.

An experiment by using high temperature treatment to a silkworm viral disease such as FV has been taken up by H. Inoue (1977), Department of Entomology and Parasitology, California University,

U.S.A., to know the efficiency and its pathological changes. The fourth instar larvae were inoculated with FV, five days later they were treated by transfer from 27°C to 37°C and reared for one day. The results showed that FV morbidity of the test group was 0, the cocooning percentage was 100 %, but the morbidity of the control group was 100 %. The observation by electromicroscopy indicated that the FV in the globular cells were inhibited obviously. This experiment has opened a new way in the physical control of FV disease.

All the research mentioned above indicated that the physical treatment is one of the good channels to control silkworm diseases.

IV. THE INTERFERENCE AMONG DIFFERENT VIRUS STRAINS AND VIRAL IMMUNITY

Since the information that NPV vaccine had a certain efficiency had been reported by K. Aizawa (1954), a serial research concerning the interference among different kinds of silkworm viruses such as NPV, CPV, FV and TNV (midgut nuclear polyhedrosis virus) or among Mc (triangle), Tc (tetragon) and Hc (hexahedron) of CPV were conducted by H. Aruga *et al.* (1960-1971), the results indicated that the CPV can be interfered by NPV, TNV or FV. The interference also appeared among the Mc, Tc and Hc of CPV strains. Based on this research, they used an inactive viral strain which was treated by a high temperature such as 85°C for 15 minutes or UV of 100 V, 6A at the distance of 30 cm for 2 hrs. to interfere the active viral strain, it was able to reduce the disease coefficient by 30-50 %. A similar experiment to determine the CPV immunity efficiency was conducted by Liu S.X. *et al.* (1972-1977), the CPV polyhedrons were treated by 0.114 M Na₂CO₃ (pH 10.35) at 27°C for 24 hrs. to make the polyhedrons dissolve slowly, then 0.02 % formalin was added to inactivate them at 27°C for 28-36 hrs.. This inactive CPV vaccine was fed to the newly hatched larvae. After 24 hrs., another active CPV was fed to these worms again as a toxic attacking, ten days later the CPV morbidity was investigated, it showed that the average of silkworm disease coefficient in the group fed on inactive CPV was generally reduced by 50-60 % as compared to that of the control group. This method was appraised in production with 18,408 egg cards rearing from 1975-1977, the average of immunity efficiency obtained (means reducing disease coefficient) was 40-50 %.

A research concerning the fundamental immunity of silkworm CPV disease was taken by Payne (1974), Invertebrate Virus Group of Environmental Research Council, U K, he determined the immunity activity of silkworm CPV disease by using radio immunity determination method. A low titre dsRNA antibody was discovered in the haemolymph of the CPV diseased worms, the dilution titres of antiserum were between 1,320 to 20,480. By the detection using radio immunity method to check what the activity of the antiserum was, it was showed that more than 90 % of active virus particle was limited, this research result was approximately similar to that of immunity efficiency mentioned above.

Concerning the immunity experiment of bacterial diseases of silkworms, a lot of work had been done by S. Masao, C. Yoshika *et al.* (1930) in Japan, but it was stopped later Chadwick (1971) even took up an experiment in which the galls were inoculated with one kind of *Pseudomonas* under the skins, the results in 8 times repeated experiment showed that the LD₅₀ was heightened about 118.5-3804.5 times as compared to that of the group treated by formalin, it showed the obvious immunity efficiency.

Based on the principle in medicine that the viral diseases can be controlled by using interferon or inducer of interferon, Zhong W. *et al.* (1981-1985) have conducted a serial experiment of trial use of Poly I:C, an interferon inducer, and 2',5' -Oligo (A), an intermediate of interferon, to feed or inject into the silkworms for the purpose of controlling the CPV disease, it was discovered that both these two kinds of drugs were able to inhibit the silkworm disease morbidity by about 40-60 %. A series of biochemical analyses using haemolymph or midgut extract from the silkworms treated by Poly I:C for electrophoresis showed that Poly I:C was able to induce the silkworm to produce some protein bands which related to the antiviral characteristic of the silkworm and increased the worm's peroxidase isoenzyme activity, these results indicated that the silkworm probably had such a system which responded to Poly I:C or 2',5' -Oligo (A) to induce silkworms to have an antiviral activity.

It is a fact that the viral immunity characteristic of the silkworm still has much unstable factors. It is said that the acquired immunity characteristic in the insect is very short and weak, as in the experiment mentioned above, the immunity phenomenon in the silkworms is also unstable, so that controlling the viral diseases by using the immunity method would still be very difficult, yet it is one of the channels in controlling the silkworm diseases and needs further research.

V. THE MALE STERILITY OF THE UJIFLY OF SILKWORMS

Great progress has been made in the research to control the insect pest in agriculture using male sterility method for many years. Rajat *et al.* (1978), Sericulture Research Station, Central Silk Board, India, have conducted a research on the use of Tapa (Triethylenephosphoramidate) and Thiotapa (Triethylenethiophosphoramidate) to make the Ujifly sterile, the results showed that if Ujiflies were fed with 0.02-0.04 % Tapa or Thiotapa, both the female and the male flies would become sterile but their activity was not affected. However if the female flies were fed with drug of higher concentration their amount of eggs would decrease. In an experiment in which the eggs were incubated continuously for 9 days if the female flies were fed with 0.05 % sterility drug, they would not recover their fertility even in the next generation. In laboratory conditions, if the ratio of sterile male flies and normal flies is 5:1, it will make all the female flies become sterile. So it was thought that to propagate the male sterile flies by using artificial method and release them in the silkworms rearing area and keep the ratio of male sterile flies and natural normal flies to be 5:1, then all the damage by the Ujifly within the sericulture area would be put under control.

Another research using the ionizing radiation method to make the Ujifly become sterile was conducted by Lu Y., Huang Z. *et al.* and gave a good result.

If the male sterility method mentioned above is practically useful, in the concentration silkworm rearing areas in which some specific persons in the villages are designated to engage in male sterile Ujifly propagation and release them, a good result in controlling the damage of Ujiflies could be achieved.

VI. IMPROVEMENT OF DISINFECTANTS

Disinfection is an essential measure in the prevention and control of silkworm diseases. Although since the second half of the century there has been a lot of disinfectants with different commercial trademarks on the market, the basic component of them are still the formalin or effective chloride, the difference among them is just some kinds of synergist to be added into them to increase and improve their disinfective efficiency.

S. Utsumi (1966) made a research concerning the disinfection effect of β -Propiolactone on silkworm pathogens and its application in silkworm rearing, this drug was directly made by ketene combined with formalin, its liquid form is stable when kept at 5-10°C. H. Kobayashi (1968) also made a research on the disinfection effect of the mixture of high concentration bleaching powder and formalin. Many experiments and tests for disinfectants were conducted in China, for instance, the Sericulture Institute of the Chinese Academy of Agricultural Sciences manufactured the Folpet, an anti-muscardine powder, and 'You Lu Jing', etc. (1976). Zhejiang Sericulture Institute (1974) certified the advantages of using 'Anti-disease I' for its high efficiency, safety, convenience, etc., in their experiments. Tan Z. (1976) *et al.*, Shan Dong Sericulture Institute, manufactured dichloroisocyanurate, its effective chloride content was heightened obviously. Fang D. *et al.* (1977), Guangdong Sericulture Institute, tried to use sodium hypochlorite, which is a waste, liquid formed by-product of the chemical manufacturer, as a disinfectant to kill the silkworm's pathogens, the result was a very good efficiency, especially to Sototo endotoxin. In cooperation with Huang Q., Zhongshan University, he also manufactured trichloroisocyanurate and determined its ability to disinfect various kinds of silkworm pathogens, it showed very good efficiency to many kinds of pathogens but less effect to CPV.

Based on the principle that disinfection is an essential measure for the prevention and control of silkworm diseases, it is a major task to make further research to explore and manufacture the new

disinfectants which are wide and efficient, with a low concentration, stable, of non-erosion or non-stimulation to human being and livestock.

VII. THE QUARANTINE OF SILKWORM DISEASES

The quarantine of silkworm diseases is an essential step to prevent the embryonic infection of pebrine disease, a corresponding measure for disease prevention should be adopted according to the results of predictive inspection of pebrine disease. So that the quarantine of silkworm diseases is also a major subject in disease prevention.

K. Ohshima (1968) had a suggestion to improve the mother moth inspection method about pebrine disease according to the characteristics of the early emergence of the pebrinized moths. A cytological research on the developing cycle of the pebrine spores taken up by H. Takisama (1975) was a fundamental work for the quarantine of pebrine disease. Recently the machines for pebrine spores inspection of mother moth have been improved and created. There are model 'Heiya', model 'Higuchi', etc., machines for moth grinding for sale on the Japanese market, they can be used for grinding, filtering, centrifugating, tool washing, etc.. Their working efficiency can be raised by many times, but they are very expensive.

Recently, the predictive inspections of silkworm diseases have been improved, such as the determination of CPV concentration by using serological and haemagglutination method (S. Miyajima *et al.*, 1976). The serological diagnosis of FV disease (Y. Sekijima, 1971); simple histological diagnosis of FV disease (Y. Iwashita, 1969); isolation of *Bacillus thuringiensis* strain from the dirt of a farmer's house (K. Aisawa, 1961; Y. Ishikawa, 1964); the aspergillus inspection by means of the stamp agar inside the rearing room (K. Kawakama, 1975); the research on CPV diagnosis using reversion agglutination method (Huang K. *et al.*, 1979); the serological research on CPV disease (Hu X. & Qian Y., 1979), etc..

DNV is a viral disease whose recent discovery dates from the present decade. The symptoms of the diseased worms and the morphology of the virus are very similar to that of FV disease, it is difficult to make a correct diagnosis by using the ordinary method. Recently the serological research on DNV diagnosis has made great progress, such as the agar column immunodiffusion method in DNV diagnosis (Chen C., 1987). The observation of pathological changes of DNV and FV diseased worm's midgut by peroxidase antiperoxidase complex method (Wang Y. *et al.*, 1988), BAS-ELISA method in DNV diagnosis (Shi L. *et al.*, 1988). The research of DNV monoclonal antibody (Chen J., *et al.*, 1988).

The pebrine disease predictive inspection and early diagnosis have been in a new development recently, such as the fluorescent antibody for pebrine spores diagnosis (R. Sato, 1981), (Huang Z. *et al.*, 1982), the slide haemagglutination of pebrine disease diagnosis (Li D., 1984), the plasol agglutination diagnosis of pebrine disease (C. Ayuzawa, 1986), ELISA diagnosis of pebrine disease (See Hitoshi Watanabe, article 1987), the research on pebrine spores monoclonal antibody and its use in diagnosis (Chen J. *et al.*, 1988).

During the current decade, with the permeation and enhancement of other outstanding techniques, the predictive diagnosis of viral diseases and pebrine disease has made great progress. The methods mentioned above are only some examples, these methods can be widely used in correct diagnosis of pathogens and to know the possibility of cross infection among different kinds of insects or animals, it will help the research of silkworm infectious disease epizootiology. However many of these methods are just research measures suitable for laboratory. The ordinary method is still needed for larger scales of inspection in production. For example the ordinary microscopy still can not be discarded in pebrine spores inspection. How to find out a method which is more convenient and useful for quarantine in large-scale production still requires a greater effort in research on our part.

VIII. THE RELATION BETWEEN SILKWORM REARING TECHNIQUES AND DISEASE PREVENTION

The rearing techniques and disease prevention are closely related. Applying the rearing measures which are most suitable to the silkworms' development, heightening the worm's constitution and disease-resistance ability is still the essential policy for the rearers.

S. Ueda (1976-1977) thought that over the past thirty years half the work on rearing technique research in Japan was to make silkworm rearing crops stable. In general the occurrence of unstable silkworms in farms was due to the fact that the worms were under microinfection, poor quality of mulberry leaves, and bed microenvironmental conditions, all of which would expedite disease occurrence.

Krishnaswami (1978), Sericulture Research & Training Institute, Central Silk Board, India, said that keeping the suitable temperature and humidity, especially humidity in the rearing bed, selecting the right quality mulberry leaves, making a flexible measure in mulberry feeding and suitable space for the rearing bed, etc., will be greatly helpful in silkworm disease prevention.

The Cash Crop Division of Guangdong Agricultural Bureau, China, has designed some technical measures to control the occurrence of silkworm diseases such as 'Ten measures for diseases prevention in silkworms rearing', 'The suitable distribution of rearing room', 'The separating rearing in young-aged worms, middle-aged worms and grown-up worms', etc.. All these measures are efficient in sericulture production.

Further research is necessary in order to improve silkworm rearing measures.

IX. THE RELATION BETWEEN THE EQUIPMENT AND DISEASE PREVENTION

With the development of modern industry, science and technology, it is possible to provide an optimum ecological environment for silkworm rearing and to separate the silkworm from the pathogens by using modern equipment, so as to carry out the aim of disease prevention.

If we can use the phytotrons and air-conditioning in silkworm rearing it will be possible to keep a comfortable environment with the optimum temperature, humidity and ventilation in the rearing room, thus not only can we have a good harvest crop from the silkworms which are impossible to rear well under the previous poor environment but also the occurrence of disease is decreased to some extent. The use of disinfected tools and aseptic equipment is possible to keep the rearing room in a situation which is free from bacteria and pathogens relatively, thus it is possible to control completely infectious silkworm diseases.

Feeding artificial diet is also an effective technique to prevent diseases, not only can it prevent oral infection diseases through the mulberry leaves which were contaminated by pathogens but also some kinds of drug can be added to it for the purpose of curing the diseases, this method is not like the situation of sprinkling drug over the mulberry leaves from which more water will be taken by the worms and more labour will be needed to feed them many times.

Due to the application and popularization of artificial diet in sericulture, the chemical treatment of silkworm diseases will be more and more important, as in the experiment mentioned above. It was demonstrated that 0.1-0.01 % of bavistin added to the artificial diet was able to cure completely the pebrine diseased worms infected by embryonic infection.

X. RESEARCH PROSPECTS IN THE PREVENTION AND CONTROL OF SILKWORM DISEASES

The advance of research in the prevention and control of silkworm disease has recently had a close relation to the development of other subjects. With the progress of microbiology, immunology, virology, molecular biology, gene engineering, etc., a great enlightening and enhancing has been brought to silkworm disease research. The authors thought that in order to make a great advance in the research of silkworm disease prevention and control, it is necessary to use the outstanding

biological techniques. For example in the project of silkworm disease-resisting breeding, besides the ordinary methods such as selective breeding in hybridized progeny, directive breeding, etc., we can use the gene engineering technique to identify, isolate, purify and clone the disease-resistant genes from different anti-disease varieties, the anti-disease genes (DNA fraction) are injected into the embryo or the worm's ovaries by using different methods such as using the microinjector or micromanipulator to make the gene transplant from one variety to another so that we can obtain a new mutation with a disease-resistant gene.

Concerning the prevention and control of viral diseases the research on the structures of viral particles has recently been conducted on the molecular level, it will be very helpful to the virological and immunological research of silkworms.

However, the silkworm is a kind of insect. Owing to its very short life cycle and a lack of acquired immunity characteristics similar to that of vertebrates, or its acquired immunity phenomenon is only for a very short time, it is very difficult to obtain a vaccine whose function would be similar to that of vertebrate vaccine to control diseases. The authors thought that further research on silkworm virus replication, propagation, mechanism of infection, molecular conformation of the viral capsid protein, etc., if we can design some kind of drugs which would be able to inhibit the one step of the viral protein translation, composition, assemblage or invasion in the host cells, it will become possible to cure viral diseases. Rossmann Laboratory has recently finished a research on the protein crystal structures of Nose Influenza Virus-14. It was discovered that the protein of the viral capsid has a narrow invaginated portion which is just the receptor of the virus when the virus attacks the host cells. It is possible to design some material with a small molecule which can enter the invaginated portion to block the virus attacking the host cells, this molecule is the basic structure of the drug which is able to cure the viral disease. This method is a good example for us of the research on the virus-resistant drug of the silkworms. (Reference: 'The crystal-structure analysis in biological macromolecules', Li Jiayiao, 1987).

REFERENCES

- AIZAWA K. *et al.* (1954), J. Seric. Sc. Japan, 24, 398-399.
 AIZAWA K. *et al.* (1969), J. Seric. Sc. Japan, 38, 451.
 ARUGA H. *et al.* (1961-1965), J. Seric. Sc. Japan, 30(2), 23, 32(2), 51-57, 34(5), 351-354.
 AUTAUROU B.L. *et al.* (1974), Inst. Develop. Biol., Acad. Sci., USSR.
 AYUZAWA C. *et al.* (1986), Sc. & Techn. of Seric., Japan, 8, 52-55.
 BROOKS W. M. *et al.* (1978), J. inverteb. Path., 31, 239-245.
 CASH CROPS DIVISION OF GUANGDONG AGR. BUREAU (1961), Information of Seric., Guangdong, China, 1961, 3, 1-2.
 CHADWICK J. S. *et al.* (1971), J. Seric. Sc. Japan, 41, 154.
 CHEN C. (1978), Sc. of Seric., China, 14(1), 39-42.
 CHEN J. *et al.* (1988), Sc. of Seric., China, 14(3), 168-170.
 CHEN J. *et al.* (1988), Abst. of Conference on silkworm viral diseases, Guangzhou, China, 1988, p. 16.
 FANG D. *et al.* (1977), Information on Seric., Guangdong, China, 1981, 2, 21-27.
 FANG F. *et al.* (1988), Abst. of conference on Silkworm viral diseases, Guangzhou, China, 1988, p. 56-61.
 GRIYAGHEY U.P. (1976), J. Seric., India, 15(1), 27-30.
 HSIAO T.H. *et al.* (1973), J. inverteb. path., 22, 303-304.
 HU X. *et al.* (1984), Sc. of Seric., China, 10(2), 87-90.
 HUANG J. *et al.* (1974), Sc. of Seric., China, 5(3), 146-151.
 HUANG K. *et al.* (1979), Sc. of Seric., China, 5(2), 28-33.
 HUANG Z. *et al.* (1982), Sc. of Seric., China, 9(1), 59-60.
 HUANG Z. *et al.* (1985), Information of Seric., Guangdong, China, 1985, 2, 1-6.
 INOUE H. (1977), J. Seric. Sc. Japan, 46, 306-312.
 ISHIKAWA Y. *et al.* (1964), J. Seric. Sc. Japan, 33, 480-482.
 IWASHITA Y. *et al.* (1969), J. Seric. Sc. Japan, 38, 64.

- KAWAKAMI K. *et al.* (1975), *J. Seric. Sc. Japan*, 44, 327-332.
- KOBAYASHI H. *et al.* (1968), *J. Seric. Sc. Japan*, 37(4), 311-318.
- KRISHNASWAMI *et al.* (1978), *J. Seric.*, India, 10(1), 72-78.
- LI A. (1963), The proceedings of conference of sericulture community, China, p. 198.
- LI D. *et al.* (1984), *Sc. of Seric.*, China, 11(2), 99-102.
- LIJ. (1987), The crystal structure analysis in biological macromolecules. Published by Sichuan Educational Publishing Hse., China, p. 79-82.
- LIU S.X. *et al.* (1981), Information of seric., Guangdong, China, 1981(2), 27-34.
- LIU S.X. *et al.* (1979), *Sc. of Seric.*, China, 7(1), 63-64.
- LIU S.X. *et al.* (1979), *Sc. of Seric.*, China, 5(2), 22-27.
- LIU S.X. *et al.* (1979), *Sc. of Seric.*, China, 5(4), 223-231.
- LU H. *et al.* (1981), Information of Seric., China, Guangdong, China, 1981(2), 21-27.
- LU Y. *et al.* (1981), *Sc. of Seric.*, China, 7(2), 95-99.
- MASAO S., YOSHIKA C. (1930), *J. Seric. Sc. Japan*, 1, 154, 214, 234, 310, 323, etc.
- MIYAJIMA S. *et al.* (1966), *J. Seric. Sc. Japan*, 35, 253-256.
- MIYAJIMA S. *et al.* (1976), *J. Seric. Sc. Japan*, 45, 245-250.
- OHSHIMA K. *et al.* (1968), *J. Seric. Sc. Japan*, 37, 17-26.
- PAYNE C.C. (1974), *Inter virology*, 4(6), 365-368.
- RAJAT DATTA K. *et al.* (1978), *J. Econ. Entomol.*, 71(2), 373-376.
- REIJIRO K. *et al.* (1972), *J. Seric. Sc. Japan*, 41, 7-14.
- SATO R. *et al.* (1981), *J. Seric. Sc. Japan*, 50(3), 180-184.
- SEETHARAMA IYENCAR M.N. *et al.* (1988), Silk worm rearing practices in tropics. International congress on tropical sericulture practices, Bangalore, India.
- SEKIJIMA Y. *et al.* (1971), *J. Seric. Sc. Japan*, 40, 49-55.
- SHI L. *et al.* (1988), Abstr. of conference on silkworm viral diseases, Guangzhou, China, p. 31.
- TAKIZAWA H. *et al.* (1975), *Annot. Zool. Japan*, 48(1), 21-33.
- TAN Z. *et al.* (1979), *Sc. of Seric.*, China, 5(3), 175-178.
- UEDA S. (1976-1977), *J. Seric. Sc. Japan*, 38, 264, 44, 259-266.
- UTSUMI S. *et al.* (1966), *J. Seric. Sc. Japan*, 35, 393-398.
- WANG Y. *et al.* (1988), *Sc. of Seric.*, China, 14(3), 146-149.
- WATANABE H. (1987), *J. Seric. Japan*, 56(5), 431-435.
- ZHONG W. *et al.* (1988), *Sericologia*, 28(3), 361-373.

LES VOIES DE RECHERCHES SUR LA PREVENTION ET LA LUTTE CONTRE LES MALADIES DU VER A SOIE

LIU S.X.* et ZHONG W.B.**

* Academy of Agricultural Science, Province de Guangdong, Guangzhou, Chine.

** Regional Sericultural Training Centre for Asia-Pacific South China Agricultural University, Guangzhou, Chine.

Le but final de la recherche sur les maladies du ver à soie est de découvrir les voies et les méthodes de prévention et de lutte contre l'existence de ces maladies. Avec les progrès de la recherche sur les maladies du ver à soie jusqu'à la fin des années 80, les techniques de prévention et de lutte se sont développées dans des directions diverses. Certaines d'entre elles ont été mises en pratique dans la production, d'autres sont à l'essai. Cet article établit une description générale de la situation actuelle des voies de recherche sur la prévention et la lutte contre les maladies du ver à soie.

I. L'UTILISATION DE VARIETES ANTI-PATHOGENES

Aucune mesure particulière ni aucun réactif chimique ne sont nécessaires dans l'utilisation de variétés résistantes pour prévenir les différentes sortes de maladies. De plus, cette méthode permet d'économiser main d'oeuvre, matériel et dépenses, de réduire la contamination de l'environnement, et a un effet préventif probant. Elle peut donc être facilement acceptée, utilisée et vulgarisée. Durant ces dernières années, on a accordé beaucoup d'importance à la recherche sur l'élevage de variétés résistant à la maladie, et cette recherche a donné des résultats positifs dans le domaine de l'agriculture.

Des chercheurs japonais ont conclu que diverses races de vers à soie avaient des résistances différentes à diverses maladies. Cette résistance ne concerne pas seulement plusieurs genres de maladies virales telles que NPV, PCV, FV, DNV et SVF (virus de la petite flacherie), mais aussi la muscardine blanche, l'aspergilliose, la pébrine, etc. Le fait que les vers à soie offrent une résistance différente aux maladies indique qu'il existe diverses sortes de gènes anti-pathogènes ou de gènes sensibles à la maladie chez différentes races de vers à soie. Aussi, cela permet de réunir suffisamment de matière première pour la recherche génétique dans l'élevage de variétés anti-pathogènes. Jusqu'à présent, des unités d'élevage au Japon ont élevé certaines variétés résistant à diverses maladies. Suivant les situations épidémiques de différents endroits et de différentes saisons, sont utilisées diverses variétés qui peuvent résister à diverses sortes de maladies, de sorte que les maladies épidémiques ont pu être maîtrisées.

Des recherches sur les élevages résistants ont également été entreprises dans plusieurs instituts séricoles de Chine. Dès 1964, Lu Hongsheng et coll. sont arrivés à la conclusion que diverses variétés de vers à soie avaient aussi des résistances diverses au NPV. En 1974, Huang Junting a montré que diverses variétés avaient une résistance différente au CPV. Le Zhejiang Sericulture Institute (1978) a réalisé une recherche détaillée sur la capacité de résistance au FV chez différentes variétés, une expérience similaire a également été réalisée par le Shanxi Sericulture Institute. Le Guangdong Sericulture Institute (1978-1979) a mené des recherches répétées afin de comparer la capacité des variétés de vers à soie à résister au NPV, au CPC, à la toxine de Sotto, à la pébrine, etc. Il fut conclu que diverses variétés avaient des résistances diverses à environ quatre sortes de maladies. Un lot de variétés avec différents gènes résistants a été sélectionné puis utilisé comme matériel d'élevage

antipathogène. Hu Xuegang et coll. ont fait une analyse du pouvoir génétique d'une série de variétés de vers à soie afin de comparer leur capacité anti-DNV et ont suggéré que la capacité anti-DNV est contrôlée par une paire de gènes récessifs chez certaines variétés de vers à soie.

La Chine est l'un des berceaux de la sériciculture, avec une longue histoire, de vastes étendues consacrées à la sériciculture et de riches sources de variétés de vers à soie. Elle réunit donc les meilleures conditions pour la recherche de gènes anti-pathogènes chez les vers à soie. Afin d'accélérer les démarches dans la recherche et l'élevage de variétés anti-pathogènes, il est utile de suivre les conseils suivants :

- 1) Choisir d'excellentes variétés avec des voltinismes, des systèmes et des gènes anti-pathogènes différents comme matériel d'élevage de variétés anti-pathogènes au moyen de l'évaluation générale.
- 2) Entreprendre des recherches sur la régulation génétique des variétés anti-pathogènes pour disposer d'une base théorique et d'une méthode d'élevage anti-pathogène.
- 3) Suivre différentes méthodes pour élever les nouvelles variétés aux caractéristiques anti-pathogènes et répondre aux besoins de la production séricicole.

Récemment, la Chine a obtenu des résultats tout à fait positifs dans le domaine de l'élevage anti-DNV. On a sélectionné comme matériel de base un lot de variétés avec différentes caractéristiques anti-pathogènes, et des variétés anti-pathogènes ont été obtenues. Fang Feifang et coll. (1984-1987) ont utilisé le n° 7532 comme matière première, celui-ci étant plus sensible au DNV, et ont inoculé le DNV aux larves de chaque génération, puis effectué une sélection, une évaluation et une élimination sur six générations. Ils ont obtenus la variété Kang 1 qui possède des caractéristiques anti-DNV. Par la propagation sur plusieurs générations et l'inoculation de DNV pour tester la toxicité et confirmer les caractéristiques anti-pathogènes, le groupe témoin a donné une morbidité de 100 % tandis que Kang 1 a donné une morbidité s'élevant seulement de 3,4 à 19,5 %. Il est évident que le dernier groupe présente des caractéristiques anti-DNV. Afin d'accélérer les démarches de l'élevage anti-pathogène, il est possible d'utiliser le génie génétique. Huang Ziran et coll. (1985-1987) ont effectué des recherches sur le clonage d'ADN extrait d'oeufs de la variété Bai Pi, race anti-pathogène, puis injecté cet extrait dans les ovaires de différentes variétés telles que Dong 34, Qiong Shan Hai Han, etc. Ils ont obtenu une nouvelle mutation, Dong Ji 1, avec des caractéristiques anti-pathogènes ; il a été conclu, après l'analyse des isozymes des lipases de l'hémolymph des larves de l'hybride F₁, que les gènes ont été transférés d'une variété à l'autre.

II. LES MALADIES DU VER A SOIE TRAITEES PAR PROCEDES CHIMIQUES

Autrefois, la lutte contre les maladies par traitement chimique était considérée comme irréaliste. Cependant, avec le développement récent de la pathologie des vers à soie, ces méthodes ont permis d'importants progrès. Certaines d'entre elles ont été utilisées pour la production, d'autres ont donné des perspectives intéressantes.

Depuis les années 70, la recherche et l'exploration du traitement chimique ont été utilisées pour prévenir et lutter contre les maladies virales et la pébrine. S. Miyajima (1966) a découvert que le 5-fluorouracil inhibait le FV de manière efficace. K. Reijiro (1972) a conclu que la leucomycine et la fructosazine contrôlaient le VF de manière efficace. Les vers à soie ont été nourris de leucomycine mélangée à de la fructosazine afin de maîtriser le CPV et le NPV ; cela a également donné des résultats positifs. Depuis la découverte faite par Hsiao (1973) que le benlate permettait de guérir de manière efficace de la pébrine Alfalfa Weevil, W.M. Brooks et coll. (1978) ont démontré que le benlate avait la propriété de guérir le ver jaune à viande, la mouche à viande et le perce-oreille du blé, de la pébrine. Liu Shixian et coll. (1979) ont également conclu que le benlate et la bavistine avaient la propriété de

maîtriser la pébrine du ver à soie *Bombyx mori* L. et du ver à soie Eri, et ont découvert que sept sortes d'analogues avec la structure benzimidazole étaient également efficaces contre la pébrine du ver à soie. Cette même propriété a été démontrée avec la bavistine pour les maladies de la pébrine qui étaient transmises par l'embryon. Les larves qui avaient été pébrinisées par transmission embryonnaire, nourries par régime artificiel comprenant 0,1 mg/g de bavistine ont guéri. De plus, Helms (1979) a découvert que la toxine de B.t. (*Bacillus thuringiensis*) avait la propriété d'éliminer la pébrine chez le ver gris à tête jaune. L'observation histologique a montré que les spores de pébrine et les mérones des cellules épidermiques de l'intestin moyen du ver gris à tête jaune diminuaient puis disparaissaient de manière significative sous l'action de la toxine de B.t. Il est donc possible, grâce à des méthodes chimiques, de mettre à jour une autre formule chimique qui inhibe la pébrine de manière efficace. Une expérience fondamentale réalisée par Liu Shixian a montré que la toxine de B.t. avait la propriété de neutraliser les spores de pébrine, mais que la concentration en toxine de B.t. que peut supporter le corps du ver à soie était très faible (environ 10 ppm) ; de fait, il a été très difficile de mesurer l'efficacité du traitement.

Récemment, l'Inde a accompli d'importants progrès en ce qui concerne la lutte contre la mouche Uzi par traitement chimique. Une drogue appelée Uzicide a été vaporisée sur le corps du ver à soie afin de tuer les oeufs de la mouche Uzi attachés à la surface du corps (M.N. Seetharama et coll.).

D'une façon générale, les résultats des recherches mentionnées ci-dessus sont insuffisants et doivent être améliorés. La raison principale en est que le laps de temps durant lequel ces produits chimiques restent dans le corps du ver à soie est très court. Aussi, il faut appliquer le réactif quotidiennement, ce qui crée beaucoup de problèmes pour l'élevage des vers à soie et est également néfaste pour leur santé. C'est pourquoi certaines de ces méthodes ne sont pas facilement applicables dans la production. Cependant, il est indéniable que les recherches citées constituent une voie et une possibilité de prévention et de lutte contre les maladies du ver à soie.

III. LES MALADIES DU VER A SOIE TRAITEES PAR PROCEDES PHYSIQUES

D'important progrès ont récemment été accomplis pour maîtriser les maladies du ver à soie en utilisant des facteurs physiques. Mais ces facteurs physiques sont limités au traitement à haute température, aucune recherche n'a été effectuée sur l'utilisation d'autres facteurs pour maîtriser les maladies.

L'une des nouvelles méthodes de contrôle de la pébrine par traitement à l'air chaud a été abordée dans un ouvrage intitulé "Genetic and Evolutive Biology", publié par Astaurov (1974), Institute of Evolutive Biology, Science Academy of U.S.S.R.. Lorsque, d'une part, des oeufs pondus par un papillon pébrinisé pendant 24 à 54 heures ont été traités dans de l'HCl de densité 1,055 et maintenus à 46°C pendant 30 minutes, et, d'autre part, le groupe témoin a été traité dans de l'HCl de densité 1,12, puis maintenu à une température de 30°C pendant 40 minutes, les résultats ont montré que le nombre moyen de spores dans le champ du microscope était de 16,8 chez le groupe témoin (90 unités d'inspection) et de 0,05 chez le groupe traité (168 unités d'inspection). Il est évident que 99,7 % des spores de pébrine à l'intérieur des oeufs avaient été tués. Cette méthode a été mise à l'essai en U.R.S.S. dans le domaine séricicole. En outre, la chrysalide est protégée à des températures élevées de 32 à 34°C ou alors quand les oeufs de 1,5 à 2,5 jours sont trempés dans l'eau à 46°C pendant 90 à 150 minutes, à 48°C pendant 50 à 70 minutes ou à 52°C pendant 4 minutes. Ces deux traitements ont, dans une certaine mesure, permis d'enrayer la pébrine.

Le traitement à l'eau chaude des oeufs polyvoltins est une méthode fréquemment utilisée à Guangdong (Chine) pour faire éclore artificiellement les oeufs, et elle permet effectivement de lutter dans une certaine mesure contre la pébrine. Howard (1925), Sericulture Department, LingNan University ; Gui Yingxing, Yang Bangjie (1933), Sericulture Department, ZhongShan University ;

Lu Yuling (1960), South China Agricultural University, et coll. ont démontré, dans leurs recherches et leurs expériences, l'efficacité du traitement à l'eau chaude dans la lutte contre la pébrine. Li Aiqun (1962), Sericulture Institute of Guangdong, a également démontré l'efficacité du traitement à l'eau chaude contre la pébrine du ver à soie Eri.

La méthode qui consiste à traiter les oeufs en augmentant la température pour lutter contre la pébrine chez les races bivoltines a déjà été utilisée à Guangdong. Liu Shixian (1980) a entrepris des recherches sur le traitement d'oeufs pébrinisés âgés de 18 heures en utilisant de l'HCl d'une densité de 1,03 à 1,09 à une température de 46°C pendant 10 à 20 minutes. Les résultats ont montré que le nombre de spores de pébrine lors de l'inspection des larves écloses du groupe traité avait diminué d'environ 97,4 à 100 % par rapport au groupe témoin. Lu Heming et coll. (1980), South China Agricultural University, ont traité des oeufs pébrinisés âgés de 12 à 18 heures au moyen d'air chaud à une température de 48 à 50°C pendant 40 minutes. Ce traitement a permis d'inhiber les spores de pébrine à l'intérieur des oeufs malades, la possibilité de trouver des spores de pébrine dans les larves écloses étant de 1 % ou nulle. Toutes les méthodes mentionnées ci-dessus ont été utilisées dans la production et ont permis de maîtriser de manière efficace la pébrine.

Griyaghey (1976) - Indian Tasar Silkworm Research Station, Central Silk Board - a effectué des recherches sur la lutte contre la pébrine chez le ver à soie tasar par traitement à l'eau chaude et a obtenu de bons résultats.

H. Inoue (1977) - Department of Entomology and Parasitology, California University, Etats-Unis - a réalisé une expérience de traitement à l'air chaud contre la maladie virale FV du ver à soie afin d'étudier son efficacité et les changements pathologiques. On a inoculé le FV à des larves du V^e âge, cinq jours plus tard, elles ont été traitées par transfert de 27 à 37°C et conservées pendant une journée. Les résultats ont montré que la morbidité du groupe traité due au FV était nulle et le pourcentage de coconnage de 100 %. L'observation au microscope électronique a indiqué que le FV dans les cellules globulaires avait été inhibé de manière évidente. Cette expérience a permis d'ouvrir une nouvelle voie en matière de traitement physique de la maladie du FV.

Toutes les recherches mentionnées ci-dessus indiquent que le traitement physique constitue l'une des voies efficaces pour le contrôle des maladies du ver à soie.

IV. L'INTERFERENCE PARMIS DIVERSES SOUCHES DE VIRUS ET L'IMMUNITE VIRALE

Depuis que K. Aizawa (1954) a fait savoir que le vaccin NPV était relativement efficace, une série de recherches portant sur l'interférence parmi diverses sortes de virus du ver à soie tels que NPV, CPV, FV et NTV (polyédrose nucléaire de l'intestin moyen) ou le Mc (triangle), le Tc (tétragone) et le Hc (hexaèdre) du CPV a été menée par H. Aruga et coll. (1960-1971). Les résultats obtenus ont montré qu'on pouvait interférer l'action du CPV avec le NPV, le NTV ou le FV. Une interférence a également été décelée entre le Mc, le Tc et le Hc des souches de CPV. Sur la base de ces travaux, ils ont utilisé une souche virale inactive traitée à une température élevée de 85°C pendant 15 minutes ou par ultraviolets à 100 V., 6 A. à une distance de 30 cm pendant deux heures afin d'interférer avec la souche virale active. Ce traitement a permis de réduire le coefficient de maladie de 30 à 50 %. Une expérience similaire visant à déterminer l'efficacité de l'immunité au CPV a été menée par Liu S.X. et coll. (1972-1977) ; les polyèdres de CPV ont été traités par du Na₂CO₃ (PH 10,35) à 0,114 M à 27°C pendant 24 heures pour leur permettre de se dissoudre lentement, puis on a ajouté 0,02 % de formol afin de les neutraliser à 27°C pendant 28 à 36 heures. On a alimenté les larves nouvellement écloses avec ce vaccin inactif. Puis, après 24 heures, on a donné à ces mêmes vers un autre CPV actif comme agent toxique. Dix jours plus tard, on a étudié la morbidité au CPV. La moyenne du coefficient

de maladie du ver à soie dans le groupe nourri au CPV inactif était généralement réduite de 50 à 60 % par rapport au groupe témoin. Cette méthode a été évaluée dans la production avec un lot de 18 408 oeufs élevés de 1975 à 1977, la moyenne de l'efficacité de l'immunité obtenue (moyenne de réduction du coefficient de maladie) a été de 40 à 50 %.

Payne (1974) - Invertebrate Virus Group of Environmental Research Council, Royaume-Uni - a réalisé une étude fondamentale sur l'immunité du ver à soie à la maladie du CPV. Il a pu déterminer l'activité d'immunité à la maladie du CPV du ver à soie par la méthode radio-immunologique. On a découvert un anticorps anti-dsARN à titre très faible dans l'hémolymphe des vers atteints de CPV, les titres de dilution de l'antisérum s'échelonnant de 1 320 à 20 480. La détection par la méthode radio-immunologique afin de contrôler l'activité de l'antisérum a montré que plus de 90 % des particules du virus actif étaient inhibées ; les résultats de ces recherches sont à peu près identiques à ceux concernant l'efficacité de l'immunité mentionnés plus haut.

De nombreux travaux ont été effectués par S. Masao, C. Yoshika et coll. (1930) au Japon dans le domaine de l'immunité aux maladies bactériennes des vers à soie, mais ces travaux ont été abandonnés par la suite. Au cours d'une expérience, Chadwick (1971) a inoculé un type de *Pseudomonas* sous la peau des galles ; les résultats de l'expérience répétée huit fois ont montré que la DL₅₀ avait augmenté de 118,5 à 3 804,5 fois par rapport au groupe traité au formol. L'efficacité de l'immunité est donc bien démontrée.

Suivant le principe médical que les maladies virales peuvent être maîtrisées par l'interféron ou un inducteur d'interféron, Zhong Wenbiao et coll. (1981-1985) ont mené une série de recherches portant sur l'utilisation du Poly I:C, inducteur d'interféron, et de la 2', 5' -Oligo (A), intermédiaire d'interféron. Ceux-ci ont été injectés ou donnés sous forme de nourriture aux vers à soie afin de maîtriser le CPV. On a découvert que ces deux drogues permettaient de diminuer la morbidité du ver à soie dans une proportion de 40 à 60 %. Une série d'analyses biochimiques par électrophorèse de l'hémolymphe ou de l'intestin moyen prélevés sur des vers à soie traités au Poly I:C a montré que le Poly I:C induisait l'apparition de bande protéiques liées aux caractéristiques anti-virales du ver à soie et augmentait l'activité des isozymes de la peroxydase. Ces résultats montrent que le ver à soie a probablement un système tel qu'il réagit au Poly I:C ou à la 2', 5' -Oligo (A) qui induisent une activité anti-virale.

Il est exact que la caractéristique de l'immunité virale du ver à soie comporte encore beaucoup de facteurs instables. Certains pensent que l'immunité acquise chez l'insecte est très courte et très faible. Ainsi que le démontre l'expérience citée plus haut, l'immunité chez le ver à soie est également instable, c'est pourquoi il est encore très difficile de combattre les maladies virales par l'immunité. Toutefois, cette méthode constitue l'une des voies de lutte contre les maladies des vers à soie et doit être approfondie.

V. LA STERILITE DU MALE DE LA MOUCHE UZI DU VER A SOIE

D'énormes progrès ont été accomplis en agriculture dans la lutte contre cet insecte parasite grâce à la méthode de la stérilisation du mâle, utilisée depuis plusieurs années. Rajat et coll. (1978) - Sericulture Research Station, Central Silk Board, Inde - ont mené des recherches sur l'utilisation du Tépa (triéthylènephosphoramide) et du Thiotépa (Triéthylène-thio phosphoramide) pour rendre la mouche Uzi stérile. Les résultats ont montré que, si les mouches Uzi étaient nourries de 0,02 à 0,04 % de Tépa ou de Thiotépa, et les mouches femelles et les mouches mâles devenaient stériles, mais que leur activité n'était pas affectée. Cependant, si les mouches femelles étaient nourries avec une drogue à concentration plus élevée, le nombre d'oeufs diminuait. Au cours d'une expérience dans laquelle les oeufs ont été incubés de manière continue pendant 9 jours, si les mouches femelles étaient alimentées de 0,05 % d'une drogue stérilisante, elles ne retrouvaient pas leur fertilité même à la

génération suivante. En laboratoire, si le rapport entre les mouches mâles stériles et les mouches normales atteint 5:1, cela doit rendre toutes les mouches femelles stériles. Aussi, on a pensé que si l'on propage les mouches mâles stériles par la méthode artificielle et qu'on les relâche dans les aires d'élevage des vers à soie, tout en maintenant le rapport mouches mâles stériles - mouches normales à 5:1, alors les dégâts causés par la mouche Uzi à l'intérieur de l'aire séricicole seront maîtrisés.

Une autre étude portant sur la stérilisation de la mouche Uzi par la méthode des radiations ionisantes a été menée par Lu Yulian, Huang Zirian et coll., et a donné de bons résultats.

Si la méthode de la stérilisation du mâle mentionnée ci-dessus est applicable, dans les zones à forte concentration d'élevage dans lesquelles des personnes sont assignées de manière spécifique à la propagation des mouches Uzi mâles stériles, un résultat positif pourrait être obtenu dans la lutte contre les dégâts de ce parasite.

VI. LES AMELIORATIONS DUES AUX DESINFECTANTS

La désinfection est un élément essentiel dans la prévention et la lutte contre les maladies des vers à soie. Durant la deuxième moitié du XX^e siècle, beaucoup de produits désinfectants ont été lancés sous différentes marques sur le marché, mais leurs composants de base restent le formol ou le chlorure, la seule différence résidant dans quelques substances synergétiques qu'on ajoute aux désinfectants afin d'augmenter et d'améliorer leur efficacité de désinfection.

S. Utsumi (1966) a effectué une recherche concernant les effets de la désinfection par la β -propiolactone sur les pathogènes du ver à soie et son application dans l'élevage. Cette drogue a été fabriquée directement à partir de cétone mélangée à du formol et elle peut être conservée sous sa forme liquide si elle est maintenue à 5-10°C. H. Kobayashi (1968) a également effectué des recherches sur l'effet désinfectant d'un mélange à concentration élevée de chaux et de formol. De nombreuses recherches et de nombreux tests de désinfectants ont été réalisés en Chine, par exemple le Sericulture Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, a fabriqué le folpet, poudre anti-muscardine, le "You Lu Jing", etc., (1976). Le Zhejiang Sericulture Institute (1974) a mis en évidence, au cours de ses expériences, les avantages de l'"Anti-pathogène I" en raison de sa haute performance, de sa sécurité, de son caractère pratique, etc. Tan Zhida (1976) et coll. - Shan Dong Sericulture Institute - ont fabriqué le dichloroisocyanurate, son contenu en chlorure étant renforcé de manière significative. Fang Dingjian et coll. (1977), GuangDong Sericulture Institute, ont essayé d'utiliser l'hypochlorure de sodium, déchet dérivé sous forme liquide d'une fabrication chimique, comme désinfectant, afin de neutraliser les pathogènes du ver à soie. Les résultats ont permis de montrer son excellente efficacité, particulièrement contre l'endotoxine de *Sotto*. En coopération avec Huang Qipan, Zhongshan University, il a fabriqué le trichloroisocyanure et a montré sa capacité de désinfection vis-à-vis de plusieurs sortes de pathogènes du ver à soie. Ce produit s'est révélé très efficace contre divers pathogènes sauf le CPV.

D'après le principe selon lequel la désinfection est un élément essentiel dans la prévention et la lutte contre les maladies du ver à soie, il est nécessaire d'effectuer davantage de recherches sur la fabrication de nouveaux désinfectants qui soient efficaces, à faible concentration, stables et inoffensifs pour l'être humain et le bétail.

VII. LA QUARANTAINE POUR LES MALADIES DU VER A SOIE

La quarantaine pour les maladies du ver à soie constitue une démarche nécessaire dans la prévention de l'infection embryonnaire de la pébrine. Selon les résultats de l'inspection préventive

de la pébrine, des mesures correspondantes devraient être adoptées pour la prévention des maladies. C'est pourquoi la quarantaine pour les maladies est l'un des principaux éléments dans la prévention.

K. Ohshima (1968) a émis l'hypothèse qu'il était possible d'améliorer les méthodes d'inspection du papillon femelle, dans le cas de la pébrine, suivant les caractéristiques de l'émergence précoce des papillons pébrinisés. Une recherche cytologique sur le cycle de développement des spores de la pébrine, entreprise par Hiromi Takizawa (1975), est d'un intérêt capital pour la quarantaine de la pébrine. Récemment, les machines d'inspection des spores de pébrine chez le papillon femelle ont été améliorées et d'autres ont été créées. Il y a les modèles "Heiya", "Higuchi", etc., machines à broyer les papillons en vente sur le marché japonais. Elles peuvent être utilisées pour le broyage, le filtrage, la centrifugation, le lavage des outils. Leur efficacité de travail est très élevée, mais elles sont très chères.

Récemment, les inspections préventives sur les maladies du ver à soie se sont améliorées. Par exemple, la détermination de la concentration de CPV par sérologie et l'héماغglutination (S. Miyajima et coll., 1976), le diagnostic sérologique de la maladie du FV (Y. Sekijima, 1971), le diagnostic histologique simple du FV (Yoshimitsu Iwashita, 1969), l'isolement de la souche de *Bacillus thuringiensis* dans les exploitations agricoles (K. Aizawa, 1961 ; Y. Ishikawa, 1964), la détection de l'aspergillus au moyen du timbre agar à l'intérieur de la pièce d'élevage (Kyoshi Kawakama, 1975), la recherche de CPV par la méthode de l'agglutination inverse (Hu Suefang et Qian Yuanjun, 1979), etc.

La denosnucléose est une maladie virale qui a été découverte durant cette décennie. Les symptômes présentés par les vers atteints et la morphologie du virus sont pratiquement les mêmes que pour la maladie du FV. Il est difficile de faire un diagnostic exact à partir de la méthode ordinaire. Récemment, les recherches portant sur le diagnostic du DNV se sont nettement améliorées ; ainsi la méthode d'immunodiffusion en colonne d'agar dans le diagnostic du DNV (ChenChangle, 1987), l'observation des changements pathologiques de l'intestin moyen du ver atteint de DNV et de FV par la méthode du complexe peroxydase-antiperoxydase (Wang Yuxin et coll., 1988), la méthode BAS-ELISA dans le diagnostic du DNV (Shi Liangen et coll., 1988), la recherche d'anticorps monoclonaux du DNV (Chen Jianguo et coll., 1988).

L'inspection préventive de la pébrine et le diagnostic précoce se sont développés récemment ; par exemple, à l'aide d'anticorps fluorescent dans le cas du diagnostic des spores de pébrine (Ryoichi Sato, 1981 ; Huang Ziran et coll., 1982), de l'héماغglutination sur lame (Li Dashan, 1984), l'agglutination sur plastisol (cf. H. Watanabe, article 1987), des anticorps monoclonaux des spores de pébrine et leur utilisation dans le diagnostic (Chen Jianguo et coll., 1988).

Durant la dernière décennie, le diagnostic préventif des maladies virales et de la maladie de la pébrine s'est nettement amélioré du fait des progrès remarquables réalisés dans certains autres domaines techniques. Les méthodes citées plus haut n'en illustrent qu'une partie, elles peuvent être utilisées dans le diagnostic exact des pathogènes et afin de reconnaître les possibilités d'infections croisées parmi les diverses variétés d'animaux et d'insectes. Elles peuvent également contribuer à la recherche sur l'épizootologie des maladies infectieuses du ver à soie. Cependant, un grand nombre de ces méthodes ne sont utilisables qu'en laboratoire, les méthodes classiques étant toujours nécessaires pour l'inspection dans la production à grande échelle. Par exemple, on ne peut pas encore écarter la microscopie en ce qui concerne l'inspection des spores de la pébrine. Il est nécessaire de fournir des efforts plus amples afin de découvrir des méthodes plus pratiques et plus utiles pour la mise en quarantaine dans la production à grande échelle.

VIII. RELATION ENTRE LES TECHNIQUES D'ELEVAGE DU VER A SOIE ET LA PREVENTION DES MALADIES.

Les techniques d'élevage et la prévention des maladies sont étroitement liées. L'application des mesures d'élevage les plus appropriées au développement du ver à soie, à l'amélioration de sa constitution et de ses capacités de résistance aux maladies, reste la politique primordiale des éleveurs.

S. Ueda (1976-1977) a indiqué que, durant les trente dernières années, la moitié des travaux consacrés aux techniques d'élevage au Japon avait pour but de rendre les récoltes stables. En général, l'instabilité dans les élevages fermiers de vers à soie était due aux microinfections, à une mauvaise qualité des feuilles de mûrier et à l'état microenvironnemental des litières, toutes ces conditions accélérant l'apparition des maladies. De fait, la relation entre les techniques d'élevage et la prévention des maladies est très étroite et ne peut être sous-estimée.

Selon Krishnaswami (1978) - Sericulture Research and Training Institute, Central Silk Board, India -, maintenir une température et une humidité adéquates, plus particulièrement l'humidité de la pièce d'élevage, sélectionner la qualité appropriée de feuilles de mûriers, choisir des mesures souples pour l'alimentation en mûrier et un endroit propice pour la litière favorisent la prévention des maladies.

La Division de la Culture de Rapport -Guangdong Agricultural Bureau, Chine - a pris des mesures techniques afin de lutter contre l'apparition de certaines maladies du ver à soie, par exemple "Dix mesures pour la prévention des maladies dans les élevages de vers à soie", "L'élevage séparé des vers du premier âge, des vers de stade moyen et des vers adultes", etc. Toutes ces mesures sont efficaces pour la production séricicole.

D'autres recherches sont nécessaires pour améliorer les conditions d'élevage du ver à soie.

IX. RELATION ENTRE LES EQUIPEMENTS ET LA PREVENTION DES MALADIES

Avec le développement de l'industrie moderne, de la science et de la technologie, il est possible de créer un environnement écologique optimal pour l'élevage des vers à soie et de séparer les vers des pathogènes au moyen d'équipements modernes afin d'obtenir la meilleure prévention possible des maladies.

L'utilisation des phytotrons et de la climatisation dans l'élevage des vers à soie permettent de maintenir un environnement confortable avec température optimale, humidité et ventilation dans la pièce d'élevage ; ainsi il est possible d'obtenir une bonne récolte à partir de vers à soie qui n'auraient pas pu être élevés dans les mauvaises conditions antérieures et permet également de diminuer le taux de maladie. Il est possible d'utiliser des instruments désinfectés et des équipements aseptisés afin de maintenir la pièce d'élevage dans un environnement relativement exempt de bactéries et de pathogènes. Il est donc possible de maîtriser complètement les maladies infectieuses des vers à soie.

L'alimentation artificielle constitue aussi une technique efficace dans la prévention des maladies: d'une part, elle permet de prévenir les infections par voie orale qui se transmettent par les feuilles de mûrier déjà contaminées par des pathogènes, d'autre part, on peut y ajouter certaines drogues afin de soigner les vers atteints. C'est une méthode différente de celle qui consiste à répandre une drogue sur les feuilles de mûrier desquelles les vers consommeront davantage d'eau et qui nécessitent davantage de travail pour les nourrir.

En raison de l'utilisation et de la popularisation de l'alimentation artificielle en sériciculture, le traitement chimique des maladies du ver à soie prendra de plus en plus d'importance, comme le montre l'expérience mentionnée plus haut. Il a été démontré que l'addition de 0,1 à 0,01 % de bavistine à l'alimentation artificielle permettait d'éliminer la pébrine chez les vers contaminés par infection embryonnaire.

X. LES PERSPECTIVES DANS LA RECHERCHE SUR LA PREVENTION ET LA LUTTE CONTRE LES MALADIES DU VER A SOIE

Les progrès réalisés dans la recherche sur la **prévention** et la lutte contre les maladies du ver à soie sont, depuis quelques temps, en étroite relation avec le développement de la recherche dans d'autres domaines. L'évolution des connaissances en microbiologie, en immunologie, en virologie, en biologie moléculaire, en génie génétique, a permis d'accomplir des progrès substantiels dans la recherche sur les maladies du ver à soie. Les auteurs pensent qu'il est nécessaire, afin de faire évoluer la recherche sur la prévention et la lutte contre les maladies du ver à soie, de faire appel aux techniques biologiques. Par exemple, en ce qui concerne le projet d'élevage d'une race immunisée contre les maladies, hormis les méthodes courantes telles que l'élevage sélectif d'hybrides, l'élevage direct, on peut utiliser la technique du génie génétique afin d'identifier, d'isoler, de purifier et de cloner les gènes de résistance aux maladies à partir de diverses variétés anti-pathogènes, leurs gènes (fraction ADN) étant injectés dans l'embryon ou dans l'ovaire du ver à soie par différentes méthodes telles que la micro-injection ou la micromanipulation afin de réaliser le transfert d'une variété à l'autre pour obtenir une nouvelle mutation avec des gènes **résistant** aux maladies.

En ce qui concerne la prévention et la lutte contre les maladies virales, les recherches sur la structure de la particule virale se font depuis quelques temps au niveau moléculaire. Cela pourrait apporter une aide précieuse à la recherche virologique et immunologique en sériciculture.

Cependant le ver à soie est un insecte. En raison de son très court cycle de vie et de son manque de caractéristiques immuno-acquises similaires à celui des vertébrés, le phénomène immuno-acquis reste très bref chez le ver à soie et il est très difficile d'obtenir un vaccin dont la fonction serait similaire à celle des vaccins chez les vertébrés dans le contrôle des maladies. Les auteurs suggèrent qu'à partir d'une recherche approfondie sur la répllication des virus des vers à soie, sur leur propagation, sur le mécanisme de l'infection, sur la conformation moléculaire des protéines de la capsid virale, on peut mettre au point certaines drogues capables d'inhiber le processus de traduction des protéines virales, de déterminer leur composition, leur assemblage ou leur invasion des cellules hôtes. Il sera alors possible d'éliminer les maladies virales.

Récemment, le Laboratoire Rossmann a effectué une recherche portant sur la structure cristalline des protéines du Virus-14 de la grippe. Il a été découvert que la protéine de la capsid virale comprenait une portion invaginée étroite qui sert de récepteur au virus quand celui-ci attaque les cellules hôtes. Il est possible de mettre au point une substance avec une petite molécule qui entre dans la portion invaginée pour bloquer le virus attaquant les cellules hôtes. Cette molécule est à la base de la drogue qui est susceptible d'éliminer la maladie virale. Cette méthode constitue un bon exemple de recherche de drogue applicable aux virus des vers à soie. (Référence : "L'analyse de la structure cristalline chez les macromolécules biologiques", Li Jiayao, 1987).

HPLC FRACTIONATION OF Cs PEPTIDES OF *BOMBYX MORI* SILK FIBROIN

G. FREDDI, S. FARAGÒ & T. MAIFRENI

Stazione sperimentale per la Seta, Via Giuseppe Colombo, 81, 20133 Milano, Italy.

Cs peptides obtained by enzymic hydrolysis of silk fibroin with α -chymotrypsin were fractionated by gel-filtration chromatography and analysed by reverse phase-high performance liquid chromatography. The most important peptides were isolated and their amino acid composition was determined. The Cs peptides were divided into seven groups. The first five groups represent 2/3 of the Cs fraction and are formed by peptides belonging to the H fibroin subunit, as can be deduced from their amino acid composition, glycine concentration and hydrophobic index. The sixth group has intermediate characteristics, while the seventh is mostly formed by peptides coming from the enzymic hydrolysis of the L subunit(s). According to the ratio of the main peptide-forming amino acids, the H-chain Cs peptides were divided into four main groups. This suggests the presence of few typical peptide sequences which alternate repeatedly throughout the so-called amorphous regions of the fibroin heavy chain.

Keywords : HPLC, peptides, *Bombyx mori*, silk, fibroin, chymotrysin digest, amino acid composition.

INTRODUCTION

The fractionation by hydrolytic enzymes has often been applied to the study of the chemical structure of *Bombyx mori* silk fibroin [1-10].

The action of α -chymotrypsin on an aqueous solution of silk fibroin produces two fractions, called Cp and Cs. The former is formed by hydrophobic peptides which precipitate during hydrolysis, the latter consists of a quite complex mixture of water soluble peptides.

Both the amino acid composition and the sequence of Cp peptides have been extensively studied [2,5,7,8]. Glycine residues occupy alternate positions with either alanine or serine residues over quite long sections of the polypeptide chain. These highly regular sequences are thought to be involved in the formation of antiparallel β -pleated sheet structure, which characterizes the crystalline regions in the spun filament [11,12,13].

The Cs fraction is much more heterogeneous, being formed by several peptides of different size (generally shorter than Cp peptides), composition and sequence [3,9]. Because of their chemical characteristics, the Cs peptides have been associated with the amorphous regions of the fibre. Furthermore, it was suggested that crystalline - and amorphous - region peptides might alternate throughout the fibroin molecule, forming a copolymer-type structure [3,4,14,15].

Recently, however, a subunit structure model for silk fibroin has been proposed by different authors. According to this model, the fibroin molecule should consist of one heavy (H) and at least one light (L) polypeptide chain. The amino acid composition of the small polypeptides either isolated from posterior silk gland fibroin [16-19] and from cocoon fibroin [20-22] or predicted from the gene coding sequence [23] indicates that most of the amino acids with polar and non-polar bulky side-chains are concentrated in the light subunit(s), instead of being distributed in the amorphous regions throughout the fibroin molecule.

These findings make it necessary to re-examine the structure and the physico-chemical properties of the amorphous regions of silk fibroin.

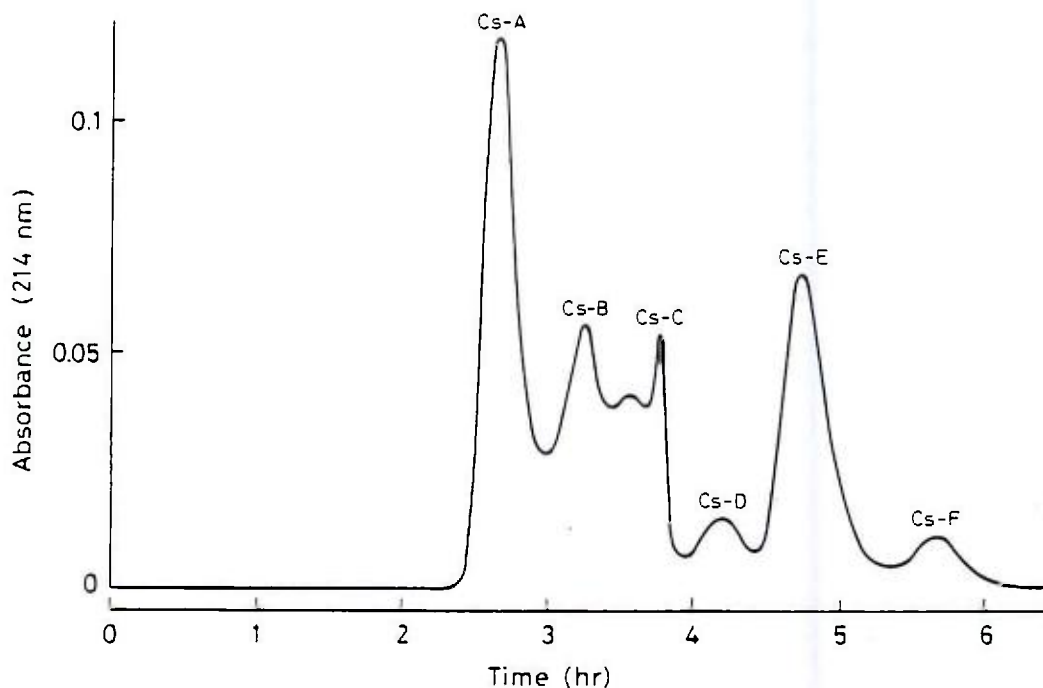


Fig. 1 : Gel-filtration chromatography of the Cs peptides on a Sephadex G-25 column (eluent : water).

Six fractions, corresponding to the main peaks of the chromatogram, were collected.

Fig. 1 : Chromatographie de filtration sur gel des peptides Cs sur une colonne de Sephadex G-25 (éluant : eau).

Six fractions, correspondant aux principaux pics du chromatogramme, ont été collectées.

We think a good approach is to get a better knowledge of the soluble fractions forming in the enzymic hydrolysis of fibroin, so we have started to investigate the Cs fraction obtained from degummed raw silk.

Table I.

Tableau I.

Amino acids (1) <i>Acides aminés (1)</i>	Silk fibroin <i>Fibroïne</i>	Cp	Cs
ASP	1.63	0.42	4.50
THR	0.88	0.47	1.90
SER	11.27	11.79	9.15
GLU	1.19	0.34	3.10
PRO	0.46	0.13	0.95
GLY	45.24	49.13	36.86
ALA	29.18	32.03	23.98
CYS	-	-	-
VAL	2.16	1.11	4.19
MET	0.08	0.03	0.31
ILE	0.60	0.19	1.60
LEU	0.51	0.10	1.70
TYR	5.14	3.66	7.51
PHE	0.66	0.34	1.46
LYS	0.32	0.12	0.94
HIS	0.20	0.04	0.54
ARG	0.47	0.10	1.30
GLY/ALA	1.55	1.53	1.54
P/NP(2)	0.27	0.20	0.41
%(3)	-	55	45

(1) Data are expressed as mole per cent. Values were not corrected for amino acid decomposition during hydrolysis / *Les données sont exprimées en moles pour cent. Les valeurs ne sont pas corrigées pour la décomposition des acides aminés pendant l'hydrolyse.*

(2) Ratio between polar (ASP, THR, SER, GLU, TYR, LYS, HIS, ARG) and non-polar (PRO, GLY, ALA, CYS, VAL, MET, ILE, LEU, PHE) amino acids / *Rapport acides aminés polaires (ASP, THR, SER, GLU, TYR, LYS, HIS, ARG) sur les acides aminés non-polaires (PRO, GLY, ALA, CYS, VAL, MET, ILE, LEU, PHE).*

(3) Based on nitrogen content (Kjeldahl's method). / *Basé sur le contenu en azote d'après la méthode de Kjeldahl.*

We also intend to explore the possibilities of applying chromatographic techniques, such as reversed phase-high performance liquid chromatography, which is expanding its role as an effective method of separating and purifying peptides of both natural and synthetic origin. The high performance of this technique (sensitivity, selectivity, reproducibility) and its versatility allow to satisfy a wide range of analytic requirements, such as the need for separating rather complex mixtures of peptides.

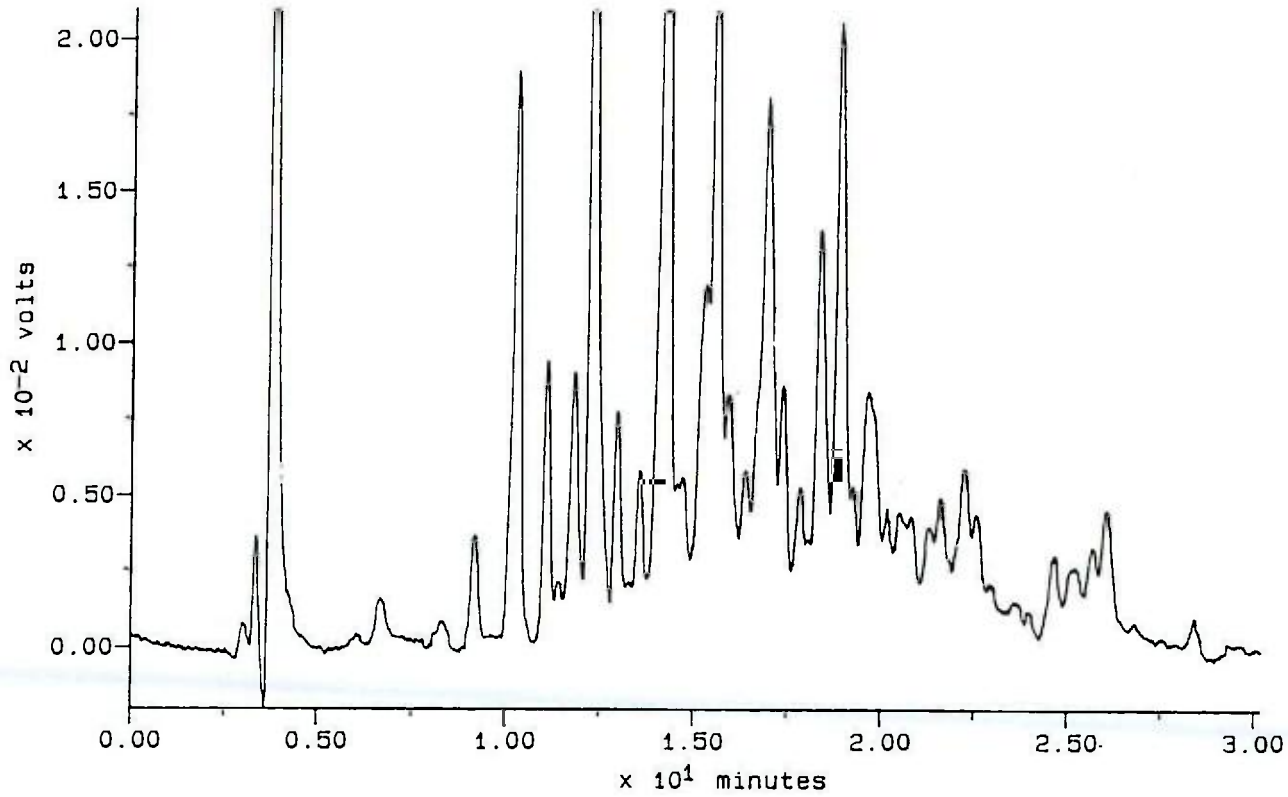


Fig. 2 : Cs fraction.

Fig. 2 : Fraction Cs.

This report presents the first results of RP-HPLC fractionation of Cs peptides. The most important peptides were isolated and their amino acid composition was determined.

Table II.

Tableau II.

Amino acids (1) <i>Acides aminés (1)</i>	Cs-A	Cs-B	Cs-C	Cs-D	Cs-E	Cs-F
ASP	5.86	4.79	6.40	3.88	1.22	1.61
THR	2.83	2.10	1.53	1.26	0.46	0.77
SER	12.80	9.61	8.28	4.75	1.22	3.75
GLU	4.44	1.98	2.91	3.69	0.60	1.26
PRO	-	1.29	0.91	-	0.16	0.74
GLY	36.69	39.74	35.17	40.75	47.50	42.42
ALA	24.83	27.72	26.11	23.75	28.04	19.23
CYS	-	-	-	-	-	-
VAL	2.23	2.38	3.77	4.52	6.71	6.03
MET	0.30	0.13	0.09	-	0.03	-
ILE	1.77	1.11	1.65	1.24	0.69	0.59
LEU	1.04	1.02	1.94	1.93	0.44	1.03
TYR	4.20	5.49	8.20	10.62	12.04	19.58
PHE	1.61	1.43	1.16	1.40	0.35	2.18
LYS	0.79	0.42	0.63	1.01	0.19	0.39
HIS	0.11	0.19	0.29	0.21	0.05	0.12
ARG	0.50	0.60	0.96	0.99	0.28	0.30
GLY/ALA	1.48	1.43	1.35	1.72	1.69	2.21
P/NP(2)	0.46	0.34	0.41	0.36	0.19	0.38
%(3)	43.50	12.30	11.00	7.30	21.50	4.40

(1) See Table I / Voir Tableau I.

(2) See Table I / Voir Tableau I.

(3) Sum of peptide fractions recovered from Sephadex G-25 is made as 100 moles / *Somme des fractions de peptides obtenues par Sephadex G-25 exprimée pour 100 moles.*

MATERIALS AND METHODS

Bombyx mori silk fibroin

Bombyx mori silk fibroin was obtained from 20/22 den Chinese raw silk degummed with 7 g/l "Marseille" soap solution twice for half an hour at boiling (bath ratio 1:50). After washing with several changes of water and drying at room temperature, the silk fibroin was Soxhlet extracted with petroleum ether and equilibrated overnight with a sodium acetate-acetic acid solution (0.02M).

Preparation of Cs fraction

A 1% aqueous solution (w/v) of silk fibroin was prepared according to the method of Zahn *et al.* [5]. The fibroin solution, buffered at pH 8 with freshly prepared 0.1M ammonium bicarbonate solution, was digested with α -chymotrypsin for 24 hr at 40°C (enzyme-substrate ratio 1:100). The

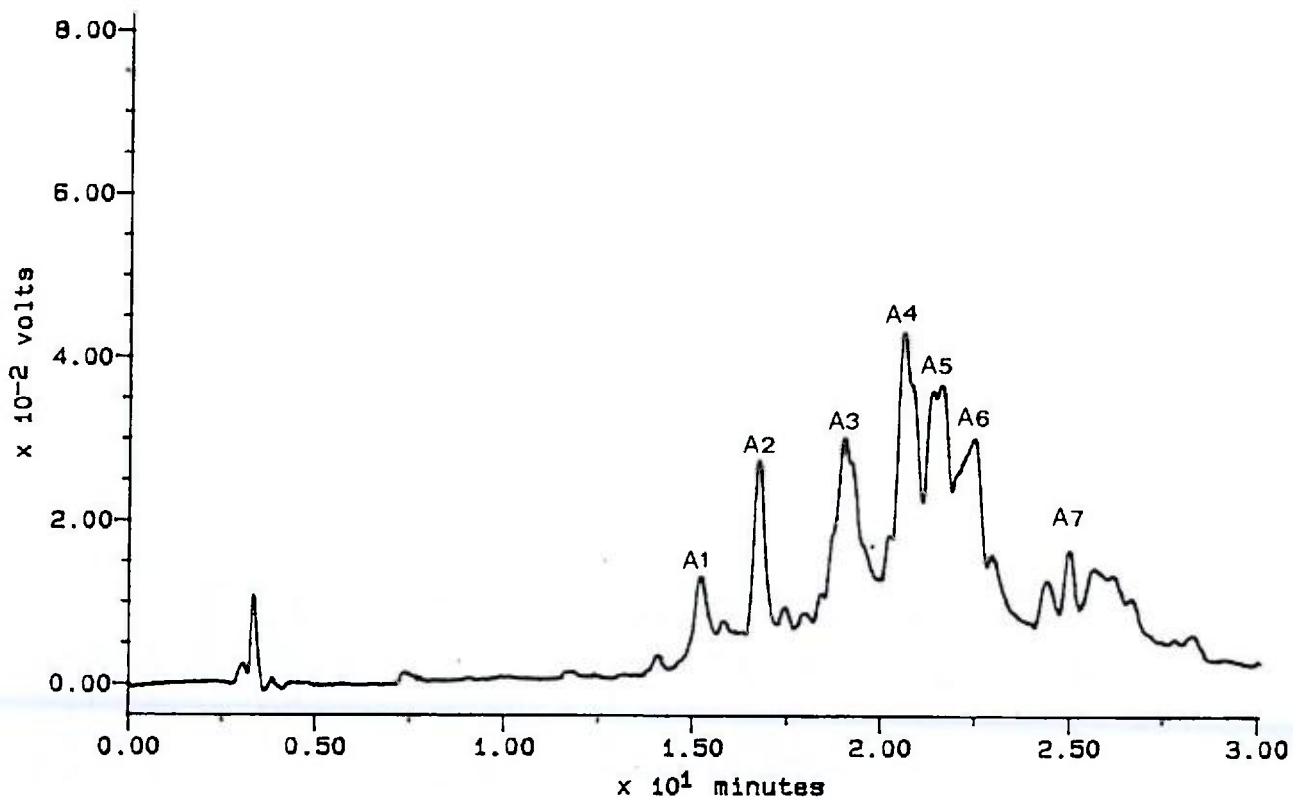


Fig. 3 : Cs-A fraction.

Fig. 3 : Fraction Cs-A.

precipitate formed during hydrolysis (Cp fraction) was centrifuged, washed twice with distilled water and freeze-dried. The supernatant, to which the washings were added, was freeze-dried before subsequent analyses (Cs fraction).

Table III.

Tableau III.

Amino acids (1) <i>Acides aminés (1)</i>	A-1	A-2	A-3	A-4	A-5	A-6	A-7
ASP	1.93	1.98	2.62	3.75	4.82	16.64	16.56
THR	0.92	1.26	2.48	2.23	2.36	5.88	9.05
SER	13.10	13.74	15.16	15.95	15.33	13.28	11.58
GLU	1.54	1.67	2.41	4.23	5.38	7.39	11.79
PRO	-	-	-	-	-	-	-
GLY	46.81	45.83	41.25	38.92	37.13	20.17	12.84
ALA	31.16	29.74	28.10	26.48	24.00	17.48	9.61
CYS	-	-	-	-	-	-	-
VAL	1.10	1.40	1.27	1.04	1.69	5.71	6.18
MET	-	-	-	-	-	-	1.05
ILE	-	-	-	-	0.97	6.22	6.39
LEU	-	-	-	-	-	-	5.54
TYR	3.43	3.61	4.56	5.74	6.56	7.23	3.65
PHE	-	0.77	2.15	1.67	1.74	-	2.11
LYS	-	-	-	-	-	-	1.89
HIS	-	-	-	-	-	-	-
ARG	-	-	-	-	-	-	1.75
GLY/ALA	1.50	1.54	1.47	1.47	1.55	1.15	1.34
P/NP(2)	0.26	0.29	0.37	0.47	0.53	1.02	1.29
%(3)	9.20	17.90	17.70	15.20	23.60	4.90	11.50

(1) See Table I / Voir Tableau I.

(2) See Table I / Voir Tableau I.

(3) Sum of peptide fractions recovered from RP-HPLC analyses is made as 100 moles / La somme des fractions de peptides obtenues par RP-HPLC est faite sur 100 moles.

Gel-filtration chromatography (GFC) :

Cs peptides dissolved in water were subjected to a preliminary fractionation by GFC on a Sephadex G-25 column (1.6x90 cm) using distilled water or 0.05M sodium phosphate buffer, pH 7.2, with 0.1M NaCl as eluents. Peptides were detected at 214 nm and the fractions corresponding to the peaks were collected using an automatic fraction collector (GILSON, mod. 201).

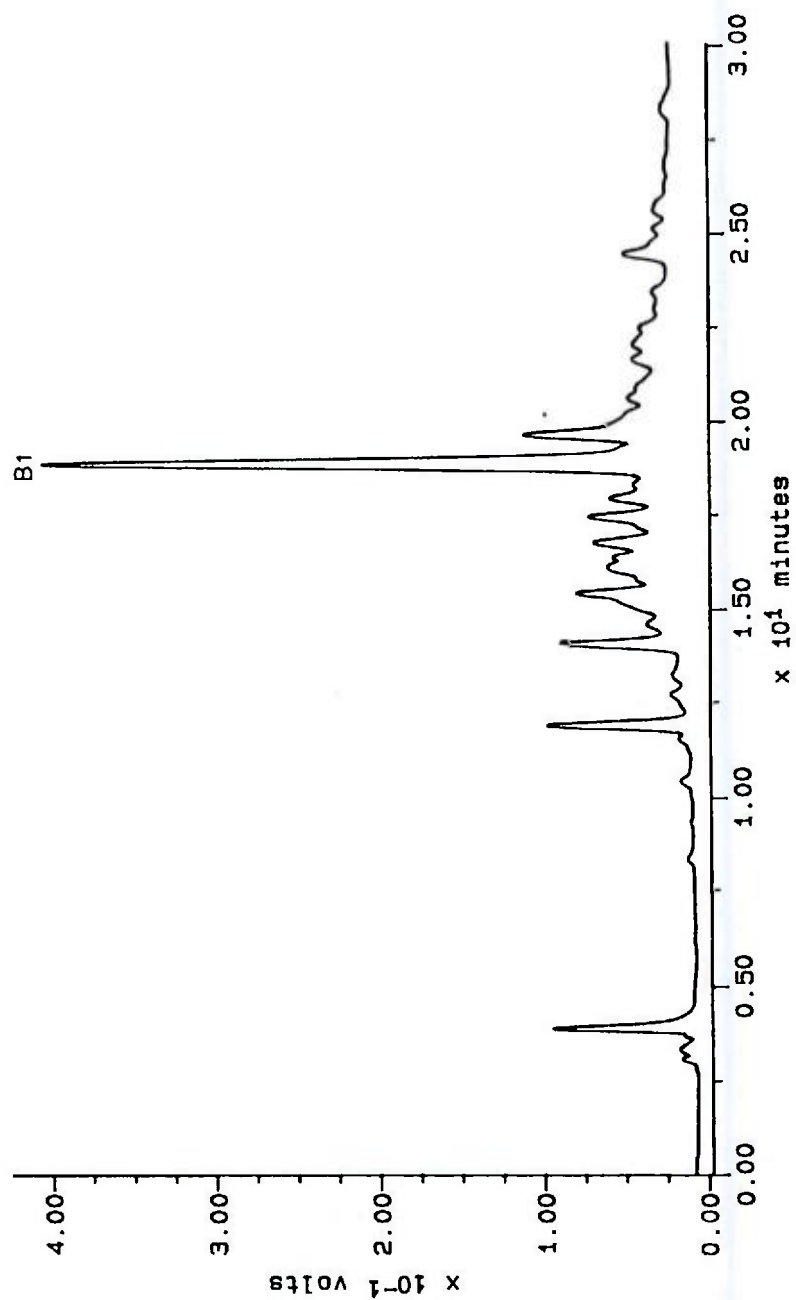


Fig. 4 : Cs-B fraction.

Fig. 4 : Fraction Cs-B.

Reversed phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC)

Peptide fractions obtained by GFC were concentrated on a rotary evaporator and analyzed by RP-HPLC. Both analytical and semi-preparative fractionations were performed using a μ -Bondapak C-18 column (3.9 mm x 30 cm ; particle size 10 μ m). The peptides were eluted at room temperature with a 30 min linear gradient from 100% solvent A to a mixture of 50% solvent A and 50% solvent B at a constant flow rate of 1 ml/min (solvent A: water with 0.1% TFA; solvent B: acetonitrile with 0.1% TFA) and detected at 214 nm. HPLC separations were performed using a WATERS HPLC system consisting of two mod. 510 pumps, a mod. 680 automated gradient controller, a mod. 712 WISP automatic sample injection module, a mod. 490 programmable multiwavelength UV/Vis detector and a Maxima 820 chromatography workstation. Fractions were collected using a mod. 201 automatic fraction collector (GILSON).

Table IV.*Tableau IV.*

Amino acids (1) <i>Acides aminés (1)</i>	B-1
ASP	0.84
THR	2.90
SER	11.64
GLU	0.97
PRO	3.32
GLY	42.75
ALA	29.62
CYS	-
VAL	0.72
MET	-
ILE	0.27
LEU	0.69
TYR	2.71
PHE	2.85
LYS	0.52
HIS	-
ARG	0.21
GLY/ALA	1.44
P/NP(2)	0.25

(1) See Table I / *Voir Tableau I.*

(2) See Table I / *Voir Tableau I.*

Amino acid analysis

Peptide fractions were hydrolyzed with 6N HCl, at 105°C for 24 hr in evacuated tubes. The amino acid composition was determined with a Liquimat III (KONTRON) amino acid analyzer using a sodium citrate buffer system (PIERCE, Pico Buffer System II).

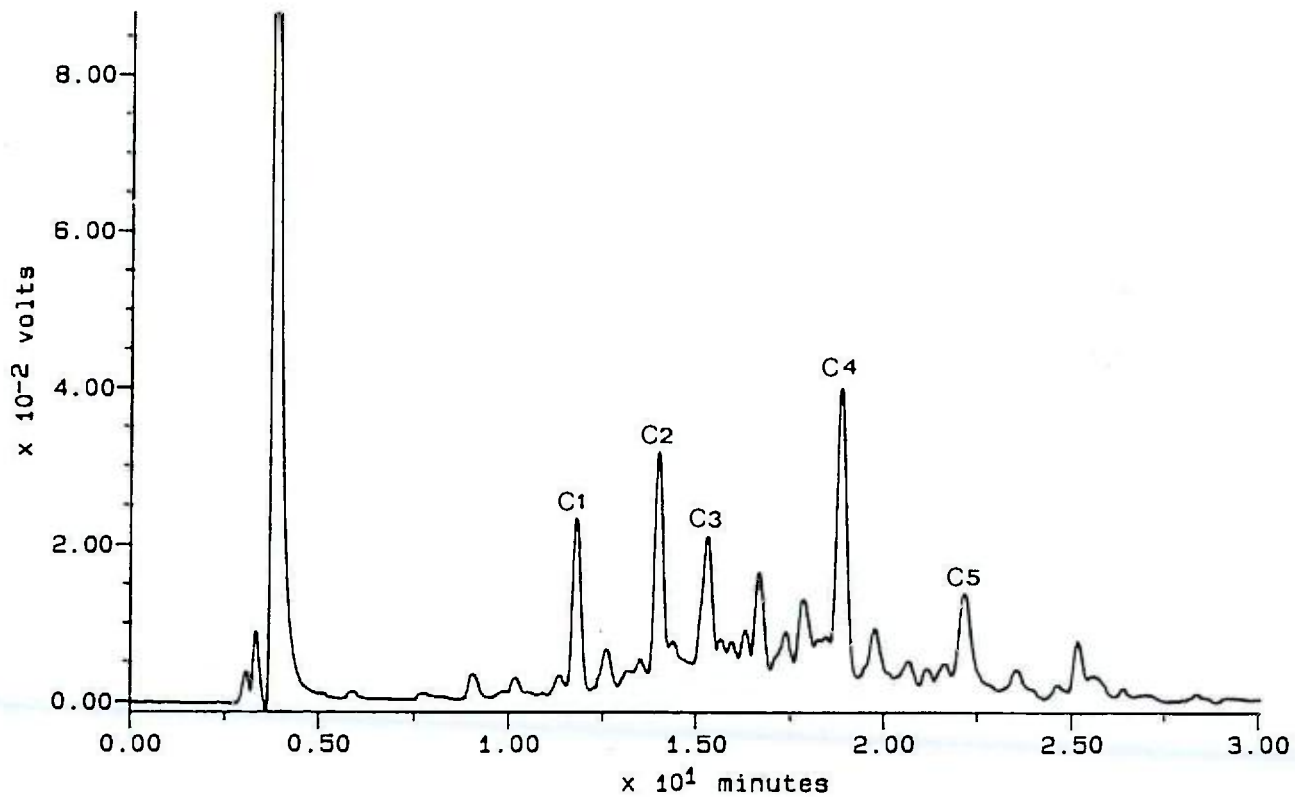


Fig. 5 : Cs-C fraction.

Fig. 5 : Fraction Cs-C.

RESULTS

GFC fractionation of Cs peptides

Table I shows the amino acid composition of fibroin and of Cp and Cs fractions obtained by enzymic hydrolysis with α -chymotrypsin. The peptides in the Cp fraction originate from the fibroin heavy subunit [8], whilst those in the Cs fraction come from both heavy and light subunits [9].

Table V.

Tableau V.

Amino acids (1) <i>Acides aminés (1)</i>	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
ASP	14.58	3.42	8.39	1.42	6.84
THR	-	0.50	1.09	2.68	2.00
SER	2.77	8.91	12.04	10.73	8.75
GLU	1.81	1.32	6.02	1.47	4.27
PRO	-	-	-	-	2.54
GLY	34.84	43.88	33.12	45.74	37.42
ALA	19.74	34.75	15.69	27.54	20.85
CYS	-	-	-	-	-
VAL	13.68	2.57	6.84	1.68	3.32
MET	-	-	-	-	-
ILE	-	-	-	0.35	2.90
LEU	-	-	-	1.03	2.30
TYR	12.58	4.56	16.79	3.87	3.74
PHE	-	-	-	3.10	2.44
LYS	-	-	-	-	0.67
HIS	-	-	-	-	-
ARG	-	-	-	0.40	1.97
GLY/ALA	1.76	1.27	2.11	1.66	1.79
P/NP(2)	0.46	0.23	0.80	0.26	0.39
%(3)	13.30	29.40	9.40	36.90	11.00

(1) See Table I / Voir Tableau I.

(2) See Table I / Voir Tableau I.

(3) See Table III / Voir Tableau III.

Through gel-filtration fractionation of Cs peptides six fractions were obtained (Fig. 1), which were called Cs-A, Cs-B,...Cs-F in increasing order of elution volume. Table II shows their amino acid composition. The recovery of total peptides from gel-filtration elution was about 80%.

Assuming that all peptides have an aromatic amino acid residue in their C-terminal position (according to the action mechanism of α -chymo- trypsin), the average peptide length was estimated in the range from 5 (Cs -F fraction) to 17 residues (Cs-A fraction). This evaluation agrees with other authors' findings [3,9] and seems quite correct for all the fractions, except Cs-A, whose GFC behaviour indicates the presence of much longer peptides. Preliminary HPLC gel-filtration tests (TSK G-2000 SW column, 7.5 mm x 30 cm, particle size 10 m, LKB) confirmed that these peptides have

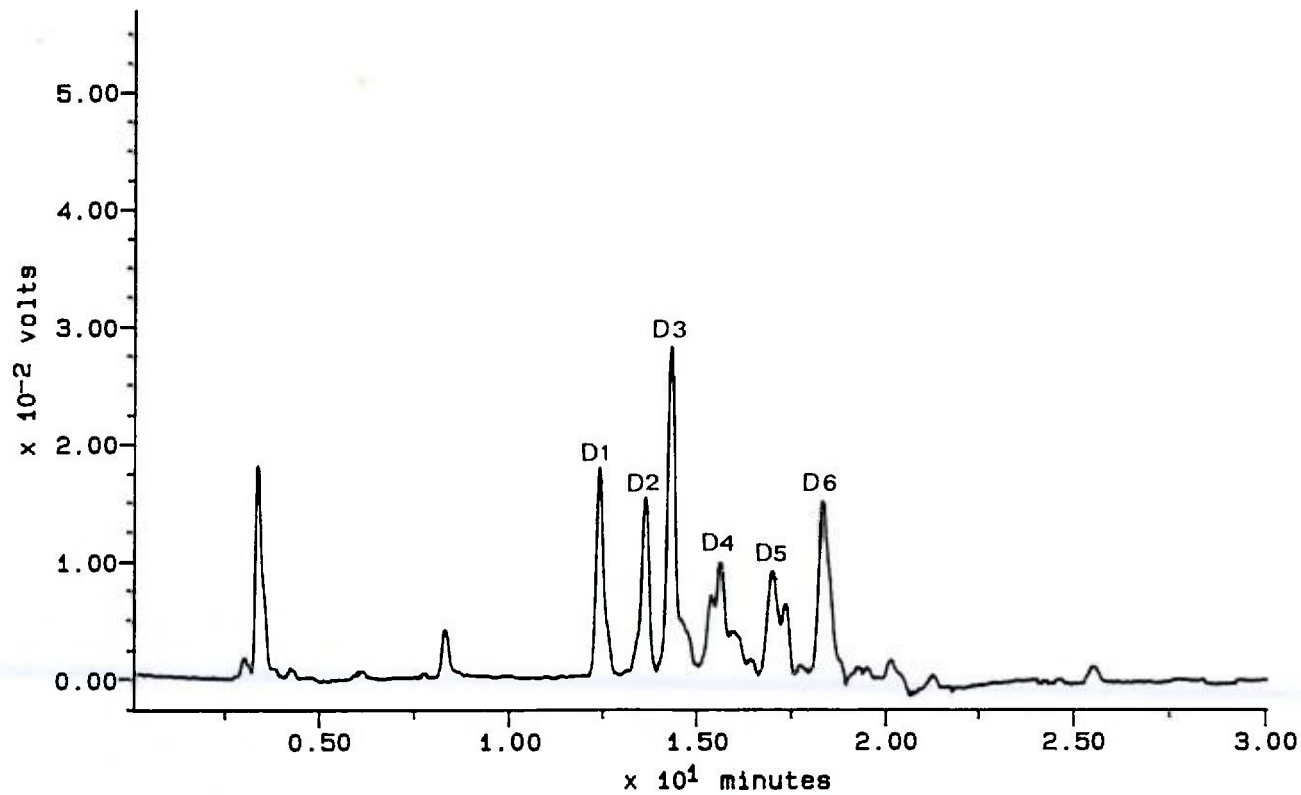


Fig. 6 : Cs-D fraction.

Fig. 6 : Fraction Cs-D.

a higher molecular weight than one would expect judging from the average number of residues. Further experiments are now under way in order to elucidate this aspect better.

Table VI.

Tableau VI.

Amino acids (1) <i>Acides aminés (1)</i>	D-1	D-2	D-3	D - 4	D-5	D-6
ASP	1.80	1.41	2.11	4.36	2.05	5.81
THR	1.05	1.00	0.74	1.31	0.67	1.57
SER	3.15	3.16	2.45	12.11	1.91	6.66
GLU	1.50	2.49	2.34	12.66	2.10	11.58
PRO	-	-	-	3.67	-	-
GLY	48.13	46.22	46.92	26.51	47.83	32.08
ALA	38.83	38.49	25.00	12.80	23.36	25.30
CYS	-	-	-	-	-	-
VAL	1.05	1.50	8.79	1.80	7.79	5.21
MET	-	-	-	-	-	-
ILE	-	0.50	0.63	0.97	0.53	2.66
LEU	-	-	-	-	2.20	-
TYR	4.50	4.74	7.08	16.47	8.46	8.23
PHE	-	-	0.91	1.94	0.91	-
LYS	-	-	1.31	2.49	1.77	-
HIS	-	-	1.14	0.69	-	-
ARG	-	0.50	0.57	2.21	0.43	1.09
GLY/ALA	1.24	1.20	1.88	2.07	2.05	1.27
P/NP(2)	0.14	0.15	0.22	1.10	0.21	0.53
%(3)	8.40	15.10	21.90	18.10	26.20	10.30

(1) See Table I / Voir Tableau I.

(2) See Table I / Voir Tableau I.

(3) See Table III / Voir Tableau III.

As concerns the quantitative distribution of peptides in the various fractions, 43.5% of them go to the Cs-A fraction. Of the other fractions, the most important one is Cs-E, which is characterized by a very high glycine and alanine content and by a P/NP ratio similar to that of Cp peptides. This fraction differs considerably from the other fractions and is very similar in amino acid composition to the S-III fraction isolated by Katagata *et al.* [9].

RP-HPLC analysis of Cs peptides

The peptide map of the total Cs fraction is rather complex (Fig. 2). The fractions obtained by GFC gave, as expected, simpler peptide maps (Fig. 3-8), even if our analysis conditions did not allow us in some cases to separate individual peptides, as with the Cs-A fraction and some minor components of other fractions.

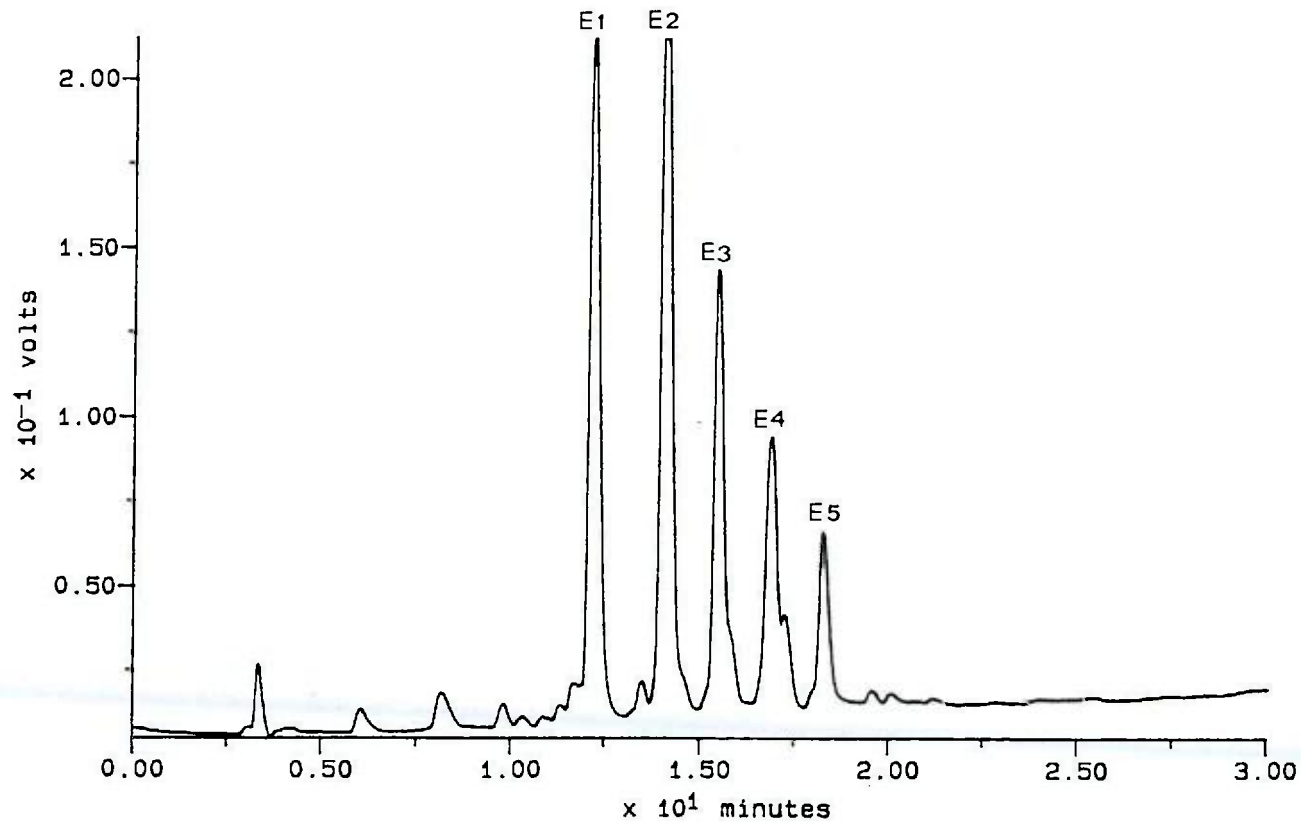


Fig.7 : Cs-E fraction.

Fig. 7 : Fraction Cs-E.

Cs-A fraction (Fig. 3, Table III). Seven fractions were separated and analysed corresponding to the main peaks eluting in RP-HPLC (each peak represents a mixture of several peptides with similar retention time).

A particularly important characteristic is the high serine concentration in all the fractions (>11%), and the high acidic amino acid content in A-6 and A-7 fractions (>20%). It must be pointed out that some of these peptides are similar in composition to the S-I soluble peptide fractions separated by Katagata *et al* [9] by enzymic hydrolysis of the fibroin heavy subunit.

Table VII.

Tableau VII.

Amino acids (1) <i>Acides aminés (1)</i>	E-1	E-2	E-3	E-4	E-5
ASP	0.87	0.68	1.62	7.45	2.17
THR	0.36	0.33	0.81	4.87	1.45
SER	1.81	0.84	2.55	11.46	3.98
GLU	0.93	0.66	1.68	11.46	3.38
PRO	-	-	-	-	-
GLY	48.44	50.26	48.03	34.10	45.48
ALA	35.08	25.40	30.21	18.34	18.46
CYS	-	-	-	-	-
VAL	0.74	11.75	1.10	6.88	11.94
MET	-	-	-	-	-
ILE	-	-	-	-	-
LEU	-	-	-	-	-
TYR	10.98	9.83	12.91	2.29	10.74
PHE	0.34	-	-	-	-
LYS	0.32	-	0.46	-	1.09
HIS	-	-	-	-	-
ARG	0.13	0.26	0.64	3.15	1.33
GLY/ALA	1.38	1.98	1.59	1.86	2.46
P/NP (2)	0.18	0.14	0.26	0.69	0.32
% (3)	39.60	35.90	14.50	3.00	7.00

(1) See Table I / Voir *Tableau I*.

(2) See Table I / Voir *Tableau I*.

(3) See Table III / Voir *Tableau III*.

Cs-B fraction (Fig. 4, Table IV). The peptide characterizing this fraction was separated and its amino acid composition was determined. Glycine, alanine and serine are present in concentrations similar to that of fibroin. Other remarkable characteristics are the very high concentration of proline and the presence of tyrosine and phenylalanine in 1:1 molar ratio.

Cs-C fraction (Fig. 5, Table V). The C-4 peptide is very similar to B-1 in both retention time and composition. The former, however, does not contain proline. Among the other peptides, C-1, C-3

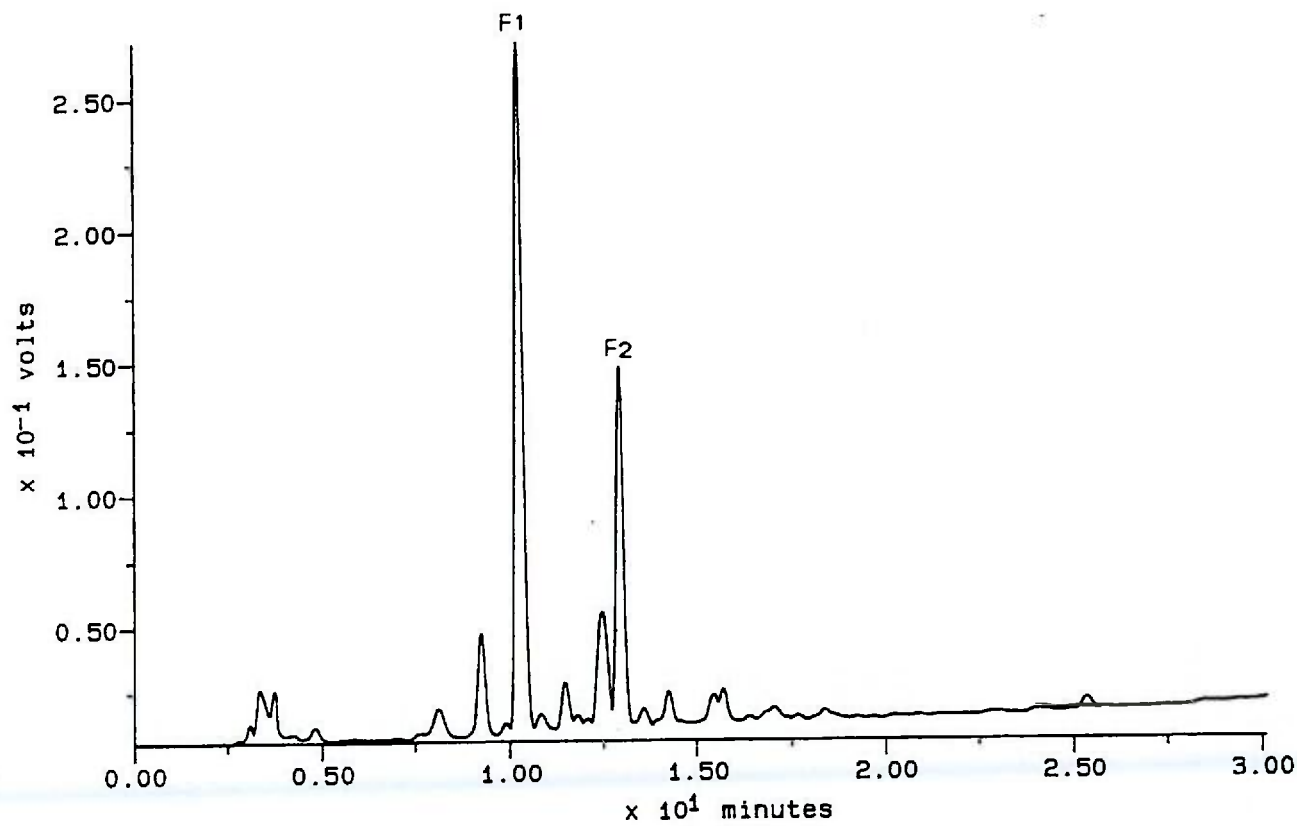


Fig. 8 : Cs-F fraction.

Fig. 8 : Fraction Cs-F.

and C-5 present very high concentrations of aromatic, acidic amino acids (particularly aspartic acid) and valine.

Cs-D fraction (Fig. 6, Table VI). This is not a very important fraction from the quantitative point of view (see Table II). The fractions separated and analysed correspond to six peaks; the fourth and the fifth are formed by several peptides. D-1 and D-2 have almost the same composition. D-3 and D-5 are also very similar both to each other and to D-1 and D-2 in glycine concentration. All four peptide fractions have a very low P/NP ratio, comparable with that of Cp. D-4 and D-6 show relatively low glycine and alanine concentrations. The high amounts of glutamic acid (>11%) and proline (like in B-1 and C-5) are particularly worth mentioning.

Table VIII.

Tableau VIII.

Amino acids (1) <i>Acides aminés (1)</i>	F-1	F-2
ASP	2.41	4.84
THR	1.42	2.97
SER	4.75	10.28
GLU	4.39	10.11
PRO	-	-
GLY	42.56	37.21
ALA	19.54	9.60
CYS	-	-
VAL	1.46	13.51
MET	-	-
ILE	0.79	2.21
LEU	2.81	2.12
TYR	14.99	1.61
PHE	1.03	3.23
LYS	2.02	-
HIS	0.79	-
ARG	1.03	2.29
GLY/ALA	2.17	3.88
P/NP (2)	0.47	0.47
% (3)	68.20	31.80

(1) See Table I / Voir *Tableau I*.

(2) See Table I / Voir *Tableau I*.

(3) See Table III / Voir *Tableau III*.

Cs-E fraction (Fig. 7, Table VII). This is the most interesting fraction among those obtained by GFC. It contains five well-separated peaks, which are those characterizing the Cs fraction peptide map by their intensity. All peptides, except the fourth, show a very high glycine concentration. The GLY/ALA ratio varies remarkably from a minimum of 1.38 (E-1) to a maximum of 2.46 (E-5). The valine content increases as the alanine concentration decreases. With reference to the typical amino

acid sequence "-gly-X-gly-X-gly-" characterizing a large part of the fibroin molecule (H subunit), valine is likely to occupy the "-X-" position more frequently, instead of alanine (or serine), in some peptide regions. The E-1 and E-2 peptides correspond to the CsA-2 and CsA-3 peptides isolated by F. Lucas *et al.* [3] and to the S-III-5a and S-III-5b peptides isolated by Katagata *et al.* [9].

Cs-F fraction (Fig. 8, Table VIII). This is the least important fraction from the quantitative point of view. The two peptides separated and analysed have a quite high GLY/ALA ratio. One of them contains a high amount of tyrosine, whilst the other is rich in acidic amino acids and valine. F-2 is the only peptide among those examined that contains phenylalanine in a concentration twice that of tyrosine.

Table IX.

Tableau IX.

Peptide groups <i>Groupes de peptides</i>	mole % (1)	P/NP (2)	GLY + ALA (2)	
I (D-1, D-2)	1.7	0.15	86	GLY : ALA = 5:4
II (E-1, E-3)	11.6	0.22	81	GLY : ALA : TYR = 4:3:1
III (D-3, D-5, E-2, E-5)	12.8	0.22	71	GLY : ALA : TYR : VAL = 5:2, 5:1:1
IV (B-1, C-2, C-4)	19.6	0.25	75	GLY : ALA : SER = 4:3:1
V (A-1, A-2, A-3)	19.5	0.31	74	GLY : ALA : SER = 3:2:1
VI (A-4, A-5, C-5, F-1)	21.1	0.47	62	-----
VII (A-6, A-7, C-1, C-3, D-4, D-6, E-4, F-2)	13.7	0.80	45	-----

(1) See Table III / Voir Tableau III.

(2) Average values / Valeurs moyennes.

DISCUSSION

The amino acid compositions of the peptides separated and analysed by RP-HPLC show significant analogies. According to these, the peptides have been divided into seven groups (Table IX).

The first five groups represent about 2/3 of Cs peptides and are characterized by a quite low P/NP ratio, with no remarkable difference from that of fibroin and the Cp fraction. In each of these groups, the main peptide-forming amino acids are in a constant ratio.

The sixth group has intermediate characteristics between the first five and the seventh. The last group is rather heterogeneous. All its peptides, however, contain relatively low concentrations of glycine and alanine and high amounts of polar and bulky side-chain amino acids.

We have tried to establish a correlation between the above mentioned peptide groups and the chemical characteristics of H and L subunits, which form the fibroin molecule.

At present, the amino acid compositions reported by various authors for the L subunit(s) are not in a complete agreement [16-23]. However, it can be supposed that the seventh group is mostly formed by peptides coming from the enzymic hydrolysis of the light subunit(s).

The sixth group should contain fragments of peptides from both H and L subunits, linked by at least one disulfide bond. This hypothesis should have been supported by the presence of cystine but in our analyses we found only trace amounts of cystine.

This confirms that these peptides belong to the heavy subunit, in which glycine residues occupy alternate positions over almost the whole molecule [8,9,15]. It is worth emphasizing that all these peptides could be divided into a relatively limited number of groups (four, excluding the first group, which is not very important from the quantitative point of view). This leads us to think that also in the so-called amorphous regions of the H subunit, few short peptide sequences alternate repeatedly. In this case, the copolymer structure model, proposed so far for the primary structure of fibroin heavy chain as a whole [15], should apply also to the amorphous regions of the H subunit.

Most of the peptides of the first five groups have a hydrophobic index (expressed by the P/NP ratio) very similar to that of Cp peptides. As a consequence, it can be supposed that the chemical properties of the so-called amorphous regions are not so different from those of the crystalline regions. From the physical point of view, the H chain Cs peptides are hindered from taking part in the formation of highly ordered crystalline structures. The frequent occurrence in their sequence of amino acids with large side-chains avoids close packing of adjacent fibroin chains, as it happens in the crystalline-region Cs peptides [11].

Some authors proposed that the weight percentage of the L subunit (referred to the fibroin molecule as formed by two subunits H and L in 1:1 molar ratio) ranges from 7% to 10% [22, 24, 25]. This evaluation seems to be confirmed by the quantitative distribution of the peptides separated and analysed in this study.

CONCLUSION

The results obtained in this study have allowed us to give a fairly detailed description of the physico-chemical characteristics of the H subunit amorphous regions, even if their primary structure is still far from being completely elucidated.

Owing to the complexity of the Cs fraction, it has not been possible to delineate the L subunit(s) peptides clearly and to evaluate the number and distribution of the disulfide bonds linking the fibroin subunits.

In this respect, we think some more interesting information could be provided by the analysis of another soluble fraction obtained from fibroin by enzymic hydrolysis with trypsin. In preliminary tests, a group of peptides particularly rich in cystine was separated. Its HPLC fractionation is under way and the results will be reported before long.

REFERENCES

- [1] DRUCKER B., HAINSWORTH R., SMITH S.G. (1952-53), Shirley Inst. Memoirs, 26, 191.
- [2] LUCAS F., SHAW J.T.B., SMITH S.G. (1957), *Biochem. J.*, 66, 468.
- [3] LUCAS F., SHAW J.T.B., SMITH S.G. (1962), *Biochem. J.*, 83, 164.
- [4] SHAW J.T.B. (1964), *Biochem. J.*, 93, 45.
- [5] ZAHN H., SCHADE W., ZIEGLER K. (1967), *Biochem. J.*, 104, 1019.
- [6] SCHADE W. (1968), *Melliand Textilberichte*, 183.
- [7] STRYDOM D.J., HYLETT T., STEAD R.H. (1977), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 79, 932.
- [8] KATAGATA Y., KIKUCHI A., SHIMURA K. (1984), *J. Seric. Sci. Jpn.*, 53, 165.
- [9] KATAGATA Y., KIKUCHI A., SHIMURA K. (1984), *J. Seric. Sci. Jpn.*, 53, 226.
- [10] SONG Z., SPEAKMAN P.T. (1985), *Proc. 7th Int. Wool Text. Res. Conf.*, Tokyo, 1, 364.
- [11] FRASER R.D.B. (1973), "Conformation in fibrous proteins and related synthetic polypeptides". Academic Press N.Y., 293.
- [12] LOTZ B., COLONNA CESARI F. (1979), *Biochimie* 61, 205.
- [13] IIZUKA E. (1985), *J. Appl. Polym. Sci.: Appl. Polym. Symp.* 41, 163.
- [14] GAGE L.P., MANNING R.F. (1980), *J. Biol. Chem.* 255, 9444.
- [15] SHIMURA K. (1983), *Experientia* 39, 455.
- [16] SASAKI T., NODA H. (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, 310, 91.

- [17] SHIMURA K., KIKUCHI A., OHOTOMO K., KATAGATA Y., HYODO A. (1976), *J. Biochem.*, 80, 693.
- [18] GAMO T., INOKUCHI T., LAUFER H. (1977), *Insect Biochem.*, 7, 285.
- [19] OHMACHI T., SHIMURA K. (1981), *J. Biochem.*, 89, 531.
- [20] TOKUTAKE (1980), *Biochem. J.* 187, 413.
- [21] SHIMURA K., KIKUCHI A., KATAGATA Y., OHOTOMO K. (1982), *J. Seric. Sci. Tokyo*, 51, 20.
- [22] SONG Z., SPEAKMAN P.T. (1986), *Biochem. Soc. Trans.*, 14, 332.
- [23] CHEVILLARD M., DELEAGE G., COUBLE P. (1986), *Sericologia*, 26, 435.
- [24] OYAMA F., MIZUNO S., SHIMURA K. (1984), *J. Biochem.*, 96, 1143.
- [25] SHIMURA K. (1988), *Sericologia*, 28, 457.

FRACTIONNEMENT HPLC DES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES SOLUBLES (Cs) DE LA FIBROÏNE DE *BOMBYX MORI*

G. FREDDI, S. FARADÒ et T. MAIFRENI.

Stazione sperimentale per la Seta, Via Giuseppe Colombo, 81, 20133 Milano, Italie.

Des peptides Cs obtenus par hydrolyse enzymatique de la fibroïne avec de l' α -chymotrypsine ont été fractionnés par chromatographie de filtration sur gel et analysés par chromatographie liquide haute performance en phase inversée. Les peptides les plus importants ont été isolés, puis on a déterminé leur composition en acides aminés. Les peptides Cs ont été répartis en sept groupes. Les cinq premiers groupes représentent les deux tiers de la fraction Cs et sont constitués de peptides appartenant à la sous-unité H de la fibroïne, ainsi qu'on peut le déduire d'après leur composition en acides aminés, leur concentration en glycine et leur indice hydrophobique. Le sixième groupe présente des caractéristiques intermédiaires, tandis que le septième groupe est principalement composé de peptides dérivant de l'hydrolyse enzymatique de la ou des sous-unités L. Suivant le taux des principaux acides aminés constituant des peptides, les peptides Cs de la chaîne H ont été divisés en quatre groupes principaux. Ceci semble indiquer la présence de quelques séquences peptidiques spécifiques qui alternent de manière régulière dans les régions dites amorphes de la chaîne lourde de la fibroïne.

INTRODUCTION

On a souvent utilisé le fractionnement par les enzymes hydrolytiques dans l'étude de la structure chimique de la fibroïne de *Bombyx mori* [1-10].

L'action de l' α -chymotrypsine sur une solution aqueuse de fibroïne donne deux fractions appelées Cp et Cs. La première est constituée de peptides hydrophobiques qui sont précipités au cours de l'hydrolyse, la deuxième est formée d'un mélange tout à fait complexe de peptides solubles dans l'eau.

La composition en acides aminés et la séquence des peptides Cp ont toutes deux été étudiées de manière approfondie [2, 5, 7, 8]. Les résidus glycine occupent des positions alternées avec les résidus alanine ou sérine sur des séquences assez longues de la chaîne polypeptidique. On pense que ces séquences très régulières sont en rapport avec la formation de la structure en feuille β à plis antiparallèles qui caractérise les régions cristallines de la bave filée [11, 12, 13].

La fraction Cs est beaucoup plus hétérogène, car formée de plusieurs peptides de taille (généralement plus courts que les peptides Cp), de composition et de séquences différentes [3, 9]. En raison de leurs caractéristiques chimiques, les peptides ont été associés avec les régions amorphes de la fibre. De plus, il a été avancé que les peptides des régions amorphes et cristallines pouvaient alterner dans l'ensemble de la molécule de fibroïne, formant une structure de type co-polymère [3, 4, 14, 15].

Récemment, toutefois, différents auteurs ont proposé un modèle de structure sous-unitaire pour la fibroïne. D'après ce modèle, la molécule de fibroïne devrait être constituée d'une chaîne polypeptidique lourde (H) et d'au moins une chaîne polypeptidique légère (L). La composition en acides aminés des petits polypeptides, soit isolés de la fibroïne de la glande séricigène postérieure [16-19] et de la fibroïne du cocon [20-22], soit déterminés d'après la séquence codante du gène [23], indique que la plupart des acides aminés comportant des chaînes latérales polaires et non-polaires importantes sont concentrés dans la ou les sous-unités légères, au lieu d'être répartis dans les régions amorphes dans l'ensemble de la molécule de fibroïne.

Ces constatations rendent nécessaire un nouvel examen de la structure et des propriétés physico-chimiques des régions amorphes de la fibroïne.

Nous pensons que, pour bien étudier la question, il faut approfondir la connaissance des fractions solubles qui se forment lors de l'hydrolyse enzymatique de la fibroïne. Aussi avons-nous commencé par l'étude de la fraction Cs obtenue à partir de la soie grège décreusée.

Nous allons également explorer les possibilités d'application des techniques de chromatographie, telles que la chromatographie liquide haute performance en phase inversée dont le rôle s'élargit comme méthode efficace de séparation et de purification des peptides d'origine tant naturelle que synthétique.

La haute performance de cette technique (sensibilité, sélectivité, reproductibilité) et son adaptabilité permettent de répondre à une gamme étendue d'exigences analytiques comme, par exemple, la nécessité de séparer les mélanges très complexes de peptides.

Cette étude présente les premiers résultats du fractionnement RP-HPLC des peptides Cs. Les peptides les plus importants ont été isolés et leur composition en acides aminés a été déterminée.

MATERIELS ET METHODES

Fibroïne de *Bombyx mori*

La fibroïne de *Bombyx mori* a été obtenue à partir de la soie grège chinoise 20/22 den décreusée avec une solution à 7g/l de savon de Marseille à deux reprises pendant 1/2 heure à ébullition (taux du bain : 1/50). Après avoir été lavée plusieurs fois à l'eau et séchée à température ambiante, la fibroïne a été extraite suivant la méthode de Soxhlet avec de l'éther de pétrole et équilibrée pendant une nuit avec une solution acétique-acétate de sodium (0,02 M).

Préparation de la fraction Cs

Une solution aqueuse à 1 % (l/v) de fibroïne a été préparée suivant la méthode de Zahn et coll. [5]. La solution de fibroïne, tamponnée à pH 8 avec une solution de bicarbonate d'ammonium à 0,1 M fraîchement préparée, a été digérée avec de l' α -chymotrypsine durant 24 h à 40°C (rapport substrat-enzyme 1/100). Le précipitat formé au cours de l'hydrolyse (fraction Cp) a été centrifugé, lavé deux fois avec de l'eau distillée et lyophilisé. Le surnageant, auquel on a ajouté les lavages, a été lyophilisé avant d'effectuer les analyses (fraction Cs).

Chromatographie de filtration sur gel (GFC)

Les peptides Cs dissous dans l'eau ont été soumis à un fractionnement préliminaire par GFC sur une colonne de Sephadex G-25 (1,6 x 90 cm) avec de l'eau distillée ou un tampon de phosphate de sodium à 0,05 M, pH 7,2, avec 0,1 M NaCl comme éluants. Les peptides ont été détectés à 214 nm et les fractions correspondant aux pics ont été prélevées au moyen d'un collecteur de fractions automatique (GILSON, mod. 201).

Chromatographie liquide haute performance en phase inversée (RP-HPLC)

Les fractions de peptides obtenues par GFC ont été concentrées avec un évaporateur rotatif et analysées par RP-HPLC. Les fractionnements, aussi bien analytique que semi-préparatif, ont été effectués sur une colonne μ -Bondapak C-18 (3.9 mm x 30 cm, taille de la particule 10 μ m). Les peptides ont été élués à température ambiante par un gradient linéaire de 30 mn d'un solvant A à 100 % à un solvant formé du mélange de A à 50 % et de B à 50 %, à un taux d'écoulement constant de 1 ml/mn (solvant A : eau contenant 0,1 % de TFA ; solvant B : acétonitrile contenant 0,1 % de TFA) puis détectés à 214 nm. Les séparations HPLC ont été réalisées au moyen d'un système HPLC WATERS comprenant deux pompes mod. 510, un moniteur de gradient automatisé mod. 680, un module d'injection type automatique mod. 712 WISP, un détecteur UV/Vis à multiples longueurs d'ondes programmable mod. 490 et une station de travail de chromatographie Maxima 820. Les fractions ont été prélevées au moyen d'un collecteur de fraction automatique mod. 201 (GILSON).

Analyse des acides aminés

Les fractions de peptides ont été hydrolysées avec 6N HCl, à 105°C pendant 24 h dans des tubes sous vide. Leur composition en acides aminés a été déterminée avec un analyseur d'acides aminés Liguimat III (KONTRON) au moyen d'un système de tampon citrate de sodium (PIERCE, Pico Buffer System II).

RESULTATS

Fractionnement GFC des peptides Cs

Le tableau I donne la composition en acides aminés de la fibroïne et des fractions obtenues par hydrolyse enzymatique avec de l' α -chymotrypsine. Les peptides de la fraction Cp proviennent de la sous-unité lourde de la fibroïne [8], tandis que ceux de la fraction Cs viennent à la fois des sous-unités lourde et légère [9].

Le fractionnement par filtration sur gel des peptides Cs a permis d'obtenir six fractions (Fig. 1) qui ont été appelées Cs-A, Cs-B, ... Cs-F dans l'ordre croissant du volume d'éluion. Le tableau II donne leur composition en acides aminés. Le taux de récupération total des peptides dans l'éluion de filtration sur gel est de 80 %.

Si l'on admet que tous les peptides ont un résidu d'acide aminé aromatique dans leur position C-terminale, la longueur d'un peptide moyen a été évaluée de 5 (fraction Cs-F) à 17 résidus (fraction Cs-A). Cette évaluation corrobore les résultats d'autres auteurs [3, 9] et semble tout à fait correct pour toutes les fractions, hormis Cs-A, dont le comportement GFC indique la présence de peptides beaucoup plus longs. Les tests de filtration sur gel HPLC préliminaires (colonne TSK G-2000, 7,5 mm x 30 cm, taille de la particule 10 μ m, LKB) confirment que ces peptides ont un poids moléculaire plus élevé que ne le laissait penser le nombre moyen de résidus. Des expériences supplémentaires sont actuellement en cours afin d'éclaircir cet aspect de la question.

En ce qui concerne la distribution quantitative des peptides dans les diverses fractions, 43,5 % d'entre eux vont dans la fraction Cs-A. Pour les autres fractions, la plus importante est la fraction Cs-E qui est caractérisée par un contenu en glycine et en alanine très élevé et par un rapport P/NP similaire à celui des peptides Cp. Cette fraction diffère tout à fait des autres fractions et est similaire dans sa composition en acides aminés à la fraction S-III isolée par Kataga et coll. [9].

Analyse RP-HPLC des peptides Cs

La carte peptidique de la fraction Cs totale est plutôt complexe (Fig. 2). Les fractions obtenues par GFC ont donné, comme prévu, des cartes peptidiques plus simples (Fig. 3 à 8), même si nos conditions d'analyses ne nous ont pas permis, dans certains cas, de séparer les peptides individuellement, comme pour la fraction Cs-A et certains composants mineurs d'autres fractions.

Fraction Cs-A (Fig. 3, tableau III). Sept fractions ont été séparées et analysées suivant les principaux pics RP-HPLC (chaque pic représente un mélange de plusieurs peptides ayant un temps de rétention similaire).

Une caractéristique particulièrement importante est la forte concentration en sérine dans toutes les fractions (11 %), et le contenu élevé en acides aminés acides dans les fractions A-6 et A-7 (20 %). Il est à noter que certains de ces peptides sont similaires dans leur composition aux fractions de peptides solubles S-I séparées par Katagata et coll. [9] par hydrolyse enzymatique de la sous-unité lourde de la fibroïne.

Fraction Cs-B (Fig. 4, tableau IV). Le peptide qui caractérise cette fraction a été séparé et sa composition en acides aminés a été déterminée. La glycine, l'alanine et la sérine sont présentes dans des proportions similaires à celles rencontrées dans la fibroïne. La forte concentration en proline et la présence de tyrosine et de phénylalanine dans un rapport molaire de 1/1 constituent une autre caractéristique remarquable de cette fraction.

Fraction Cs-C (Fig. 5, tableau V). Le peptide C-4 est tout à fait similaire à B-1 à la fois pour son temps de rétention et pour sa composition. Le premier, toutefois, ne contient pas de proline. Parmi les autres peptides, C-1, C-3 et C-5 présentent une forte proportion en acides aminés acides et aromatiques (particulièrement acide aspartique) et en valine.

Fraction Cs-D (Fig. 6, tableau VI). Ce n'est pas une fraction très importante du point de vue quantitatif (voir tableau II). Les fractions séparées et analysées correspondent à six pics : le quatrième et le cinquième sont constitués de plusieurs peptides. D-1 et D-2 ont pratiquement la même composition. D-3 et D-5 sont également tout à fait similaires entre eux et à D-1 et D-2 en ce qui concerne la concentration en glycine. Les quatre fractions de peptides ont un rapport P/NP très faible, comparable à celui de Cp. D-4 et D-6 donnent des concentrations en glycine et en alanine relativement faibles. Les taux élevés d'acide glutamique (11 %) et de proline (comme pour B-1 et C-5) sont tout à fait remarquables.

Fraction Cs-E (Fig. 7, tableau VII). C'est la plus intéressante des fractions obtenues par GFC. Elle comprend cinq pics bien séparés qui caractérisent la carte peptidique de la fraction Cs par leur intensité. Tous les peptides, mis à part le quatrième, montrent une concentration élevée en glycine. Le rapport GLY/ALA varie d'une manière remarquable d'un minimum de 1,38 (E-1) à un maximum de 2,46 (E-5). Le contenu en valine augmente au fur et à mesure que la concentration en alanine diminue. En rapport avec la séquence d'acides aminés typique "-gly-X-gly-X-gly-" qui caractérise une grande partie de la molécule de fibroïne (sous-unité H), il est possible que la valine occupe les positions "-X-" plus fréquemment, au lieu de l'alanine (ou de la sérine), dans certaines régions des peptides. Les peptides E-1 et E-2 correspondent aux peptides CsA-2 et CsA-3 isolés par F. Lucas et coll. [3] et aux peptides S-III-5a et S-III-5b isolés par Katagata et coll. [9].

Fraction Cs-F (Fig. 8, tableau VIII). C'est la fraction la moins importante du point de vue quantitatif. Les deux peptides séparés et analysés ont un rapport GLY/ALA assez élevé. L'un d'eux contient un taux élevé de tyrosine, tandis que l'autre est riche en acides aminés acides et en valine. F-2 est le seul des peptides examinés dont la concentration en phénylalanine est deux fois plus élevée que celle de la tyrosine.

DISCUSSION

Les différentes compositions en acides aminés des peptides séparés et analysés par RP-HPLC montrent des analogies significatives suivant lesquelles les peptides ont été divisés en sept groupes (tableau IX).

Les cinq premiers groupes représentent environ 2/3 des peptides Cs et sont caractérisés par un rapport P/NP assez faible, sans différence notable par rapport à celui de la fibroïne et de la fraction Cp. Pour chacun de ces groupes, les principaux acides aminés formant ces peptides sont dans un rapport constant.

Le sixième groupe possède des caractéristiques intermédiaires par rapport aux cinq premiers groupes et au septième. Le dernier groupe est plutôt hétérogène. Tous ses peptides, cependant, contiennent des proportions de glycine et d'alanine relativement faibles et un taux élevé d'acides aminés polaires et à chaîne latérale importante.

Nous avons essayé d'établir une corrélation entre les groupes de peptides mentionnés ci-dessus et les caractéristiques chimiques des sous-unités H et L qui constituent la molécule de fibroïne.

Actuellement, les compositions en acides aminés, telles que les ont déterminées différents auteurs, ne concordent pas totalement [16-23]. Toutefois, on peut supposer que le septième groupe est constitué principalement de peptides provenant de l'hydrolyse enzymatique de la ou des sous-unités légères.

Il est possible que le sixième groupe contienne des fragments de peptides provenant aussi bien des sous-unités H que des sous-unités L, reliés par au moins une liaison disulfure. La présence de cystine aurait pu corroborer cette hypothèse, mais, au cours de nos analyses, nous n'en avons trouvé qu'en quantité infime.

Les peptides des cinq autres groupes possèdent les caractéristiques chimiques de la sous-unité H. La somme des concentrations en glycine et en alanine dépasse 70 % et la glycine seule s'approche souvent des 50 %. Ceci confirme le fait que ces peptides appartiennent à la sous-unité lourde dans laquelle les résidus glycine occupent des positions alternées sur pratiquement l'ensemble de la molécule [8, 9, 15]. Il est utile de souligner que tous ces peptides pourraient être répartis sur un nombre relativement limité de groupes (quatre, à l'exclusion du premier groupe qui n'est pas très important sur le plan quantitatif). Ceci nous amène à penser que, même dans les régions dites amorphes de la sous-unité H, un nombre réduit de séquences peptidiques courtes alternent de manière répétitive. Dans ce cas, le modèle de structure co-polymère, proposé jusqu'à présent comme structure primaire de la chaîne lourde de fibroïne comme un tout [15], devrait également être appliqué aux régions amorphes de la sous-unité H.

La plupart des peptides des cinq premiers groupes ont un indice hydrophobique (exprimé par le rapport P/NP) tout à fait similaire à celui des peptides Cs. On peut donc supposer que les propriétés chimiques des régions dites amorphes ne sont pas si différentes de celles des régions cristallines. Du point de vue physique, les peptides Cs de la chaîne H ne peuvent prendre part à la formation des structures cristallines strictement ordonnées. La présence fréquente dans leur séquence d'acides aminés ayant de longues chaînes latérales permet d'éviter un tassement avec les chaînes de fibroïne adjacentes, comme c'est le cas pour les peptides Cs des régions cristallines [11].

Selon certains auteurs, il est possible que le pourcentage en poids de la sous-unité L (en référence à la molécule de fibroïne constituée par les deux sous-unités H et L pour un rapport molaire de 1/1), s'échelonne de 7 à 10 [22, 24, 15]. Il semble que cette évaluation soit confirmée par la répartition des peptides séparés et analysés dans cette étude.

CONCLUSION

Les résultats obtenus dans cette étude nous ont permis de faire une description assez détaillée des caractéristiques physico-chimiques des régions amorphes de la sous-unité H, même si l'on est encore loin de connaître parfaitement leur structure primaire.

Etant donné la complexité de la fraction Cs, il n'a pas été possible de délimiter clairement les peptides de la ou des sous-unités L et d'évaluer le nombre et la répartition des différentes liaisons disulfures liant les sous-unités de fibroïne.

A cet égard, nous pensons que des informations plus intéressantes pourraient être obtenues grâce à l'analyse d'une autre fraction soluble de fibroïne par hydrolyse enzymatique avec la trypsine. Dans des tests préliminaires, un groupe de peptides particulièrement riches en cystine a été isolé. Son fractionnement HPLC est actuellement en cours et les résultats seront communiqués prochainement.

GENETIC ANALYSIS OF SOME QUANTITATIVE TRAITS BY DIALLEL CROSS IN SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

S.B. SATENAHALLI, R. GOVINDAN & J.V. GOUD.

Department of Sericulture, University of Agricultural Sciences, Bangalore 560065, India.

*The genetic analysis was carried out for larval duration, pupal duration, moth emergence and fecundity in 7 x 7 diallel cross of silkworm *Bombyx mori* by components and graphical analysis. Additive gene action operated for pupal duration and moth emergence while non-additive one was observed for others. Duplicatory type of epistatic gene interaction was encountered for all traits except larval duration for which interaction was inconclusive.*

Keywords : *Bombyx mori*, genetic analysis, quantitative traits.

INTRODUCTION

Knowledge on the nature of gene action and number of genes controlling the expression of a quantitative trait is of paramount importance to the breeder to have a sound breeding programme. Since the quantitative traits are governed by polygenes, their inheritance is complex in nature. Hence, these are to be studied by the application of sophisticated biometrical methods. Diallel technique is one such method which has been used for genetic analysis in silkworm, *Bombyx mori* L. (Krishnaswami *et al.*, 1964; Sengupta *et al.*, 1974; Gamo and Hirabayashi, 1983). Perusal of available literature revealed no information on the genetic analysis of larval duration, pupal duration, moth emergence and fecundity. As such present investigation was therefore undertaken to determine the degree of dominance and presence of epistatic gene interaction and the results are reported in this paper.

MATERIALS AND METHODS

Seven inbred lines, namely, Pure Mysore (PM) and C. Nichi (CN) being multivoltine and Saniish-18 (SH), J₁₁₂ (J1), J₁₂₂ (J2), Kalimpong-A (KA) and NB₇ (NB) being bivoltine were crossed in 7 x 7 diallel fashion to obtain 42 F₁ s. All the 42 combinations along with seven parents were reared simultaneously under a controlled room temperature of 27 ± 2°C in the same room during April 1986 as per Krishnaswami (1978). Each plot was replicated three times. For each replication of a plot, 500 eggs were sampled from five layings and after third moult 300 individuals were used for each replication for determining the total larval and pupal duration. To determine the fecundity, five layings were used for counting the total number of eggs laid by an individual female moth. The analysis of variance was carried out as per the methods of Panse and Sukhatme (1961). Genetic components of variance in the broader and more inclusive way and graphic analysis were carried out by the methods of Jinks and Hayman (1953) and Hayman (1954a, b) and inferences were drawn.

Table I. Larval duration, pupal duration, moth emergence and fecundity of parents and F₁ hybrids in a complete diallel cross of seven silkworm strains.

Tableau I. Période larvaire, période nymphale, émergence du papillon et fécondité des parents et des hybrides F₁ dans un croisement diallèle complet de sept souches de vers à soie.

Entries <i>Données</i>	Larval duration <i>Durée larvaire</i>	Pupal duration <i>Période nymphale</i>	Moth emergence <i>Émergence des papillons</i>	Fecundity <i>Fécondité</i>
	(hr)	(hr)	(%)	
Parents				
PM	677	289	99.60 (86.62)	358.17
CN	560	287	99.03 (84.35)	350.50
SH	639	338	93.14 (74.85)	480.00
J-1	616	321	92.95 (74.65)	454.33
J-2	634	335	92.46 (74.09)	411.00
KA	662	360	95.79 (78.17)	427.17
NB	633	378	93.97 (75.88)	448.00
F₁'s				
PM x CN	595	286	99.19 (84.93)	496.67
PM x SH	619	296	98.47 (82.83)	584.17
PM x J-1	601	306	99.03 (84.39)	568.50
PM x J-2	602	303	98.56 (79.90)	578.67
PM x KA	631	305	99.06 (84.42)	525.83
PM x NB	616	302	97.45 (80.92)	571.00
CN x PM	580	262	97.65 (81.17)	473.33
CN x SH	606	319	97.48 (80.91)	541.00
CN x J-1	596	317	97.71 (81.56)	600.83
CN x J-2	592	303	97.53 (81.02)	633.00
CN x KA	594	318	95.62	585.67

Continued / Suite page suivante

Table I. Continued / *Tableau I. Suite*

Entries <i>Données</i>	Larval duration <i>Durée larvaire</i>	Pupal duration <i>Période nymphale</i>	Moth emergence <i>Emergence des papillons</i>	Fecundity <i>Fécondité</i>
	(hr)	(hr)	(%)	
CN x NB	603	315	(77.96) 93.64	608.17
SH x PM	599	305	(75.40) 95.96	592.50
SH x CN	580	288	(78.49) 92.72	629.00
SH x J-1	596	325	(74.37) 92.77	570.83
SH x J-2	607	325	(74.41) 95.08	492.50
SH x KA	621	342	(77.28) 96.99	539.17
SH x NB	606	343	(80.05) 95.67	612.83
J-1 x PM	592	281	(78.00) 97.41	533.83
J-1 x CN	562	293	(80.78) 95.57	529.83
J-1 x SH	588	328	(77.98) 93.79	566.17
J-1 x J-2	615	337	(75.61) 95.51	482.83
J-1 x KA	601	319	(77.81) 90.09	495.83
J-1 x NB	587	328	(84.55) 94.69	587.83
J-2 x PM	579	298	(76.75) 94.55	511.00
J-2 x CN	567	297	(76.48) 95.82	443.33
J-2 x SH	592	331	(78.24) 95.23	460.00
J-2 x J-1	589	311	(77.39) 94.22	451.50
J-2 x KA	618	325	(76.11) 98.32	531.50
J-2 x NB	606	341	(82.58) 96.57	542.33
KA x PM	580	308	(79.32) 96.13	470.17
			(78.68)	

Continued / *Suite page suivante*

Table I. Continued / *Tableau I. Suite*

Entries <i>Données</i>	Larval duration <i>Durée larvaire</i>	Pupal duration <i>Période nymphale</i>	Moth emergence <i>Emergence des papillons</i>	Fecundity <i>Fécondité</i>
	(hr)	(hr)	(%)	
KA x CN	541	296	93.67 (75.49)	465.00
KA x SH	630	333	94.33 (76.23)	567.50
KA x J-1	606	322	94.15 (76.04)	550.67
KA x J-2	603	334	92.04 (73.64)	476.50
KA x NB	629	328	94.85 (77.54)	482.17
NB x PM	598	288	98.16 (82.23)	498.00
NB x CN	581	297	92.32 (73.91)	489.67
NB x SH	616	329	91.86 (77.74)	507.17
NB x J-1	569	324	91.90 (73.52)	497.67
NB x J-2	584	344	93.56 (75.37)	422.00
NB x KA	634	360	90.33 (71.98)	414.00
S.Em±	3.47	3.93	1.53	13.93
<i>Ecart type</i> ±				
C.D. at 5%	9.61	10.9	4.24	38.62

Figures in parentheses are angular transformed values. /

Les chiffres entre parenthèses expriment les valeurs transformées angulaires.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the investigation are discussed below.

The *per se* performance of parental breeds and F_1 's in respect of larval duration, pupal duration, moth emergence and fecundity has been furnished in Table I. F_1 s KA x CN, J-1 x CN and J-2 x CN ; CN x PM, J-1 x PM, PM x CN and SH x CN ; NB x KA, J-1 x KA, PM x KA and PM x J-1 and CN x J-2, SH x CN and SH x NB were top performers for larval duration, pupal duration, moth emergence and fecundity, respectively (Table I). F test indicated that the variances in respect of all the four traits tested were highly significant (Table II).

Table II. Analysis of variance in four quantitative traits in complete diallel set of silkworm.

Tableau II. Analyse de variance pour quatre traits quantitatifs d'un lot de vers à soie en diallèle complet.

Source Source	DF Degré liberté	Mean sum of squares / <i>Somme moyenne des carrés</i>			
		Larval duration <i>Période larvaire</i>	Pupal duration <i>Période nymphale</i>	Moth emergence <i>Emergence du papillon</i>	Fecundity <i>Fécondité</i>
		(hr)	(hr)	(%)	
Replication <i>Répétitions</i>	2	17.00	55.0*	0.47	322.00
Treatment <i>Traitement</i>	48	1932.71**	1571.58**	38.01**	13692.06**
Error <i>Erreur</i>	96	18.08	23.22	3.53	291.29
S.E (±) <i>Ecart type (±)</i>		3.472	3.934	1.533	13.935
C.D. at 5 %		6.80	7.71	3.00	27.31

* Significant deviation from zero but not from unity / *Ecart significatif de zéro mais pas de l'unité.*

** Significant deviation from both zero and unity / *Ecart significatif de zéro et de l'unité.*

Larval duration :

Higher dominance magnitude (H_1) than additive as well as high level significance of H_2 suggested the importance of dominant gene action in the inheritance of larval duration (Table III). High level significance of D also indicated the possible role of additive gene action. The heritability in narrow sense was 0.483. The value of h^2 / H_2 indicated 2 to 3 groups of effective factors involved for this trait. The regression line of W_r on V_r passed through W_r axis slightly above the point of origin (Fig. 1A) thus suggesting the operation to be towards complete dominance. The parental breeds except PM(P) and KA(K) had excess of dominant genes (Fig. 1B). Comparison of distribution of array points with respect to b-line did not indicate specific gene interaction (Table IV).

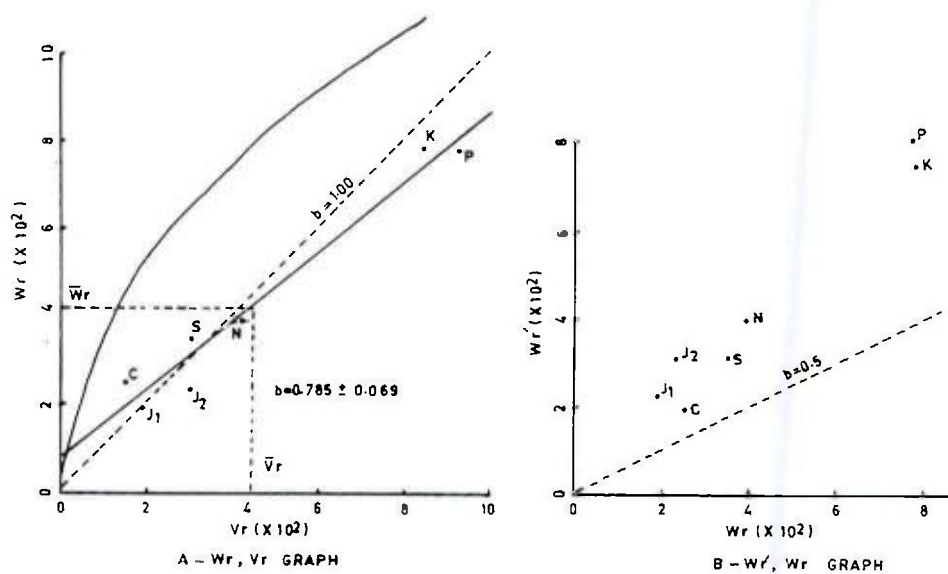


Fig. 1 : Larval duration.
Fig. 1 : Durée larvaire.

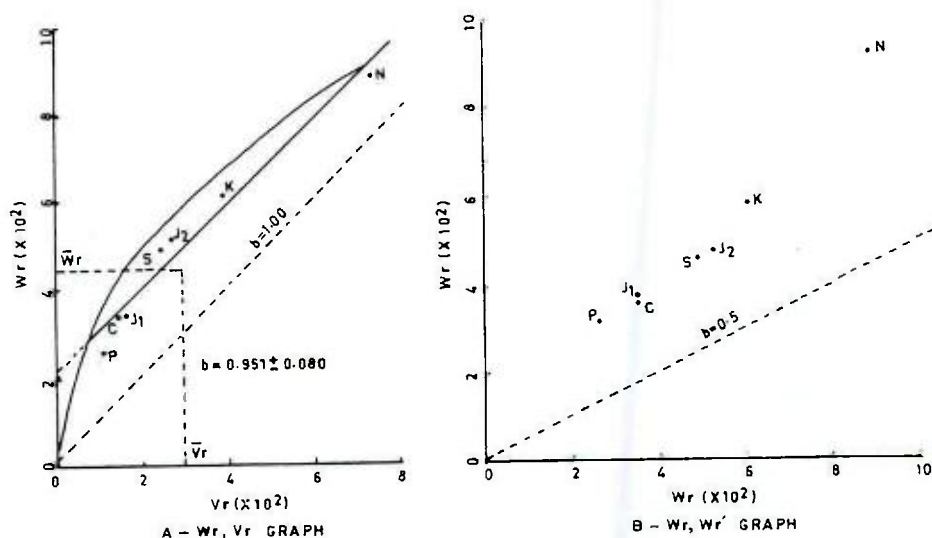


Fig. 2 : Pupal duration.
Fig. 2 : Durée nymphale.

Pupal duration :

Additive component (D) was higher than dominance components (H_1 , H_2) suggesting predominance of additive effects. The ratio of $\sqrt{H_1/D}$ was 0.54. The values of hB^2 (0.985) and hN^2 (0.866) indicated very high heritability. $K = h^2 / H_2$ was 2.66 thus revealing the involvement of 2 to 3 groups of dominant genes in the control of this trait. Interception of W_r axis by the regression line ($b = 0.951 \pm 0.08$) above origin (Fig. 2A) clearly demonstrated the operation of partial dominance. Further, the distribution of parental array in Fig. 2A and 2B suggests duplicatory type of epistatic gene interaction in the control of pupal duration. The correlation between Y_r and ($W_r + V_r$) was positively significant (Table IV) indicating desirable effect of concentration of dominant genes among the parents in reducing pupal duration.

Table III. Estimation of genetic parameters in four quantitative characters of the silkworm.

Tableau III. Estimation des paramètres génétiques pour quatre caractères quantitatifs du ver à soie.

Genetic parameter <i>Paramètre génétique</i>	Larval duration <i>Durée larvaire</i>	Pupal duration <i>Durée nymphale</i>	Moth emergence <i>Emergence des papillons</i>	Fecundity <i>Fécondité</i>
D	1397.00	1143.00	24.59	2292.00
H_1	1484.00	331.61	15.19	13379.15
H_2	1204.00	251.72	10.93	11377.85
F	1103.00	304.70	16.19	2986.00
E	6.03	7.74	1.18	97.10
$\sqrt{H_1/D}$	1.03	0.54	0.79	2.41
hB^2	0.989	0.985	0.885	0.973
hN^2	0.483	0.866	0.618	0.182
$K = h^2 / H_2$	2.77	2.66	-0.05	3.10

Moth emergence :

The additive component was more (24.59) compared to dominance components - H_1 (15.19) and H_2 (10.93) for the rate of moth emergence (Table III). Further the ratio of $\sqrt{H_1/D}$ (0.79) indicated partial dominance. This trait had broad sense heritability of 0.885, while narrow sense heritability was 0.618. All these indicated the operation of additive gene action in expression of this trait. The number of groups of dominant genes governing moth emergence was not conclusive. Graphical analysis also suggested the operation of partial dominance as the regression line intersected W_r axis above the origin (Fig. 3A). Parental array point distribution indicated C. Nichi (C) and J_{112} (J1) to possess maximum concentration of recessive genes. The interaction was of duplicatory type of epistasis (Fig. 3A & B). Correlation between Y_r and ($W_r + V_r$) was positive but non-significant (0.452) indicating the importance of recessive genes for improvement of this character in positive direction (Table IV).

Fecundity :

The additive component was much less (2292.0) than the dominance components ($H_1 = 13379.15$; $H_2 = 11377.85$) thus revealing the importance of overdominance in expression of this character (Table III). Low heritability in narrow sense (0.182) also indicated predominant role of dominant gene action. Nevertheless, Jolly *et al.* (1965) reported additive gene action for fecundity in *B. mori* while studying the effect of genetic diversity on hybrid performance among multivoltine

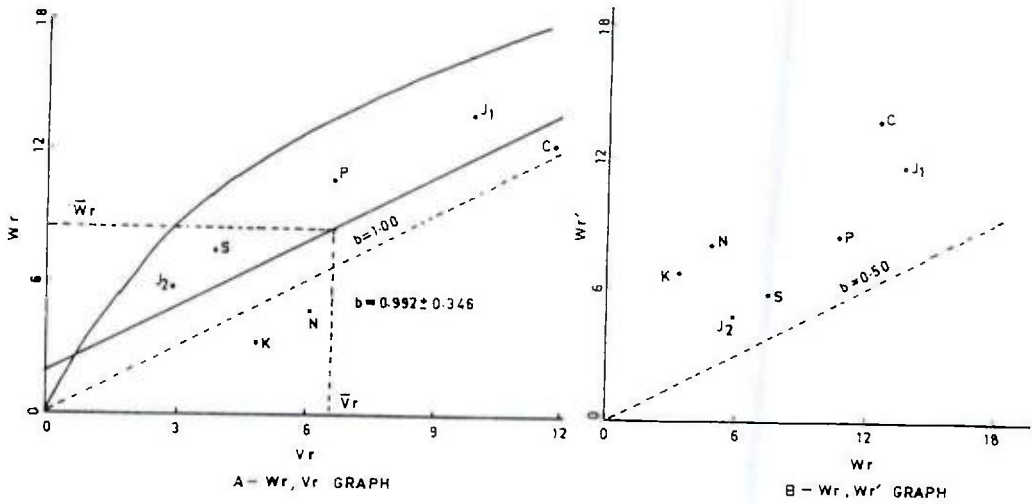


Fig. 3 : Moth emergence percentage.
Fig. 3 : Pourcentage d'émergence des papillons.

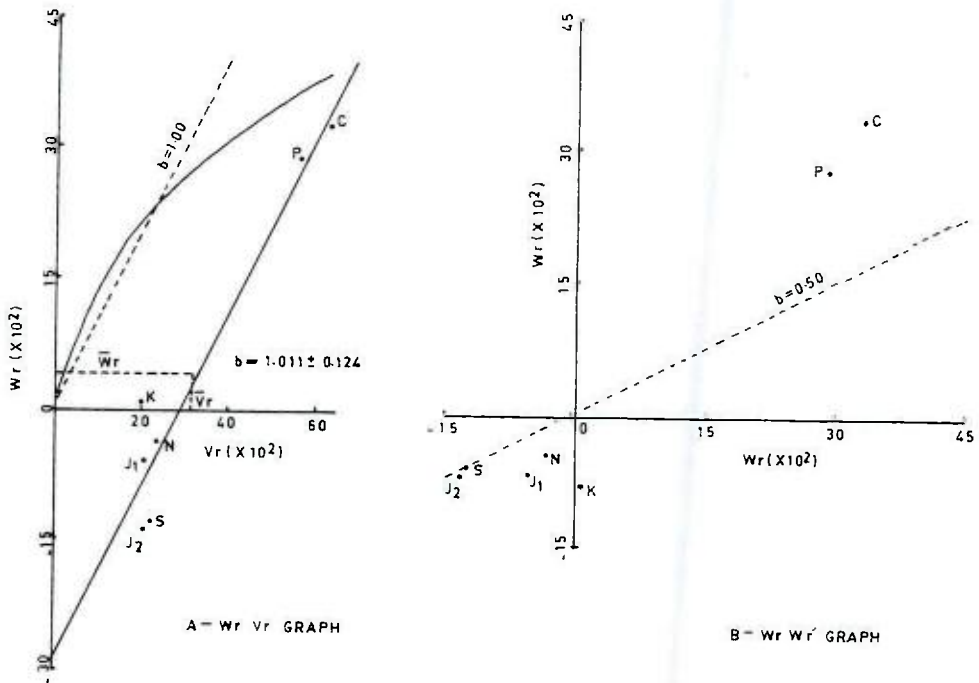


Fig. 4 : Fecundity.
Fig. 4 : Fécondité.

breeds. The value of h^2 / H_2 indicated 3 groups of dominant genes in control of this trait. Graphic representation of gene action (Fig. 4A & B) too revealed overdominance gene action confirming the ratio of $\sqrt{H_1} / D$. The regression value of W_r on V_r ($b = 1.011 \pm 0.124$) has not deviated significantly from unity (Table IV) suggesting the absence of large quantity of epistasis. However, the pattern of scattering of array points in (W_r, V_r) and (W_r, W_r') graphs (Fig. 4A & B) with respect to theoretical regression line exhibited duplicatory type of interaction. Correlation between Y_r and $(W_r + V_r)$ was negatively significant and hence concentration of dominant genes results in increasing fecundity.

Table IV. Regression coefficients of W_r on V_r , correlation between Y_r and $(W_r + V_r)$ and gene interaction for quantitative traits in silkworm, *Bombyx mori* L.

*Tableau IV. Coefficients de régression de W_r sur V_r , corrélation entre Y_r et $(W_r + V_r)$ et interaction génétique pour les traits quantitatifs chez le ver à soie, *Bombyx mori* L.*

Character <i>Caractère</i>	'Y' intercept <i>Intersection 'Y'</i>	Regression of W_r on V_r with standard error <i>Régression de W_r sur V_r avec écart type</i>	Type of gene interaction indicated <i>Type d'interactions de gènes</i>	Correlation between Y_r and $(W_r + V_r)$ <i>Corrélation entre Y_r et $(W_r + V_r)$</i>
Larval duration <i>Durée larvaire</i>	72.00	$0.785^{**} \pm 0.069$	No indication <i>Sans indication</i>	0.785+
Pupal duration <i>Durée nymphale</i>	214.03	$0.951^* \pm 0.080$	Duplicatory <i>Duplicat</i>	0.901++
Moth emergence <i>Emergence des papillons</i>	1.90	$0.992^* \pm 0.346$	Duplicatory <i>Duplicat</i>	0.452
Fecundity <i>Fécondité</i>	-2846.48	$1.011^* \pm 0.124$	Duplicatory <i>Duplicat</i>	-0.891++

* Significant deviation from zero but not from unity / *Ecart significatif de zéro mais pas de l'unité.*

** Significant deviation from both zero and unity / *Ecart significatif de zéro et de l'unité.*

+ Significant at 5 % probability level / *Significatif à une probabilité de 5 %.*

++ Significant at 1 % probability level / *Significatif à une probabilité de 1 %.*

The results of estimation of genetic parameters and the regression analysis of W_r on V_r indicated that additive component was more predominant for pupal duration as well as moth emergence. Thus these characters were recognized to have incomplete dominance. However, larval duration has a tendency to be controlled by complete dominance whereas fecundity exhibited overdominance as the dominance effects were larger than the additive ones. The gene interaction for three traits was of duplicatory type of epistasis while for larval duration no such interaction was encountered. As a result of this study, it is suggested that moth emergence could be further improved by selection process and fecundity could be improved through exploitation of heterosis. On the other hand, improvement in larval duration may be achieved through recurrent selection as both additive and non-additive components were equally important for this trait.

REFERENCES

GAMO T., HIRABAYASHI T. (1983), Genetic analysis of growth rate, pupation rate and some quantitative characters by diallel cross in the silkworm, *Bombyx mori* L. Japan J. Breed., 33, 178-190.

HAYMAN B. I. (1954a), The analysis of variance of diallel tables. *Biometrics*, 10, 235-244.

HAYMAN B. I. (1954b), The theory and analysis of diallel crosses. *Genetics*, 39, 789-809.

JINKS J. L., HAYMAN B. I. (1953), The analysis of diallel crosses. *Maize Genetics Cooper. Newsletter*, 27, 48-54.

JOLLY M. S., SUBBA RAO S., KRISHNASWAMI S. (1965), Effect of genetic diversity on hybrid performance in multivoltine Indian silkworm. *Indian J. Seric.*, 4, 9-12.

KRISHNASWAMI S. (1978), New technology of silkworm rearing. *Bulletin No. 2, C.S.R. & T.I, Mysore, India*, 23.

PANSE V. G., SUKHATME P. V. (1961), *Statistical methods for agricultural workers*. I.C.A.R, New Delhi, 361.

SENGUPTA K., YUSUF M. R., GROVER S. P. (1974), Hybrid vigour and genetic analysis of quantitative traits in silkworm. *Indian J. Genet.*, 3A, 249-256.

ANALYSE GENETIQUE DE CERTAINS TRAITS QUANTITATIFS PAR CROISEMENT DIALLELIQUE CHEZ LE VER A SOIE *BOMBYX MORI* L.

S. B. SATENAHALLI, R. GOVINDAN et J. V. GOUD.

Department of Sericulture, University of Agricultural Sciences, Bangalore - 560065, Inde.

*L'étude génétique a porté sur la durée de la période larvaire et de la période nymphale, l'émergence du papillon et la fécondité par croisement diallèle 7 x 7 du ver à soie *Bombyx mori*, par analyse des composants et analyse graphique. L'action de gènes additifs concerne la période nymphale et l'émergence du papillon alors que des gènes non additifs opèrent dans les autres cas. On observe pour tous ces traits une interaction de gènes épistatiques excepté pour la durée de la période larvaire pour laquelle une interaction n'a pu être démontrée.*

INTRODUCTION

La connaissance de la nature et du nombre de gènes qui contrôlent l'expression d'un caractère quantitatif a une importance capitale pour l'éleveur afin qu'il puisse avoir un programme sûr. Puisque les caractères quantitatifs sont régis par des polygènes, leur hérédité est de nature complexe. De ce fait, ceux-ci doivent être étudiés en utilisant des méthodes biométriques sophistiquées. La technique de croisement diallèle est une méthode qui a été utilisée pour l'analyse génétique du ver à soie *Bombyx mori* L. (Krishnaswami et coll., 1964 ; Sengupta et coll., 1974 ; Gamo et Hirabayashi, 1983). Les ouvrages disponibles ne donnent aucune information sur l'analyse génétique de la durée de la période larvaire et nymphale, sur l'émergence du papillon et la fécondité. Cette étude a donc été faite afin de déterminer le degré de dominance ainsi que la présence d'interaction de gènes épistatiques.

MATERIELS ET METHODES

Sept lignées consanguines à savoir Pure Mysore (PM) et C. Nichi (CN) races multivoltines et Saniish-18 (SH), J₁12 (J₁), J₁22 (J₂), Kalimpong-A (KA) et NB₇ (NB) races bivoltines, ont été croisées en diallèle 7 x 7 afin d'obtenir 42 F₁. Les 42 combinaisons ainsi que les 7 parents ont été élevés simultanément dans une même pièce à température ambiante de 27 ± 2°C en avril 1986, selon Krishnaswami, 1978. Trois réplicats ont été faits sur chaque lot. Dans chaque réplicat, 500 oeufs ont été sélectionnés dans cinq pontes et à la troisième mue 300 individus ont été utilisés pour chaque réplicat afin de déterminer les durées des périodes larvaire et nymphale totales. Afin de déterminer la fécondité, cinq pontes ont été utilisées pour calculer le nombre total d'oeufs pondus par un papillon femelle. L'analyse de la variance a été réalisée selon la méthode de Panse et Sukhatme (1961). Les composants génétiques de variance au sens large et l'analyse graphique ont été obtenus selon les méthodes de Jink et Hayman (1953) et Hayman (1954a, b).

RESULTATS ET DISCUSSION

La performance propre des races parentales et des hybrides F₁ en ce qui concerne la période larvaire, la période nymphale, l'émergence du papillon et la fécondité est donnée dans le tableau I. Les hybrides F₁ KA x CN, J-1 x CN et J-2 x CN ; CN x PM, J-1 x PM, PM x CN et SH x CN ;

NB x KA, J-1 x KA, PM x KA et PM x J-1 et CN x J-2, SH x CN et SH x NB donnent les meilleures performances en ce qui concerne la période larvaire, la période nymphale, l'émergence du papillon et la fécondité, respectivement (tableau I). Le test F indique que, pour ces quatre caractères, la variance était tout à fait significative (tableau II).

Période larvaire :

L'ordre de grandeur de dominance plus élevée (H_1) que l'additivité ainsi qu'une signification plus élevée de (H_2) suggèrent l'importance de l'action d'un gène dominant dans l'hérédité de la durée de la période larvaire (tableau III). Un degré de signification élevé de D indique également le rôle possible d'un gène additif. L'hérédité au sens strict est de 0,483. La valeur de h^2/H_2 indique 2 à 3 groupes de facteurs effectifs impliqués pour ces caractères. La droite de régression de W_r sur V_r coupe l'axe W_r légèrement au-dessus du point d'origine (Fig. 1A) et suggère ainsi une tendance vers une dominance totale. Les races parentales, à l'exception de PM(P) et KA(K) ont un excès de gènes dominants (fig. 1B). La comparaison de la distribution des points et de la droite b n'indique pas d'interaction de gène spécifique (tableau IV).

Période nymphale :

Le composant additif D est plus élevé que les composants de dominance (H_1 , H_2) ce qui suggère une prédominance des effets additifs. Le rapport $\sqrt{H_1/D}$ est de 0,54. Les valeurs de hB^2 (0,985) et hN^2 (0,866) indiquent une hérédité très élevée. $K = h^2/H_2$ est égal à 2,66 et traduit donc l'implication de 2 à 3 groupes de gènes dominants dans le contrôle de ce caractère. La rencontre entre l'axe W_r et la droite de régression ($b = 0,951 \pm 0,08$) au dessus du point d'origine démontre clairement la dominance partielle. De plus, la distribution des points parentaux dans les fig. 2A et 2B indique une interaction de gènes épistatiques de type duplicatif dans le contrôle de la période nymphale. La corrélation entre Y_r et ($W_r + V_r$) est significativement positive (tableau IV), ce qui indique un effet positif de concentration de gènes dominants chez les parents pour la réduction de la durée de la période nymphale.

Emergence du papillon :

Le composant additif est plus bas (24,59) que les composants de dominance H_1 (15,19) et H_2 (10,93) en ce qui concerne le taux d'émergence (tableau III). De plus, le rapport $\sqrt{H_1/D}$ (0,79) traduit une dominance partielle. Au sens large, ce caractère à une hérédité de 0,885, et une hérédité de 0,618 au sens strict. Ceci démontre le rôle de l'action de gènes additifs dans l'expression de ce caractère. Le nombre de groupes de gènes dominants qui influencent l'émergence du papillon n'est pas défini. L'analyse graphique suggère également un phénomène de dominance partielle puisque la droite de régression rencontre l'axe W_r au dessus du point d'origine (fig. 3A). La distribution des points parentaux montre que C. Nichi (C) et J112 (J1) possèdent une concentration maximale de gènes récessifs. L'interaction est un modèle de type duplicatif d'épistasie (fig. 3A & B). La corrélation entre Y_r et ($W_r + V_r$) est positive mais non significative (0,452) et souligne l'importance des gènes récessifs pour améliorer ce caractère.

Fécondité :

Le composant additif est moins élevé (2292,0) que les composants de dominance ($H_1 = 13379,15$; $H_2 = 11377,85$), ce qui révèle l'importance de la sur-dominance dans l'expression de ce caractère (tableau III). Une faible hérédité au sens strict (0,182) indique également le rôle majeur de l'action de gènes dominants. Néanmoins, Jolly et coll. (1965) signalent l'action de gènes additifs sur la fécondité chez *B. mori* durant l'étude de l'effet de la diversité génétique sur la performance des hybrides chez les races polyvoltines. La valeur de h^2/H_2 suggère qu'il existe 3 groupes de gènes dominants pour ce caractère. La représentation graphique de l'action des gènes (fig. 4A & B) révèle aussi l'action de gènes sur-dominants et confirme le rapport $\sqrt{H_1/D}$. La valeur de régression de W_r sur V_r ($b = 1,011 \pm 0,124$) ne varie pas de façon significative de l'unité (tableau IV), ce qui suppose l'absence d'une quantité importante d'épistasie. Néanmoins la distribution des points sur ($W_r V_r$) et sur les graphiques ($W_r W_r'$) (Fig. 4A & B) par rapport à la droite de régression théorique montre un

type d'interaction duplicatif. La corrélation entre Y_r et $(W_r + V_r)$ est négative de manière significative; la concentration de gènes dominants ne fait donc qu'augmenter la fécondité.

Les résultats de l'estimation des paramètres génétiques et l'analyse de régression de W_r sur V_r indiquent que le composant additif prédomine d'avantage pour la durée de la période nymphale et l'émergence du papillon. De ce fait, ces caractères présentent une dominance incomplète. Néanmoins, la durée de la période larvaire tend à être contrôlée par une dominance complète alors que la fécondité montre une sur-dominance puisque les effets de dominance sont plus importants que les effets additifs. Pour trois de ces caractères, l'interaction des gènes semble suivre le modèle duplicatif d'épistasie alors que cette interaction n'apparaît pas pour la période larvaire. Cette étude permet de constater que l'émergence du papillon peut être améliorée par le procédé de sélection et la fécondité peut être améliorée grâce à l'exploitation de l'hétérosis. D'autre part, la durée de la période larvaire peut être diminuée par des sélections renouvelées, puisque les composants tant additifs que non-additifs ont une importance égale pour ce caractère.

GIBBERELIC ACID IMPROVES THE COMMERCIAL CHARACTERISTICS OF SILKWORMS

M. SANTAKUMARI, V. M. SREEDHARA & R. A. FLETCHER *

Department of Environmental Biology, University of Guelph, Guelph, Ontario, N1G 2W1, Canada .

Larvae of Silkworm, Bombyx mori L., were fed a diet of mulberry leaves sprayed with either water or gibberellic acid (GA₃). The growth, reproduction and commercial characters of silkworm were recorded. The body weight of larvae and fecundity of silkworms fed on treated leaves were higher than the controls. The treatment improved several important economic characteristics such as cocoon yield, filament length, randitta and significantly increased silk production.

Keywords : *Bombyx mori*, gibberellin, mulberry, sericulture.

INTRODUCTION

The isoprenoid pathway occurs in several organisms and generates many metabolically important compounds, including plant, fungal, insect and animal hormones (Betyia & Porter, 1976). Since the intermediates in the pathway are the same for these organisms, there is the potential of mutual interaction through the food chain. Locust extracts containing ecdysone and gibberellic acid (GA₃), a plant hormone, increased internode length in peas and shortened the moulting period in locusts (Carlisle et al., 1963) and it was concluded that ecdysone and GA₃ have similar effects on both plants and locusts. The silkworm is entirely dependent on mulberry leaves as a food source and the protein content of the leaves plays an important role in silk production. GA₃ retards senescence and increases protein levels in detached leaves of certain species (Fletcher & Osborne, 1965). Due to the intricate inter-relationships between plant growth substances, the insect and the physiological status of the leaf, the influence of GA₃ on metamorphosis and commercial characteristics of silkworm were explored.

MATERIALS AND METHODS

Larvae of *Bombyx mori*, a hybrid from a cross between multivoltine and bivoltine, were fed mulberry (*Morus alba* L. Var Kanva 2) leaves sprayed with GA₃ (100 ug ml⁻¹) starting from the first day of the third instar till spinning stage. Protein content in leaves was measured according to the

* To whom correspondence should be addressed.

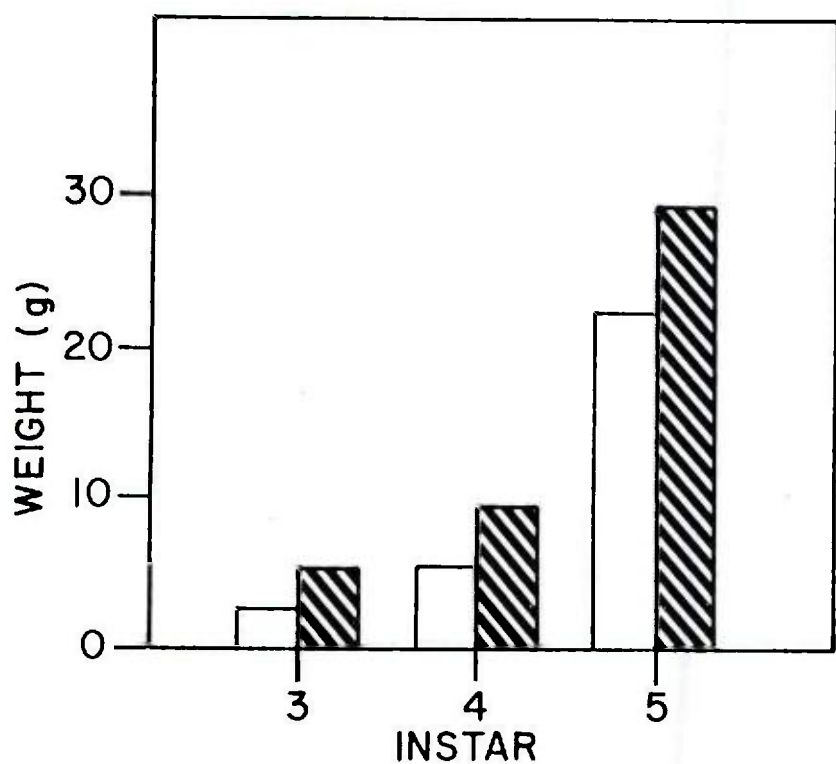


Fig. 1 : Increase in body weight of silkworm larvae from third to fifth instar showing stimulation of GA₃ treatment  over the controls .

Fig. 1 : Croissance du poids des larves de ver à soie du troisième au cinquième âge montrant la stimulation par le traitement GA₃  par rapport aux témoins .

methods described by Bradford (1976). Larvae were maintained at temperatures ranging from 30 to 26°C from early to late instars, with a relative humidity of 65 to 70 % throughout the rearing period. Corresponding control sets of larvae were fed with leaves sprayed with distilled water. The growth, reproduction and commercial characteristics of the silkworm were recorded. Each sample consisted of 5 trays containing 100 worms per tray.

Table I. Influence of GA₃ on silkworm and protein content of mulberry leaf.

Tableau I. Influence de GA₃ sur le ver à soie et le contenu en protéines de la feuille de mûrier.

Character <i>Caractères</i>	Control <i>Témoins</i>	GA ₃ - treated <i>Traités avec GA₃</i>
Mortality of larvae (%) <i>Mortalité larvaire (%)</i>	4.7 ± 1.1	2.0 ± 0.46
Pupal weight (g) <i>Poids nymphale (g)</i>	1.1 ± 0.09	1.3 ± 0.08
Fecundity <i>Fécondité</i>	580 ± 18	640 ± 16
Weight of 100 eggs (mg) <i>Poids de 100 oeufs (mg)</i>	55 ± 0.9	58 ± 1.01
Protein in leaves (mg/g DW) <i>Protéines dans les feuilles (mg/g DW)</i>	150 ± 0.25	163 ± 0.89

Larval mortality occurred during fourth and fifth instar. Fecundity - number of eggs laid by single female moth. Weight of 100 eggs was from an average of 12 groups collected from 10 silkworms per sample.

Mortalité larvaire survenue pendant les quatrième et cinquième âges. Fécondité - nombre d'oeufs pondus par un papillon femelle. Le poids de 100 oeufs est la moyenne de 12 groupes dont 10 vers par échantillon.

RESULTS AND DISCUSSION

The per cent mortality of the silkworm larvae in the controls were twice that of those fed with GA₃ treated mulberry leaves (Table I) and the body weight of the larvae was consistently higher than the control throughout the duration of the experiment from the third to the fifth instar with a 30 % increase by the end of the fifth instar (Fig. 1). The moths of insects being fed the GA₃ treated leaves laid more eggs per female (fecundity), thereby yielding more silkworms for further rearing. The eggs from both the control and treatment were highly fertile with an average hatching rate of 98 %.

The silkworm is an economically important insect and GA₃ improved several of the commercial characteristics essential for the silk industry (Table II). The major factors that influence production of silk are cocoon yield, filament length and randitta, all of which were significantly improved by GA₃. The observed effects of GA₃ on the silkworm could be mediated either by a direct effect of the plant hormone on the metamorphosis of the insect or indirectly by its influence on the mulberry leaves. The addition of GA₃ to detached leaves delays senescence of certain species (Thimann, 1980). Retardation of senescence by GA₃ in *Taraxacum* sp. was associated with a stimulation of C¹⁴ leucine

Table II. Influence of GA₃ on commercial characteristics of silkwormTableau II. Influence de GA₃ sur les caractéristiques commerciales du ver à soie.

Commercial characters <i>Caractères commerciaux</i>	Control <i>Témoins</i>	GA ₃ - treated <i>Traités avec GA₃</i>
Cocoon yield * (kg)	60.0 ± 2.0	70.0 ± 2.7
<i>Rendement en cocons * (kg)</i>		
Number of cocoons per kg	700.0 ± 2.6	646.0 ± 3.8
<i>Nombre de cocons par kg</i>		
Cocoon weight (g)	1.2 ± 0.06	1.5 ± 0.09
<i>Poids du cocon (g)</i>		
Shell weight (mg)	200.0 ± 0.01	260.0 ± 0.01
<i>Poids de la coque (mg)</i>		
Shell** (%)	17.0 ± 1.0	17.2 ± 1.05
<i>Coque** (%)</i>		
Filament length (m)	772.0 ± 3.8	965.0 ± 4.6
<i>Longueur du filament (m)</i>		
Randitta***	13.0 ± 0.9	11.0 ± 0.85
<i>Rendement à la bassine ***</i>		

* Yield per 100 DFL (Disease free layings) / *Rendement pour 100 Pontes saines.*** Waste after removal of silk / *Déchet après prélèvement de la soie**** Number of kg of cocoons required to reel 1 kg of raw silk / *Nombre de kg de cocons nécessaires pour dévider 1 kg de soie grège*Cocoon and shell weight are the average values from 50 cocoons. / *Le poids du cocon et de la coque sont les valeurs moyennes de 50 cocons.*

incorporation into protein indicating enhanced protein synthesis (Fletcher & Osborne, 1965 ; 1966). In detached mulberry leaves, GA₃ has been reported to delay senescence (Boraiah et al., 1987) and its effects on enhanced protein levels (Table I) could be factors that contribute to the improvement of silk production. The effects of GA₃ on protein quality was not determined. However, irrespective of whether the effects of the hormones on silkworm are direct or indirect, the conclusion of this study is that application of GA₃ to detached mulberry leaves as a supplement to the silkworm diet is beneficial for the sericulture industry.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, the Ontario Ministry of Agriculture and Food and the Canadian International Development Agency.

REFERENCES

BETYIA E. D., PORTER J. W. (1976), Biochemistry of polyisoprenoid synthesis. *Annu. Rev. Biochem.*, 45, 113-142.

BORAIAH G., SANTAKUMARI M., SREEDHARA V. M. (1987), Reversal of leaf senescence in different varieties of mulberry by GA₃ and Kinetin. *Sericologia*, 27, 177-182.

Bradford M. M. (1976), A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Annal. Biochem.*, 72, 248-254.

CARLISLE D.B., OSBORNE D.J., ELLIS P. E., MOORHOUSE J. E. (1963), Reciprocal effects of insect and plant growth substances. *Nature*, 21, 1230.

FLETCHER R.A., OSBORNE D. J. (1966), Gibberellin, as a regulator of protein and Ribonucleic acid synthesis during senescence in leaf cells of *Taraxacum officinale*. *Can. J. Botany*, 44, 739-745.

FLETCHER R.A., OSBORNE D. J. (1965), Regulation of protein and nucleic acid synthesis by gibberellins during leaf senescence. *Nature*, 207, 1176-1177.

THIMANN K.V. (1980), The senescence of leaves. In *Senescence in Plants* (ed. Thimann, K.V.). CRS Press, Boca Raton, Florida, 85-115.

L'ACIDE GIBBERELLIQUE AMELIORE LES CARACTERISTIQUES COMMERCIALES DES VERS A SOIE

M. SANTAKUMARI, V.M. SREEDHARA & R.A. FLETCHER *

Departmental of Environmental Biology, University of Guelph, Guelph, Ontario Canada N1G 2W1

Les larves du ver à soie, Bombyx mori L. ont été nourries d'un régime de feuilles de mûrier aspergées soit avec de l'eau soit avec de l'acide gibbérellique (GA₃). Les caractéristiques de production, de croissance et commerciales ont été enregistrées. Le poids du corps des larves et la fécondité des vers à soie nourris de feuilles traitées sont plus élevés que pour les témoins. Le traitement améliore plusieurs caractéristiques économiques importantes telles que le rendement en cocons, la longueur du filament, le rendement à la bassine et augmente de façon significative la production de soie.

INTRODUCTION

La voie métabolique des isoprénoides existe chez plusieurs organismes et engendre beaucoup de composés importants métaboliquement, comprenant les hormones des plantes, des champignons, des insectes et des animaux (Betyia et Porter, 1976). Etant donné que les intermédiaires de cette voie métabolique sont les mêmes pour ces organismes, il existe un potentiel d'interactions mutuelles à travers la chaîne alimentaire. Des extraits de sauterelle contenant de l'ecdysone et de l'acide gibbérellique (GA₃), une hormone de plante, accroissent la longueur des entre-noeuds chez les pois et raccourcissent la période de mue chez les locustes (Carlisle et coll., 1963) ce qui conduit à conclure que l'ecdysone et le GA₃ ont des effets similaires sur les plantes et les sauterelles. Le ver à soie est entièrement dépendant des feuilles de mûrier comme source de nourriture et le contenu en protéines des feuilles joue un rôle important dans la production de soie. GA₃ retarde la sénescence et augmente les niveaux en protéines des feuilles de certaines espèces (Fletcher et Osborne, 1965). En raison des inter-relations complexes entre les substances de croissance de la plante, l'insecte et l'état physiologique de la feuille, l'influence de GA₃ sur la métamorphose et les caractéristiques du ver à soie ont été explorées.

MATERIELS ET METHODES

Les larves de *Bombyx mori*, un hybride issu d'un croisement entre un polyvoltin et un bivoltin, ont été nourries avec des feuilles de mûrier (*Morus alba* L. Var Kanva 2) aspergées de GA₃ (100 µg ml⁻¹) du premier jour du troisième âge jusqu'au stade du filage. Le contenu en protéines des feuilles a été mesuré selon les méthodes décrites par Bradford (1976). Les larves ont été maintenues à des températures variant de 30 à 26°C des premiers aux derniers âges, avec une humidité relative de 65 à 70 % pendant la période d'élevage. Les lots témoins correspondants ont été nourris avec des

* Personne à contacter pour toute correspondance.

feuilles aspergées d'eau distillée. La croissance, les caractéristiques commerciales et de reproduction du ver à soie ont été enregistrées. Chaque échantillon comprenait 5 plateaux contenant 100 vers chacun.

RESULTATS ET DISCUSSION

Le pourcentage de mortalité chez les larves témoins est deux fois plus important que chez celles nourries avec les feuilles de mûrier traitées au GA₃ (Tableau I) et le poids du corps des larves est nettement plus élevé que chez les témoins pendant toute la durée de l'expérience du troisième au cinquième âge avec une augmentation de 30 % à la fin du cinquième âge (Fig.1). Les papillons des insectes nourris avec les feuilles traitées au GA₃ ont pondé plus d'oeufs par femelle (fécondité) d'où une production plus importante de vers à soie pour un élevage ultérieur. Les oeufs des papillons témoins et des papillons traités étaient tous très fertiles avec un taux moyen d'éclosion de 98 %. Le ver à soie est un insecte économiquement important et le GA₃ améliore plusieurs des caractéristiques commerciales essentielles pour l'industrie de la soie (Tableau II). Les facteurs principaux qui influencent la production de soie sont le rendement en cocons, la longueur du filament et le rendement à la bassine ; tous sont améliorés de façon significative par le GA₃. Les effets observés du GA₃ sur le ver à soie peuvent être interprétés soit par un effet direct de l'hormone de la plante sur la métamorphose de l'insecte soit indirectement par son influence sur les feuilles du mûrier. L'adjonction de GA₃ sur des feuilles détachées retarde le vieillissement de certaines espèces (Thimann, 1980). Le retardement de la sénescence par le GA₃ pour l'espèce *Taraxacum* est associée à une stimulation de l'incorporation de leucine ¹⁴C dans les protéines indiquant une stimulation de la synthèse des protéines (Fletcher et Osborne, 1965 ; 1966). Pour les feuilles détachées du mûrier on a remarqué que le GA₃ retarde le vieillissement (Boraiah et coll., 1987) et que ses effets entraînent un niveau de protéines accru (Tableau I). Ceci pourrait être des facteurs qui contribuent à l'amélioration de la production de la soie. Les effets du GA₃ sur la qualité des protéines n'ont pas été déterminés. Cependant, que les effets des hormones sur le ver à soie soient directs ou indirects, la conclusion de cette étude est que l'application de GA₃ sur des feuilles de mûrier détachées est bénéfique à l'industrie de la sériciculture.

EFFECT OF POTASSIUM IODIDE, COBALT CHLORIDE, CALCIUM CHLORIDE AND POTASSIUM NITRATE ON PROTEIN, RNA AND DNA CONTENTS OF SILKGAND OF SILKWORM (*BOMBYX MORI* L.), NISTARI RACE.

A.K. DASMAHAPATRA, M.K. CHAKRABARTI & A.K. MEDDA

Animal Physiology Department, Bose Institute, Kankurgachi, Calcutta 700054, India.

Effects of the feeding of potassium iodide, cobalt chloride, calcium chloride and potassium nitrate with mulberry leaves on the body weight, silk gland weight and protein, RNA and DNA contents of the silk gland of the fifth instar larvae of Bombyx mori L. (Nistari race) were investigated. It was observed that all these metallic salts with a concentration of 20 µg/ml increased significantly the body weight, silk gland weight and protein, RNA and DNA contents of the silk gland in comparison to those of the control worms. The induced changes (enhancements) in each physiological parameter under investigation with KI, CoCl₂, CaCl₂ and KNO₃ occurred to almost the same level indicating about the same extent of stimulating influence of these metallic salts.

Keywords : Salts, silk gland stimulation, *Bombyx mori*.

INTRODUCTION

The requirement of minerals in various insects has been investigated (House, 1974), but the information regarding the indispensibility of metal ions for proper nutrition or growth promotion of the insects are not adequately established. It has been reported earlier that the mulberry silkworms, *Bombyx mori*, require calcium, iron, magnesium, manganese, phosphorus, potassium and zinc for their growth and development (Ito, 1967 ; Tobias, 1948). Search is being continued in this laboratory to explore the different exogenous agents, such as minerals, hormones or vitamins, that can effectively augment the various life processes of silkworms and ultimately aggravate the production of silk and eggs. Previous reports show that certain metallic salts, viz., KI, CoCl₂, CaCl₂ and KNO₃, have marked influence on the body weight, cocoon weight and egg production of *Bombyx mori* L. (Chakrabarti and Medda, 1977, 1978a, 1978b). Treatment of the silkworms with thyroxine or vitamin B₁₂ also increases their body weight, silk gland weight, cocoon weight, egg production and has marked influence on the metabolism of silk gland, fat body, ovary and testes (Majumdar and Medda, 1975 ; Medda *et al.*, 1980 ; Chaudhuri and Medda, 1982, 1985a, 1985b, 1986, 1987a, 1987b ; Chaudhuri *et al.*, 1986 ; Bhattacharyya and Medda, 1981a, 1981b, 1983 ; Das, 1987 ; Das and Medda, 1988). Both thyroxine and vitamin B₁₂ stimulate protein and nucleic acid synthesis in silk gland of *Bombyx mori* L., Nistari race (Medda *et al.*, 1980 ; Bhattacharyya, 1981).

Since potassium iodide cobalt chloride, calcium chloride and potassium nitrate significantly increased the shell weight and thereby silk production (Chakrabarty and Medda, 1977, 1978a, 1978b; Bhattacharyya, 1981), it was considered worthwhile to investigate the changes in protein and nucleic acids contents of silk glands of *Bombyx mori* L., Nistari race, after treatment with these salts. Along with this the weight of the silk glands and also the body weight were recorded.

MATERIALS AND METHODS

The eggs of silkworms, Nistari race (*Bombyx mori* L.), were obtained as a gift from the Central Sericultural Research Station, Berhampore, West Bengal, India. The eggs were made to hatch and the silkworms were reared in the laboratory at $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ with 12L:12D photoperiod and 60-90% humidity. They were maintained on fresh mulberry leaves. For experiments, the 3rd instar larvae obtained from the same mother were taken at random and distributed in different groups of twenty each. For feeding of the treated larvae, the fresh mulberry leaves were dipped at least for one hour in potassium iodide (KI, BDH, India), cobalt chloride (CoCl_2 , BDH, India), calcium chloride ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, E. Merck, AG Darmstadt) or potassium nitrate (KNO_3 , BDH, India), solution having a concentration of $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ each. By several trials this concentration of salt solution was found suitable for optimum growth of the silkworms. The soaked mulberry leaves in the respective solution were then cut into small pieces and given to the worms for feeding. The control larvae were fed with mulberry leaves soaked in distilled water as above. The worms of all groups were fed four times a day. At the end of 5th instar (prior to spinning) the silk glands were dissected out and quickly weighed and used for the estimation of protein, RNA and DNA. The protein content of silk glands was measured by the method of Lowry *et al.* (1951), and RNA and DNA by the method of Munro and Fleck (1966) as modified by Abalain (1980). The data were statistically analysed by using Student 't'-test.

RESULTS

a) Changes in body weight and silk gland weight (Table I).

The silkworms fed with potassium iodide, cobalt chloride, calcium chloride and potassium nitrate ($20\text{ }\mu\text{g/ml}$) with mulberry leaves showed significant increase in the weight of the whole body and silk gland in comparison to the respective control. The increase in silk gland weight was evident when expressed both in terms of whole gland as well as per gram of body weight. The enhancement of body weight or silk gland weight occurred to almost the same level with all the salts used.

b) Changes in protein, RNA and DNA contents of silk gland (Table II).

Compared to the control, the protein, RNA and DNA contents of silk gland of *Bombyx mori* significantly increased after feeding with the salts, viz., potassium iodide, cobalt chloride, calcium chloride and potassium nitrate, with mulberry leaves. As in case of body weight and silk gland weight, all the salts used in the experiments induced almost equal magnitude of response with respect to the increase in protein, RNA or DNA content of silk gland of the silkworms.

DISCUSSION

The silk gland of silkworms, *Bombyx mori*, is highly specialized for the massive production of proteins for the silk threads. In this organ, the number of cells is fixed during late embryogenesis and subsequent growth is associated with endomitosis (Perdrix-Gillot, 1974). The gland consists of a single type of cells which undergo extensive DNA synthesis during differentiation without concomitant cell division (Gillot and Daillie, 1968 ; Tashiro *et al.*, 1968 ; Suzuki *et al.*, 1972). The synthesis of DNA, RNA and specific silk proteins, fibroin, P25 and sericins, in the silk gland cells are developmentally regulated and these events are synchronized with the specific events of metamorphosis (Couble *et al.*, 1983, 1987). Without going into the details of all these developmentally regulated DNA replication and RNA and protein production, we sacrificed our experimental silkworms and first measured protein, RNA and DNA from the whole silk gland just before the onset of spinning when all the genes of the silk gland cells have been expressed and all kinds of proteins (sericins, fibroin and P25) have formed. Our ultimate aim was to see whether or not the metallic salts used in the experiments were able to increase the total protein, RNA and DNA contents of silk glands, since these salts increase the cocoon weight and silk gland weight.

Our results showed that KI, CoCl_2 , CaCl_2 and KNO_3 feeding increased the body weight and wet weight of silk gland and also the amounts of the macromolecular components like protein, RNA and DNA of the whole silk gland. This increase is likely to be due to the stimulation of protein, RNA and

DNA synthesizing machineries of the silkgland cells by these minerals leading to an overall increase in silkgland weight. The exact mechanism how these minerals stimulated the protein, RNA and DNA synthesizing systems of the silkgland cells of silkworms is not clearly understood from the experimental results. But it may be assumed that the mechanism of stimulation is not very similar in case of all the minerals under study. Previous reports from this laboratory showed that all these salts have stimulatory effects on some basic biological events like body weight, shell weight and egg production (Chakrabarty and Medda, 1977, 1978a, 1978b). It has also been reported earlier that at least one basic difference between the salts is that potassium iodide and cobalt chloride are able to shorten the larval life, whereas KNO_3 and CaCl_2 have no such significant influence on this process (Chakrabarti and Medda, 1977, 1978a, 1978b ; Bhattacharyya, 1981).

Table I. Effect of potassium iodide, cobalt chloride, calcium chloride and potassium nitrate on body weight and silkgland weight of silkworm (*Bombyx mori* L.), Nistari race.

Tableau I. Effet de l'iodure de potassium, du chlorure de cobalt, du chlorure de calcium et du nitrate de potassium sur le poids du corps et le poids de la glande séricigène du ver à soie (Bombyx mori L.), race Nistari.

	Body weight (mg) Mean $\pm$ SE <i>Poids du corps (mg)</i> Moyenne $\pm$ ET	Whole silkgland weight (mg) Mean $\pm$ SE <i>Poids glande</i> <i>séricigène entière (mg)</i> <i>Moyenne $\pm$ ET</i>	Silkgland weight (mg)/g of body weight Mean $\pm$ SE <i>Poids glande séricigène</i> <i>(mg)/g du poids du corps</i> <i>Moyenne $\pm$ ET</i>
Control <i>Témoin</i>	1171.77 $\pm$ 26.01	211.45 $\pm$ 5.12	181.35 $\pm$ 6.48
KI (20 $\mu\text{g/ml}$)	1424.22 $\pm$ 44.86 ^a	318.22 $\pm$ 6.87 ^a	221.85 $\pm$ 5.93 ^a
CoCl_2 (20 $\mu\text{g/ml}$)	1405.77 $\pm$ 42.82 ^a	295.11 $\pm$ 7.20 ^a	210.29 $\pm$ 3.63 ^a
CaCl_2 (20 $\mu\text{g/ml}$)	1385.44 $\pm$ 23.41 ^a	308.88 $\pm$ 5.63 ^a	221.85 $\pm$ 5.44 ^a
KNO_3 (20 $\mu\text{g/ml}$)	1337.50 $\pm$ 15.75 ^a	297.25 $\pm$ 9.23 ^a	224.44 $\pm$ 7.34 ^a

SE : Standard error.

ET : Ecart type.

't'-test probability differences : $\alpha = P < .01$.

Différences de probabilité du test 't' : $\alpha = P < .01$.

Each mean value is the average from 20 worms. The comparisons were made between the control and the salt treated groups. The silkworms were fed four times a day with mulberry leaves soaked at least for one hour in the respective salt solution. The worms were sacrificed just before the onset of spinning.

Chaque valeur moyenne est la moyenne de 20 vers. Les comparaisons ont été faites entre le témoin et les groupes traités au sel. Les vers à soie ont été nourris quatre fois par jour de feuilles de mûrier trempées pendant au moins une heure dans la solution salée respective. Les vers ont été sacrifiés juste avant le début du filage.

A suitable inorganic composition of the medium of the cells of other animals with definite relative proportions of sodium, potassium, calcium and magnesium should be maintained for the maintenance of the normal activities of the cells (Baldwin, 1962). The haemolymph of *Bombyx mori* larvae contains comparatively more amounts of potassium, calcium and magnesium than sodium (Bialaszewicz and Landau, 1938 ; Duchateau *et al.*, 1953). Therefore, stimulation of protein, RNA and DNA synthesis by calcium, magnesium or other metal ions may be possible because of their

Table II. Effect of potassium iodide, cobalt chloride, calcium chloride and potassium nitrate on protein, RNA and DNA contents of silkgland of silkworm (*Bombyx mori* L.), Nistari race.

Tableau II. Effet de l'iodure de potassium, du chlorure de cobalt, du chlorure de calcium et du nitrate de potassium sur le contenu en protéines, en ARN et en ADN de la glande séricigène du ver à soie (*Bombyx mori* L.), race Nistari.

	Protein (mg/100mg of silkgland) Mean $\pm$ SE <i>Protéines</i> (mg/100mg de la glande séricigène) Moyenne $\pm$ ET	RNA (μ g/100mg of silkgland) Mean $\pm$ SE <i>ARN</i> (μ g/100mg de la glande séricigène) Moyenne $\pm$ ET	DNA (μ g/100mg of silkgland) Mean $\pm$ SE <i>ADN</i> (μ g/100 mg de la glande séricigène) Moyenne $\pm$ ET
Control <i>Témoin</i>	30.68 $\pm$ 0.93	504.77 $\pm$ 15.75	66.53 $\pm$ 2.11
KI (20 μ g/ml)	41.59 $\pm$ 3.00 ^a	607.55 $\pm$ 23.37 ^a	78.61 $\pm$ 4.36 ^b
CoCl ₂ (20 μ g/ml)	45.99 $\pm$ 2.65 ^a	648.44 $\pm$ 25.67 ^a	80.83 $\pm$ 3.78 ^a
CaCl ₂ (20 μ g/ml)	43.49 $\pm$ 3.88 ^a	592.11 $\pm$ 38.03 ^b	79.05 $\pm$ 4.73 ^b
KNO ₃ (20 μ g/ml)	48.43 $\pm$ 3.96 ^a	579.87 $\pm$ 23.52 ^b	83.18 $\pm$ 4.94 ^a

SE : Standard error.

't'-test probability differences : a = P<.01; b = P<.05.

ET : Ecart type.

Différences de probabilité du test 't' : a = P<.01; b = P<.05.

Each mean value is the average from 20 worms. The comparisons were made between the control and the salt treated groups. The silkworms were fed four times a day by mulberry leaves soaked at least for one hour in the respective salt solution. The worms were sacrificed just before the onset of spinning.

Chaque valeur moyenne est la moyenne de 20 vers. Les comparaisons ont été faites entre le témoin et les groupes traités au sel. Les vers à soie ont été nourris quatre fois par jour avec des feuilles de mûrier trempées pendant au moins une heure dans la solution salée respective. Les vers ont été sacrifiés juste avant le début du filage.

existence in the haemolymph. Cobalt may influence the various life processes of the silkworms indirectly by influencing the synthesis of vitamin B₁₂ or directly by acting in the cells. Vitamin B₁₂ has been found in the digestive tract of silkworms (Shyamala and Bhat, 1962 ; Tokoyama, 1965) and this vitamin also stimulates body weight, cocoon weight, silkgland weight, egg number as well as protein synthesis, in *Bombyx mori* (Shyamala and Bhat, 1962 ; Majumdar and Medda, 1975 ; Bhattacharyya, 1981 ; Das, 1987). The influence of KI on protein synthesis may be due to the transformation of inorganic iodine to organic forms for the synthesis of thyroxine like iodinated thyronines. There are reports that insect possesses some iodinated compounds which serve the functions of thyroid hormones in insects (Berg *et al.*, 1959 ; Lempel and Casida, 1957). It has already been shown that thyroxine stimulates protein and RNA synthesis of silkgland of *Bombyx mori* and increased its total protein and RNA content (Medda *et al.*, 1980). Whatever be the mechanism of action of potassium iodide, cobalt chloride, calcium chloride or potassium nitrate in silkglands of *Bombyx mori* L., it can be said that the processes involved in the metabolism of protein and nucleic acids in the glands are activated by these metallic salts leading to increased cocoon weight (Majumdar and Medda, 1975 ; Chakrabarti and Medda, 1977, 1978a, 1978b).

REFERENCES

- ABALAIN J.H., JEGO P., VALOTAIRE Y. (1980), *Gen. Comp. Endocrinol.*, 40, 402.
- BALDWIN E. (1962), *The nature of Biochemistry*, Cambridge University Press, London and New York.
- BERG O., GORBMAN A., KOBAYASHI H. (1959), In *Comparative Endocrinology*, Gorbman A. (ed.), John Wiley and Sons Inc., New York, pp. 307.
- BHATTACHARYYA A. (1981), Studies on the effects of cyanocobalamin and cobalt chloride on silkworm, *Bombyx mori* L., race Nistari. Ph.D. Thesis, Faculty of Science, University of Calcutta.
- BHATTACHARYYA A., MEDDA, A.K. (1981a), *Sci. Cult.*, 47, 140.
- BHATTACHARYYA A., MEDDA, A.K. (1981b), *Sci. Cult.*, 47, 268.
- BHATTACHARYYA A., MEDDA, A.K. (1983), *Zool. Jb. Anat.*, 110, 403.
- BIALASZEWICZ K., LANDAU C. (1938), *Acta Biol. Exp.*, 12, 307.
- CHAKRABARTI M.K., MEDDA A.K. (1977), *Ind. J. Physiol. Allied. Sci.*, 31, 98.
- CHAKRABARTI M.K., MEDDA A.K. (1978a), *Sci. Cult.*, 44, 231.
- CHAKRABARTI M.K., MEDDA A.K. (1978b), *Sci. Cult.*, 44, 406.
- CHAUDHURI A., DAS S., MEDDA A.K. (1986), *Environ. Ecol.*, 4, 480.
- CHAUDHURI A., MEDDA A.K. (1982), *Ind. J. Physiol. Allied Sci.*, 36, 62.
- CHAUDHURI A., MEDDA A.K. (1985a), *Environ. Ecol.*, 3, 418.
- CHAUDHURI A., MEDDA A.K. (1985b), *Environ. Ecol.*, 3, 514.
- CHAUDHURI A., MEDDA A.K. (1986), *Proc. Nat. Acad. Sci. India*, 56(B), 301.
- CHAUDHURI A., MEDDA A.K. (1987a), *Zool. Jb. Anat.*, 115, 85.
- CHAUDHURI A., MEDDA A.K. (1987b), *Insect Sci. Applic.*, 8, 43.
- COUBLE P., MOINE A., GAREL A., PRUDHOMME J.C. (1983), *Dev. Biol.*, 97, 398.
- COUBLE P., MICHALLE J., GAREL A., COUBLE M., PRUDHOMME J. (1987), *Dev. Biol.*, 124, 431.
- DAS S. (1987), Evaluation of the effects of cyanocobalamin on different organs of silkworms, *Bombyx mori* L., race Nistari. Ph. D. Thesis, Faculty of science, Calcutta University.
- DAS S., MEDDA A.K. (1988), *Insect Sci. Applic.*, 9, 641.
- DUCHATEAU G., FLORKIN M., LECLERCAJ. (1953), *Arch. Int. Physiol. Biochem.*, 61, 518.
- GILLOT S. DAILLIE M.J. (1968), *C.R. Acad. Sci. Paris*, 266, 2295.
- HOUSE H.L. (1974), In Rockstein M. (ed). *The Physiology of Insecta*, 2nd Edition, Vol. 5, Academic Press, New York and London, pp. 37.
- ITO T. (1967), *Proc. Jap. Acad.*, 43, 57.
- LIMPEL L.E., CASIDA J.E. (1957), *J. Exp. Zool.*, 135, 1927.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. (1951), *J. Biol. Chem.*, 193, 265.
- MAJUMDAR A.C., MEDDA A.K. (1975), *Ind. J. Physiol. Allied. Sci.*, 29, 1.
- MEDDA A.K., RAY A.K., DASGUPTA A.K., MAJUMDAR A.C., DEY C.D. (1980), *Thyroid Res.*, 8, 240.
- MUNRO N.H., FLECK A. (1966), In GLICK D. (ed). *Methods in Biochemical analysis*. Vol. 14, Wiley-Inter Science, New York, pp. 113.
- PERDRIX-GILLOT S. (1974), *Ann. Embryol. Morphol.*, 7, 445.
- SUZUKI Y., GAGE L.P., BROWN D.D. (1972), *J. Mol. Biol.*, 70, 637.
- SHYAMALA B.M., BHAT S.V. (1962), *J. Sci. Ind. Res.*, 21, 26.
- TASHIRO Y., OTSUKI E., SHIMADZU T. (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, 257, 198.
- TOBIAS J.M. (1948), *J. Cell. Comp. Physiol.*, 31, 143.
- TOKOYAMA T. (1965), *Science in Japan*, 376.

EFFET DE L'IODURE DE POTASSIUM, DU CHLORURE DE COBALT, DU CHLORURE DE CALCIUM ET DU NITRATE DE POTASSIUM SUR LES CONTENUS EN PROTEINES, ADN ET ARN DE LA GLANDE SERICIGENE DU VER A SOIE (*BOMBYX MORI* L.), RACE NISTARI.

A.K. DASMAHAPATRA, M.K. CHAKRABARTI & A.K. MEDDA.

Animal Physiology Department, Bose Institute, Kankurgachi, Calcutta 700054, Inde.

Nous avons étudié les effets d'une alimentation avec de l'iodure de potassium, du chlorure de cobalt, du chlorure de calcium et du nitrate de potassium ajoutés aux feuilles de mûrier sur le poids du corps, le poids de la glande séricigène et les contenus en protéines, ADN et ARN de la glande séricigène du cinquième âge larvaire de Bombyx mori L. (race Nistari). On a observé que l'utilisation de tous ces sels métalliques à une concentration de 20 µg/ml augmente de façon significative le poids du corps, le poids de la glande séricigène et les contenus en protéines, ADN et ARN de la glande séricigène si l'on compare ces paramètres à ceux des vers témoins. Les changements induits (augmentations) par KI, CoCl₂, CaCl₂ et KNO₃ pour chaque paramètre physiologique étudié atteignent pratiquement le même niveau, indiquant une influence stimulante de même étendue ou presque de ces sels métalliques.

INTRODUCTION

Le besoin en minéraux de différents insectes a été étudié (House, 1974) mais les connaissances en ce qui concerne la nécessité d'ions métalliques pour une alimentation convenable ou le développement de la croissance des insectes ne sont pas établies de façon correcte. Il a été mentionné précédemment que les vers à soie du mûrier *Bombyx mori* ont besoin de calcium, de fer, de magnésium, de manganèse, de phosphore, de potassium et de zinc pour leur croissance et leur développement (Ito, 1967 ; Tobias, 1948). Les recherches continuent dans ce laboratoire pour découvrir les différents agents exogènes, tels que les minéraux, les hormones ou les vitamines qui peuvent effectivement améliorer les différents processus vitaux des vers à soie et finalement augmenter la production de soie et d'oeufs. Des rapports précédents montrent que certains sels métalliques, à savoir KI, CoCl₂, CaCl₂ et KNO₃ influencent le poids du corps, le poids du cocon et la production d'oeufs chez *Bombyx mori* L. (Chakrabarti et Medda, 1977, 1978a, 1978b). Le traitement des vers à soie avec la thyroxine ou la vitamine B₁₂ augmente également le poids de leur corps, le poids de la glande séricigène, le poids du cocon, la production d'oeufs et influence le métabolisme de la glande séricigène, du corps adipeux de l'ovaire et des testicules (Majundar et Medda, 1975 ; Medda et coll., 1980 ; Chaudhuri et coll., 1986 ; Bhattacharyya et Medda, 1981a, 1981b, 1983 ; Das, 1987 ; Das et Medda, 1988). La thyroxine et la vitamine B₁₂ stimulent toutes les deux la synthèse de protéines et des acides nucléiques dans la glande séricigène de *Bombyx mori* L., race Nistari (Medda et coll., 1980 ; Bhattacharyya, 1981).

Puisque l'iodure de potassium, le chlorure de cobalt, le chlorure de calcium et le nitrate de potassium augmentent de façon significative le poids de la coque et, de ce fait, la production de la soie (Chakrabarty et Medda, 1977, 1978a, 1978b ; Bhattacharyya, 1981), il est apparu intéressant d'étudier les changements du contenu en protéines et en acides nucléiques chez les glandes séricigènes de *Bombyx mori* L., race Nistari, après traitement avec ces sels. On a également enregistré le poids des glandes séricigènes ainsi que le poids du corps.

MATERIELS ET METHODES

Les oeufs des vers à soie, race Nistari (*Bombyx mori* L.) ont été offerts par le centre de recherches séricicoles, Berhampore, Bengale Ouest, Inde. Les oeufs ont éclos et les vers à soie ont été élevés en laboratoire à $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ avec une photopériode de 12L:12D et une humidité de 60-90 %. Ils ont été maintenus sur des feuilles fraîches de mûrier. Pour les expériences, les vers du troisième âge larvaire obtenus de la même mère ont été choisis au hasard et répartis dans différents groupes de 20 sujets chacun. On a nourri les larves traitées avec des feuilles fraîches de mûrier trempées pendant au moins une heure dans des solutions d'iodure de potassium (KI, BDH, Inde), de chlorure de cobalt (CoCl_2 , BDH Inde), de chlorure de calcium (CaCl_2 , $2\text{H}_2\text{O}$, E. Merck, AG Darmstadt) ou de nitrate de potassium (KNO_3 , BDH Inde) ; la concentration de chaque produit est de $20\text{ }\mu\text{g/ml}$. Selon différents avis, cette concentration de sels en solution est convenable pour obtenir une croissance maximale des vers à soie. Les feuilles de mûrier immergées dans les solutions respectives ont été ensuite coupées en petits morceaux et données comme nourriture aux vers. Les larves témoins ont été nourries avec des feuilles de mûrier trempées dans de l'eau distillée. Les vers de tous les groupes ont été nourris quatre fois par jour. A la fin du cinquième âge (avant le filage) les glandes séricigènes ont été disséquées et rapidement pesées et utilisées pour faire une estimation du contenu en protéines, en ADN et en ARN. Le contenu protéique des glandes séricigènes a été mesuré par la méthode de Lowry et coll. (1951) et les quantités d'ADN et d'ARN par la méthode de Munro et Fleck (1966) modifiée par Abalain (1980). Les données ont été analysées statistiquement en utilisant le test "t" de Student.

RESULTATS

a) Changements dans le poids du corps et dans le poids de la glande séricigène (Tableau I) :

Les vers à soie nourris avec des feuilles de mûrier supplémentées en iodure de potassium, chlorure de cobalt, chlorure de calcium et nitrate de potassium ($20\text{ }\mu\text{g/ml}$) ont un poids du corps et de la glande séricigène significativement plus élevés que ceux des témoins respectifs. L'augmentation du poids de la glande séricigène s'accompagne d'une augmentation relative par rapport au poids du corps. Les augmentations du poids du corps et du poids de la glande séricigène atteignent pratiquement le même niveau pour tous les sels utilisés.

b) Variations des contenus en protéines, en ADN et en ARN de la glande séricigène (Tableau II) :

Par rapport au témoin, les contenus en protéines et en ADN et en ARN de la glande séricigène de *Bombyx mori* sont augmentés de façon significative par le nourrissage avec des feuilles de mûrier supplémentées avec les sels, c'est-à-dire, l'iodure de potassium, le chlorure de cobalt, le chlorure de calcium et le nitrate de potassium. Comme dans le cas du poids du corps et du poids de la glande séricigène, tous les sels utilisés dans les expériences ont provoqué sensiblement les mêmes amplitudes de réponse en ce qui concerne l'augmentation des quantités de protéines, d'ADN et d'ARN de la glande séricigène des vers à soie.

DISCUSSION

La glande séricigène des vers à soie *Bombyx mori* est hautement spécialisée pour la production massive des protéines du fil de soie. Dans cet organe, le nombre de cellules est fixé pendant le dernier stade embryonnaire et la croissance ultérieure est liée à l'endomitose (Perdrix-Gillot, 1974). La glande est constituée d'un seul type de cellules qui subissent une synthèse extensive d'ADN pendant la différenciation, sans division cellulaire concomitante (Gillot et Daillie, 1968 ; Tashiro et coll., 1968 ; Suzuki et coll., 1972). Les synthèses d'ADN, d'ARN et de protéines spécifiques de la soie, la fibroïne, P₂₅ et les sérícines sont régulées au cours du développement et ces événements sont synchronisés avec les événements spécifiques de la métamorphose (Couble et coll., 1983, 1987). Sans entrer dans les détails de toutes ces régulations de synthèse d'ADN, d'ARN et de protéines au cours du développement, indiquons simplement que nous avons sacrifié les vers à soie expérimentaux et

mesuré les quantités de protéines, d'ADN et d'ARN de la glande séricigène juste avant le début du filage après que tous les gènes des cellules de la glande séricigène aient été exprimés et toutes les protéines (séricines, fibroïne et P25) synthétisées. Notre but final était de voir si les sels métalliques utilisés dans les expériences pouvaient ou non augmenter les protéines totales et les contenus en ADN et ARN des glandes séricigènes, puisque ces sels augmentent le poids du cocon et le poids de la glande séricigène.

Nos résultats ont montré que le nourrissage avec KI, CoCl₂, CaCl₂ et KNO₃ augmente le poids du corps et le poids frais de la glande séricigène ainsi que les quantités des composants macromoléculaires tels que les protéines, l'ADN et l'ARN de toute la glande séricigène. On suppose que cette augmentation est due à la stimulation des synthèses de protéines, d'ADN et d'ARN des cellules de la glande séricigène par ces minéraux conduisant à une augmentation globale du poids de la glande séricigène. Le mécanisme exact selon lequel ces minéraux stimulent ces synthèses n'est pas clairement discernable aux vues des résultats de l'expérience. Mais on peut admettre que le mécanisme de stimulation n'est pas le même pour tous les minéraux utilisés dans l'étude. Des rapports antérieurs de ce laboratoire ont montré que tous ces sels ont des effets stimulatoires sur certains événements biologiques de base tels que le poids du corps, le poids de la coque et la production d'oeufs (Chakrabarty et Medda, 1977, 1978a, 1978b). Il a également été mentionné précédemment au moins une différence fondamentale entre les sels, à savoir que l'iodure de potassium et le chlorure de cobalt peuvent raccourcir la vie larvaire, alors que KNO₃ et CaCl₂ n'ont pas d'influence aussi importante sur ce processus (Chakrabarti et Medda, 1977, 1978a, 1978b ; Bhattacharyya, 1981). Une composition inorganique convenable des cellules d'autres animaux avec des proportions respectives précises de sodium, potassium, calcium et magnésium doivent être maintenues pour l'entretien des activités normales des cellules (Baldwin, 1962). L'hémolymphe des larves de *Bombyx mori* contient, comparativement, plus de potassium, de calcium et de magnésium que de sodium (Bialaszewicz et Landau, 1938 ; Duchateau et coll., 1953). Donc, la stimulation de la synthèse des protéines, d'ADN et d'ARN par le calcium, le magnésium ou d'autres ions métalliques peut être possible à cause de leur existence dans l'hémolymphe. Le cobalt peut influencer les différents processus vitaux des vers à soie en influençant indirectement la synthèse de la vitamine B₁₂ ou directement en agissant dans les cellules. La vitamine B₁₂ a été trouvée dans le système digestif des vers à soie (Shyamala et Bhat, 1962 ; Tokoyama, 1965) et cette vitamine stimule également le poids du corps, le poids du cocon, le poids de la glande séricigène, le nombre d'oeufs et aussi la synthèse des protéines chez *Bombyx mori* (Shyamala et Bhat, 1962 ; Majumdar et Meda, 1975 ; Bhattacharyya, 1981 ; Das, 1987). Il se peut que l'influence de KI sur la synthèse des protéines soit due à la transformation de l'iode inorganique en des formes organiques pour la synthèse de la thyroxine telles que les thyronines iodées. Selon certains rapports, l'insecte possède des composants iodés qui exercent les fonctions d'hormones thyroïdes (Berg et coll., 1959 ; Limpel et Casida, 1957). Il a déjà été montré que la thyroxine stimule la synthèse des protéines et de l'ARN de la glande séricigène de *Bombyx mori* et augmente les quantités de protéines totales et le contenu en ARN (Medda et coll., 1980). Quel que soit le mécanisme de l'action de l'iodure de potassium, du chlorure de cobalt, du chlorure de calcium ou du nitrate de potassium sur les glandes séricigènes de *Bombyx mori* L., on peut dire que les procédés impliqués dans le métabolisme des protéines et des acides nucléiques des glandes sont activés par ces sels métalliques conduisant à une production de soie plus importante comme cela a été mis en évidence précédemment à partir de l'augmentation du poids du cocon (Majumdar et Medda, 1975 ; Chakrabarti et Medda, 1977, 1978a, 1978b).

EFFECT OF KENCHU VIRUS INFECTION DURING FIFTH INSTAR IN SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

R. GOVINDAN, G. K. VEERESH, M. C. DEVAIAH, M. B. SHYAMALA & T. K. NARAYANASWAMY

Department of Sericulture, University of Agricultural Sciences, G.K.V.K., Bangalore - 560 065, India.

The infection of silkworm, Bombyx mori L., in fifth instar with Kenchu virus resulted in the reduction of the larval weight at maturity, the extent of cocooning, cocoon, cocoon shell and pupal weights, cocoon shell ratio and moth emergence. The earlier the infection in fifth instar, the greater the reduction was in the above economic characters.

Keywords : Silkworm, *Bombyx mori*, Kenchu virus.

INTRODUCTION

Kenchu is a widely prevalent flacherie of the silkworm, *Bombyx mori* L., in Karnataka, India (Shyamala, 1978). The etiologic agent of this disease has been proved to be a small, spherical, non-occluded virus of 27 ± 2 nm in diameter (Hadimani & Shyamala, 1983). Information on the effect of Kenchu virus infection in different fifth instar silkworms of *B. mori* is not available. Such an experiment was conducted and the results are reported in this paper.

MATERIAL AND METHODS

Kenchu virus was purified as per the method of Inoue & Ayuzawa (1972) modified by Hadimani (1980).

Mulberry leaves sterilized with 70 % ethyl alcohol were evenly smeared with virus stock suspension and fed to a batch of 100 worms contained in a replication. 1-8 day old fifth instar worms of the polyvoltine breed Pure Mysore were separately fed in this manner for the first feed and the subsequent feeds were of normal mulberry leaves. Suitable control was maintained. Observations were recorded and the data were analysed statistically.

RESULTS AND DISCUSSION

The results on the effect of Kenchu virus infection in fifth instar on maximum larval weight, cocooning, cocoon traits and moth emergence are discussed below.

Larval weight :

Maximum larval weight on the sixth day was significantly influenced by Kenchu virus infection in different fifth instar silkworms (Table I). Infection on the first day resulted in a lower weight (8.73 g/10 worms) which was similar to that of infection on the second day (9.83 g). Larval weight attainment with control (20.63 g) and that corresponding to infection of the sixth to the eighth day (19.17 to 20.40 g) did not differ. These observations are similar to those of Philip and Jacob (1981) who observed reduction in the weight of the larvae of *Pericallia ricini* infected by granulosis virus.

Table I. Effect of Kenchu virus infection at different days of fifth instar silkworm on economic characters.

Table I. Effet de l'infection par le virus de Kenchu à différents jours du cinquième âge larvaire sur les caractères économiques.

S ₁ N ^o	Time of Kenchu virus infection in Vth instar (in days)	Maximum larval weight for 10 worms (g)	Per cent cocooning	Single cocoon weight (g)	Single pupal weight (g)	Single cocoon shell weight (g)	Cocoon shell ratio (%)	% moth emergence
S ₁ N ^o	Période d'infection par virus Kenchu au 5 ^{ème} âge (en jours)	Poids larvaire maximal pour 10 vers (g)	%age de filage	Poids d'un cocon (g)	Poids d'une chrysalide (g)	Poids d'une coque (g)	Taux coque soyeuse (%)	% émergence des papillons
1	First day <i>Premier jour</i>	8.73	5.33 (12.91)*	0.721	0.631	0.085	11.79 (20.09)*	4.66 (12.16)*
2	Second day <i>Deuxième jour</i>	9.83	18.66 (25.55)	0.728	0.638	0.084	11.59 (19.88)	18.66 (25.55)
3	Third day <i>Troisième jour</i>	12.50	30.66 (33.56)	0.912	0.798	0.109	12.12 (20.29)	28.00 (31.79)
4	Fourth day <i>Quatrième jour</i>	11.31	47.33 (43.85)	0.981	0.860	0.115	11.76 (20.06)	46.66 (43.09)
5	Fifth day <i>Cinquième jour</i>	11.77	54.00 (47.37)	0.931	0.808	0.117	12.62 (20.79)	52.66 (46.58)
6	Sixth day <i>Sixième jour</i>	19.17	77.33 (63.21)	1.173	1.018	0.150	12.78 (20.96)	72.66 (59.07)
7	Seventh day <i>Septième jour</i>	19.63	90.66 (72.37)	1.261	1.105	0.151	11.94 (20.20)	88.66 (70.38)
8	Eighth day <i>Huitième jour</i>	20.40	90.66 (72.47)	1.216	1.060	0.151	12.42 (20.64)	89.33 (71.05)
9	Control (no infection) <i>Témoin (sain)</i>	20.63	95.33 (80.01)	1.229	1.071	0.153	12.42 (20.64)	93.33 (75.67)
S. Em. ±		0.620	3.890	0.042	0.038	0.0060	-	3.030
C.D. at 5 %		1.858	11.662	0.1259	0.1139	0.0179	NS	9.084

* Figures in parentheses are angular transformed values / Les chiffres entre parenthèses expriment les transformées angulaires.

NS : Non-significant / Non significatif.

Cocooning and cocoon traits :

The uninfected control batch recorded a maximum cocooning of 95.33 % as compared to infection on the eighth and seventh days (90.66 %) and the sixth day (77.33 %) and the latter three were similar with each other (Table I). Infection on the first day of the fifth instar registered significantly the lowest cocooning (5.33 %) while cocooning with infection on the second (18.66 %) and third days (30.66 %) and that of the fourth (47.33 %) and fifth days (54.0 %) remained distinct, the pairs being similar.

Single cocoon weight was significantly low corresponding to the first (0.721 g) and second day infection (0.728 g) whereas these differed from cocoon weight in respect of the third (0.912 g), fourth (0.981 g) and fifth day (0.931 g) infection and the latter three were similar. Though maximum cocoon weight was encountered with virus infection on the seventh day (1.261 g), it seldom varied from the control (1.229 g) and the eighth (1.216 g) and sixth day infection (1.173 g) (Table I). Hadimani (1980) also noticed weight reduction in cocoon with Kenchu viral administration *per os*.

Pupal weight followed the same trend as that of cocoon weight with a range of 0.631 to 1.105 g. Abul-Nasr *et al.* (1979) also obtained pupae of lighter weight from nuclear polyhedrosis virus infected later instar larvae of *Spodoptera littoralis*.

Single cocoon shell weight was statistically low (0.084 to 0.085 g) in respect of batches infected with the virus on the first and second day of fifth instar. It remained the same with the third day (0.109 g), fourth day (0.115 g) and fifth day (0.117 g) infection which were lower compared to untreated check (0.153 g) as well as the batches infected on the eighth and seventh day (0.151 g) and sixth day (0.150 g).

Cocoon shell ratio was not significantly influenced by Kenchu virus infection at different days of the fifth instar though it varied from 11.79 to 12.78 %.

Moth emergence :

Moth emergence was the lowest with the first day infected worms (4.66 %). It was the same with that of the second (18.66 %) and third day (28.0 %). Infection on the fourth and fifth days resulted in the same extent of moth emergence (46.66 and 52.66 %).

The reduction in eclosion indicates that the disease development was considerable during the process of rapid metabolic phase of pupal-adult transformation. Though control yielded 93.33 % eclosion, it did not differ from infection on the eighth and seventh days (88.66 %) (Table I). These observations can be comparable with those of Vago & Cayrol (1956), Hafez (1958) and Atger (1969).

It may be concluded that infection with Kenchu virus from the first to the fourth day of fifth instar (Pure Mysore) results in a greater reduction in larval weight, cocooning, cocoon traits and moth emergence. Nevertheless, infection on the sixth to eighth day may not cause much loss in the economic traits considered for the study. This may obviously reveal the probable existence of maturation immunity in silkworm to Kenchu virus as observed in the cases of *Heliothis zea* and *H. virescens* for nuclear polyhedrosis virus infection (Ignoffo, 1966).

REFERENCES

- ABUL-NASR S.E., AMMAR E.D., ABUL-ELA S.M. (1979), Effect of nuclear polyhedrosis virus on various developmental stages of the cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.). Zeitschrift für Angewandte Entomologie, 88, 181-187.
- ATGER P. (1969), Observations on the nuclear polyhedrosis of *Heliothis armigera* (Hbn.) in Chad. Coton et Fibres Tropicales, 24, 243-244.
- HADIMANI A.K. (1980), Studies on the nature of Kenchu disease of silkworm, *Bombyx mori* Linnaeus, in Karnataka. M.Sc. (Agri.) Thesis, U.A.S., Bangalore, India, 91 p.
- HADIMANI A.K., SHYAMALA M.B. (1983), On the nature of "Kenchu" disease of the silkworm, *Bombyx mori*, in Karnataka. National Seminar on Silk Research and Development, Central Silk Board, Bangalore, India, Abst. 21.
- HAFAZ M. (1958), Studies on the polyhedrosis-virus disease of the cotton leaf-worm, *Prodenia litura* F. in Egypt. Bull. Soc. Ent. Egypte, 42, 357-370.

IGNOFFO C.M. (1966), Effects of age on mortality of *Heliothis zea* and *Heliothis virescens* larvae exposed to a nuclear polyhedrosis virus. J. Invertebr. Pathol., 8, 279-282.

INOUE H., AYUZAWA C. (1972), Fluorescent antibody study of an infectious flacherie of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Invertebr. Pathol., 19, 227-230.

PHILIP B.M., JACOB A. (1981), Further studies on influence of granulosis infection on the larvae of *Pericallia ricini* Fab. (Arctiidae : Lep.). Entomon., 6, 111-113.

SHYAMALA M.B. (1978), Silkworm flacherie in Karnataka. I. Symptomatology. All India symposium on sericultural sciences, U.A.S., Bangalore, Abst. 36.

VAGO C., CAYROL R. (1956), Une virose à polyèdres de la noctuelle gamma *Plusia gamma* L. (Lepi.). Ann. Epiphyt., 6, 421-432.

EFFET DE L'INFECTION PAR LE VIRUS DE KENCHU DURANT LE CINQUIEME AGE LARVAIRE CHEZ LE VER A SOIE *BOMBYX MORI* L.

R. GOVINDAN, G.K. VEERESH, M.C. DEVAIAH, M.B. SHYAMALA ET T.K. NARAYANASWAMY.

Department of Sericulture, University of Agricultural Sciences, G.K.V.K., Bangalore - 560065, Inde.

L'infection du ver à soie B. mori L. au cinquième âge par le virus de Kenchu entraîne une réduction du poids de la larve adulte, une augmentation de la durée du filage, une réduction du poids du cocon, du poids de la coque et du poids de la nymphe, de la richesse soyeuse et de l'émergence des papillons. Plus l'infection se produit tôt au cinquième âge, plus forte est la réduction des caractères économiques ci-dessus.

INTRODUCTION

Le Kenchu est une flacherie du ver à soie *Bombyx mori* largement répandue dans le Karnataka, Inde (Shyamala, 1978). Il a été démontré que l'agent étiologique de cette maladie est un virus de petite taille, sphérique et non-occlus d'un diamètre de 27 ± 2 nm (Hadimani et Shyamala, 1983). Il n'existe aucune documentation disponible sur les effets de l'infection de larves de *B. mori* à différents jours du cinquième âge par le virus de Kenchu. Aussi avons-nous réalisé une expérience portant sur ce sujet, les résultats sont donnés dans cet article.

MATERIELS ET METHODES

Le virus de Kenchu a été purifié suivant la méthode d'Inoue et Ayuzawa (1972) modifiée par Hadimani (1980).

Des feuilles de mûrier stérilisées à l'alcool éthylique à 70 % ont été infectées par une suspension-stock de virus, puis données à un lot de 100 vers par répétition. Des vers de la race polyvoltine Pure Mysore ont été nourris de cette substance pour la première ration du premier au huitième jour du cinquième âge, les rations suivantes étant constituées de feuilles de mûrier normales. Un témoin approprié a été établi. On a enregistré les observations ; les données ont été analysées de manière statistique.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de l'effet de l'infection par le virus de Kenchu chez les larves du cinquième âge sur le poids larvaire maximum, le filage, les caractères du cocon et l'émergence du papillon sont discutés ci-dessous.

Poids larvaire :

Le poids larvaire maximum au sixième jour est influencé de manière significative par l'infection par le virus de Kenchu à divers jours du cinquième âge (tableau I). L'infection au premier jour donne un poids plus faible (8,73 g/10 vers), similaire à celui obtenu par l'infection au deuxième jour (9,83 g). Le poids larvaire chez le groupe témoin (20,63 g) ne diffère pas de celui correspondant à

l'infection du sixième au huitième jour (de 19,17 g à 20,40 g). Ces observations corroborent celles de Philip et Jacob (1981) qui ont constaté une réduction du poids des larves de *Pericallia ricini* infectées par le virus de la granulose.

Filage et caractères du cocon :

Le lot témoin non traité donne un taux maximal de filage de 95,33 % alors que le lot infecté aux huitième et septième jours donne un taux de 90,66 % et au sixième jour 77,33 %, les trois derniers étant identiques (tableau I). L'infection au premier jour du cinquième âge larvaire donne le taux de filage le plus faible (5,33 %) tandis que les taux de filage pour l'infection au deuxième (18,66 %) et au troisième (30,66 %) jours et ceux du quatrième (47,33 %) et du cinquième (54,0 %) jours restent distincts, les paires étant similaires.

Le poids d'un cocon est nettement plus faible dans le cas de l'infection au premier (0,721 g) et au deuxième (0,728 g) jours alors que les résultats diffèrent pour le poids du cocon dans le cas de l'infection aux troisième (0,912 g), quatrième (0,981 g) et cinquième jours (0,931 g), les trois derniers étant similaires. Bien qu'on ait constaté un poids du cocon maximal dans le cas de l'infection virale au septième jour (1,261 g), il diffère très peu de celui du groupe témoin (1,229 g) et de ceux des groupes infectés au huitième (1,216 g) et au sixième jour (1,173 g) (tableau I). Hadimani (1980) a également noté une réduction du poids du cocon lors de l'administration *per os* du virus de Kenchu.

Le poids nymphal suit la même tendance que le poids du cocon, variant de 0,631 à 1,105 g. Abul-Nasr et coll. (1979) ont obtenu des chrysalides plus légères après infection par le virus de la polyédrose à un âge avancé de larves de *Spodoptera littoralis*.

Le poids d'une coque soyeuse est plus faible statistiquement (de 0,084 à 0,085 g) en ce qui concerne les lots infectés par le virus au premier et au deuxième jours du cinquième âge. Il reste identique pour l'infection aux troisième (0,109 g), quatrième (0,115 g) et cinquième jours (0,117 g), mais faible par rapport au lot non-traité (0,153 g) et aux lots infectés aux huitième et septième jours (0,151 g) et au sixième jour (0,150 g).

La richesse soyeuse n'est pas influencée de manière significative par l'infection par le virus de Kenchu à divers jours du cinquième âge, bien qu'elle varie de 11,79 à 12,78 %.

Emergence du papillon :

Le taux d'émergence des papillons est le plus faible chez les vers infectés au premier jour (4,66 %). Il est identique pour l'infection aux deuxième (18,66 %) et troisième jours (28,0 %). L'infection au quatrième et au cinquième jour donne un taux égal d'émergence des papillons (46,66 et 52,66 %). La réduction du taux d'émergence indique que le développement des maladies est considérable même pendant le déroulement de la phase métabolique rapide de la transformation chrysalide-adulte. Bien que le groupe témoin ait donné un taux d'émergence de 75,67 %, il n'est pas différent de celui obtenu après l'infection aux huitième (89,33 %) et septième jours (88,66 %) (tableau I). Ces observations sont semblables à celles de Vago et Cayrol (1956), Hafez (1958) et Atger (1969).

On peut conclure que l'infection par le virus de Kenchu du premier au quatrième jour du cinquième âge larvaire chez le ver à soie (Pure Mysore) provoque une forte réduction du poids larvaire, du filage, des caractères du cocon et de l'émergence du papillon. Néanmoins, l'infection du sixième au huitième jour ne cause pas de fortes pertes pour les caractères économiques considérés dans cette étude. Cela semble indiquer l'existence probable d'une immunité chez le ver à soie arrivé à maturité contre le virus de Kenchu, comme cela a été observé dans le cas de *Heliothis zea* et de *H. virescens* pour l'infection par le virus de la polyédrose nucléaire (Ignoffo, 1966).

STUDIES ON THE DETECTION OF DENSONUCLEOSIS VIRUS (DNV) (STRAIN OF CHINA) USING THE BIOTIN-AVIDIN SYSTEM (BAS) IN THE SILKWORM, *BOMBYX MORI*.

SHI L. & DING H..

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

A new technique for the specific detection of the denisonucleosis virus (DNV) of the silkworm, Bombyx mori, was developed based on the principle of biological amplification of biotin-avidin system (BAS) combined with the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). With the low non-specificity and fine reproducibility, the technique has a high sensitivity by which 1 ng/ml of purified DNV protein can be detected. This technique would develop into a medium for the early stage diagnosis and epidemiology investigation of the DNV diseases of the silkworm, Bombyx mori.

Keywords : Biotin-avidin system (BAS), *Bombyx mori*, denisonucleosis virus (DNV), detection.

INTRODUCTION

Having developed in recent years, the biotin-avidin system (BAS) is a new biological amplification system with very high susceptibility, specificity and stability, and can be used to detect microantigens and microantibodies. It is widely used in immunochemistry and other domains (Kendal *et al.*, 1983 ; Wilchek *et al.*, 1984). A new technique for the specific detection of the denisonucleosis virus (DNV) of the silkworm, *Bombyx mori*, was developed based on the principle of the BAS combined with the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

MATERIALS AND METHODS

DNV :

DNV was propagated in the larvae of the silkworm by *per os* inoculation, and was purified according to the method described by Q. Yuanjun *et al.* (1981).

Anti-DNV IgG :

Purified virus was suspended in physiological saline and mixed with an equal volume Freund's nocomplete adjuvant. Rabbits were immunized with this emulsion by intramuscular injection to make the specific antiserum. Sera were heated at 56°C for 30 min. and stored at -20°C until use. The IgG of the rabbit anti-DNV sera were isolated by ammonium sulfate precipitation and DEAE-cellulose column chromatography (D. Ping, 1982).

Biotinylation of anti-DNV IgG :

Biotinyl-N-hydroxysuccinimide (BNHS) was used in covalent combination with anti-DNV IgG. 20 µl of a 30 mg/ml solution of BNHS dissolved in distilled dimethyl formamide (DMF) was added to 1 ml of a 1 mg/ml solution of anti-DNV IgG in 0.1 M NaHCO₃. After incubation for 2 hrs. at room temperature, the reaction mixture was dialyzed for 24 hrs at 4°C against several changes of 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2. The effectiveness of biotinylation of anti-DNV IgG was evaluated by avidin.

ABC-ELISA procedure :

a) 55-well plates were coated with purified anti-DNV IgG diluted with coating buffer (0.05 M sodium carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6). After incubation for 24 hrs. at 4°C, the plates were rinsed with rinse buffer (PBST) (PBS, pH 7.4, containing 1 % Tween 20).

b) Antigen (DNV) to be detected was added to wells, then blank wells and negative wells were set up as contrasts. After incubation for 1 hr. at 37°C, the plates were rinsed with PBST.

c) Biotinylated anti-DNV IgG diluted with PBST containing 1 % bovine serum albumin (PBST-BSA) were added to each well. After incubation at 37°C for 30 min., the plates were washed with PBST.

d) Avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in PBST-BSA was added to each well. After incubation at 37°C for 30 min., the plates were rinsed with PBST.

e) Fresh OPD substrate solution prepared with 0.5 mg/ml O-phenylenediamine and 0.04 % H₂O₂ in 0.1 M citric acid buffer, pH 5.0 was added to each well. Staining at 37°C for 30 min. The enzyme reaction was terminated by the addition of 2 M H₂SO₄ solution and the optical density (OD) was read at 490 nm in a ELISA reader. The positive criteria were P/N value > 2.1.

Midgut extract :

The midgut of silkworm larvae (DNV infected or healthy) were homogenized with 30 vol (W/V) of 0.05 M PBS, pH 7.2. The homogenate was then centrifuged at 3000 rpm for 20 min, and the supernatant was diluted with PBST to detect.

Protein determination :

Protein concentration was determined by the method of Lowry *et al.*, (1951) by using bovine serum albumin as the standard.

Table I. Titration of optimum dilutions of anti-DNV IgG used for coating and of biotinylated IgG.

Tableau I. Titrage des dilutions optimales des IgG anti-DNV utilisés pour l'enrobage et des IgG biotinylés.

	Biotinylated IgG*		IgG** (P/N value)			
	IgG biotinylés		IgG** (Valeur P/N)			
	1	2	3	8	16	
1000	6.33	6.63	6.83	7.08	6.38	
500	8.17	9.83	9.54	7.88	6.75	
250	11.63	20.83	19.29	15.08	17.21	
125	12.50	20.83	21.50	20.08	17.21	
62.5	21.08	17.87	18.43	17.21	16.07	

* Expressed as reciprocal dilution / *Exprimé sous forme réciproque de la dilution.*

** µg/ml

*** 5 µg/ml of antigen (DNV), 1 : 1000 dilution of ABC / 5 µg/ml d'antigène (DNV), dilution au 1/1000 de complexe ABC.

RESULTS

Through the detection by checkerboard titration method, the optimum conditions for the detection of the DNV in silkworm using the ABC-ELISA were as follows : 4 µg/ml of anti-DNV IgG for coating plates, 1 : 125 dilution of biotinylated anti-DNV IgG and 1 : 1000 dilution of ABC (Tables I and II). If each working concentration is raised, the OD value of positive samples will be increased, but the P/N value will be decreased as a result of the increase of the background value.

With these optimum conditions, the detection of purified DNV of silkworm was shown in Table III. The result indicated that 1 ng/ml of purified DNV protein could be detected by ABC-ELISA. Also, the DNV in midgut of infected silkworm larvae was detected. The dilution of midgut of DNV

Table II. Titration of optimum dilution of ABC.

Tableau II. Titrage de la dilution optimale du complexe ABC.

ABC*	250	500	1000	1500	2000
P/N value	19.17	20.00	21.21	20.30	13.70
Valeur P/N					

* Expressed as reciprocal dilution / *Exprimé sous forme réciproque de la dilution.*

** 4 µg/ml of anti-DNV IgG which coated plates, 1:125 dilution of biotinylated anti-DNV IgG, 5 µg/ml of antigen (DNV) / *4 µg/ml d'IgG anti-DNV qui recouvrait les plaques, dilution au 1/125 d'IgG anti-DNV biotinylés, 5 µg/ml d'antigène (DNV).*

infected silkworm larvae paralleled closely the P/N value (Fig. 1). The result suggested that the supernatant of a homogenate of midgut of DNV infected larvae did not hinder the reaction of antigen-antibody in detection by ABC-ELISA, and did not lead to a non-specific reaction to regular constituent of normal silkworm larvae.

Table III. Detection of purified DNV by ABC-ELISA.

Tableau III. Détection du DNV purifié par la technique ELISA-ABC.

DNV protein (µg/ml)	0.0005	0.001	0.002	0.004	0.008	0.016	0.032
Protéine DNV (µg/ml)							
P/N value	1.85	2.20	2.25	2.41	2.60	3.15	4.40
Valeur P/N							
DNV Protein (µg/ml)	0.064	0.128	0.256	0.512	1.024	2.048	
Protéine DNV (µg/ml)							
P/N value	5.45	6.20	7.55	8.60	11.45	18.65	
Valeur P/N							

Figure 2 presents the blocking test with ABC-ELISA in DNV solution neutralized by 4 µg/ml of anti-DNV IgG at 37°C for 1 hr. The OD 490 values of blocked wells greatly decreased to approach the negative level, the inhibition was much larger than 50 %. In addition, the cross reaction to nuclear polyhedrosis virus (NPV) and cytoplasmic polyhedrosis virus (CPV) of silkworm did not present in the cross test with ABC-ELISA (Table IV). Meanwhile, the repetitive test with ABC-ELISA was also conducted. The variance coefficient of repeated OD values was an average of 7.4 % in the batch and

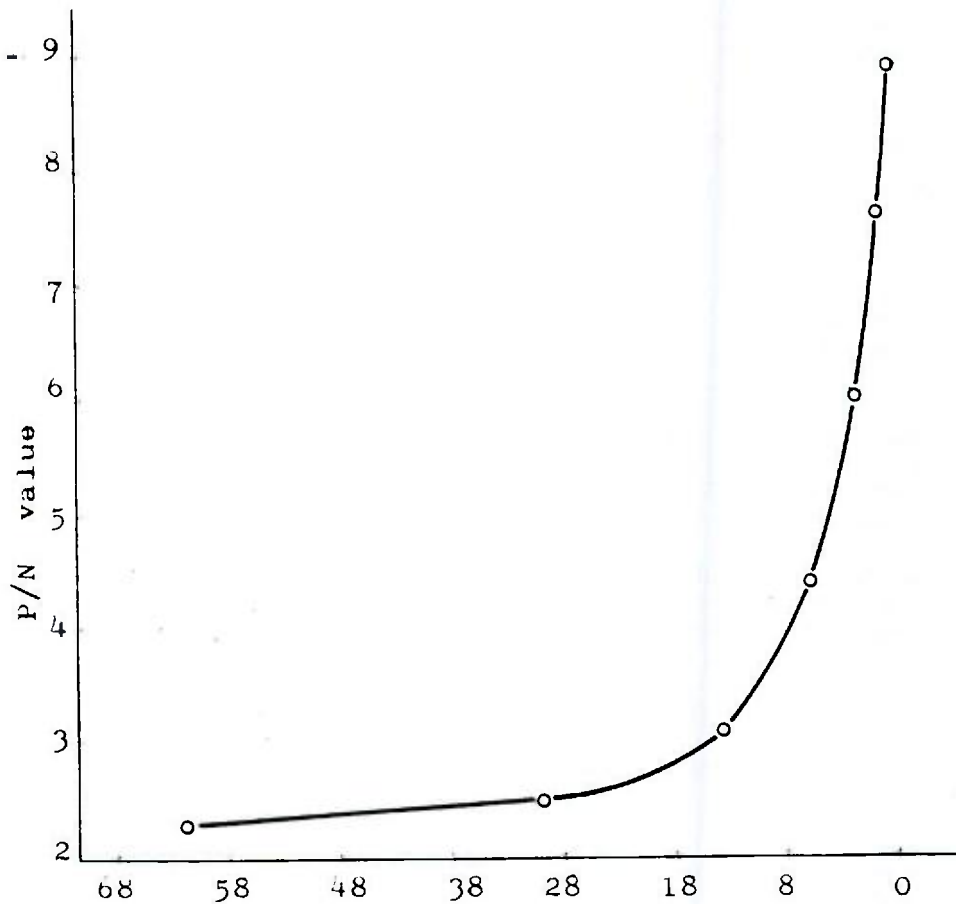


Fig. 1 : Detection of DNV in the midgut of infected silkworm larvae by ABC-ELISA. (x 10⁶)*

*Fig. 1 : Détection par la technique ABC-ELISA du DNV dans l'intestin moyen de larves de vers à soie contaminées. (x 10⁶)**

* Expressed as reciprocal dilution / Exprimé sous forme de réciproque.

of 15.7 % among the batches. These results showed that this technique has a high specificity and a good reproducibility.

DISCUSSION

The densovirus of the silkworm is a non-inclusion virus, which detection is analysed by researchers in China and other countries (S. Shimizu *et al.*, 1986 ; S. Maeda *et al.*, 1978). Biotin has an exceptionally strong affinity to avidin, their affinity constant being a million times higher than that between antigen and antibody (Green, 1963). Biotin can be covalently coupled to antibody or enzyme without affecting the biological activity of both procedures (Guesdon *et al.*, 1979). There are four locations bound to biotin in an avidin molecule, a biotin-avidin complex can be conjugated at least to three enzyme molecules and a number of biotin molecules can be coupled by an antibody molecule with an efficiency of almost 100 %. Thus, multi-amplification is obtained through avidin and biotin-enzyme system to increase the sensitivity of detection. The experiment first detected DNV of silkworm by means of ABC-ELISA. With ABC-ELISA, 1 ng/ml of purified DNV protein of silkworm could be detected and DNV in the midgut of infected larvae could also be detected specifically and sensitively, which was a high specificity and a good reproducibility. These results demonstrated a good application prospect for this technique which could be developed into a means

Table IV. Cross test with ABC-ELISA.

Tableau IV. Test croisé avec la technique ABC-ELISA.

Dilution*	DNV	Virus		
		--**	NPV	CPV
10	1.32***	0.06	0.05	0.07
20	0.98	0.06	0.05	0.06
40	0.85	0.05	0.04	0.06

* Expressed as reciprocal / Exprimé sous forme de réciproque.

** Negative sample / Echantillon négatif.

*** OD 490 values / Valeurs de DO 490.

**** Midgut extract of DNV infected silkworm larvae was used as DNV ; midgut extract of CPV infected silkworm larvae was used as CPV ; humor of NPV infected silkworm larvae was used as NPV. / On a utilisé des extraits d'intestin de larves infectées par DNV pour l'étude du virus de la densovirose. On a utilisé des extraits d'intestin de larves infectées par CPV pour l'étude du virus de la polyédrose cytoplasmique. On a utilisé de l'humor de larves infectées par NPV pour l'étude du virus de la polyédrose nucléaire.

for the early stage diagnosis and epidemiology investigation of the silkworm DNV disease. The study has a very great significance for the effective control of the silkworm DNV disease in production. Avidin, a glycoprotein from egg white with positive charge in the usual buffer, is easily absorbed non-specifically on coated plates to increase the OD value of negative wells and blank wells. In our experiments, we used the dilution that P/N values is the greatest of ABC and added 1 % BSA in the diluter for decreasing the non-specific absorption of avidin. So that, very low OD 490 values of blank wells and negative wells were obtained. Biotinylation of antibody was simple but the amount of BNHS should be proper. If the amount of BNHS is too small, the stained colour will be too light. On the

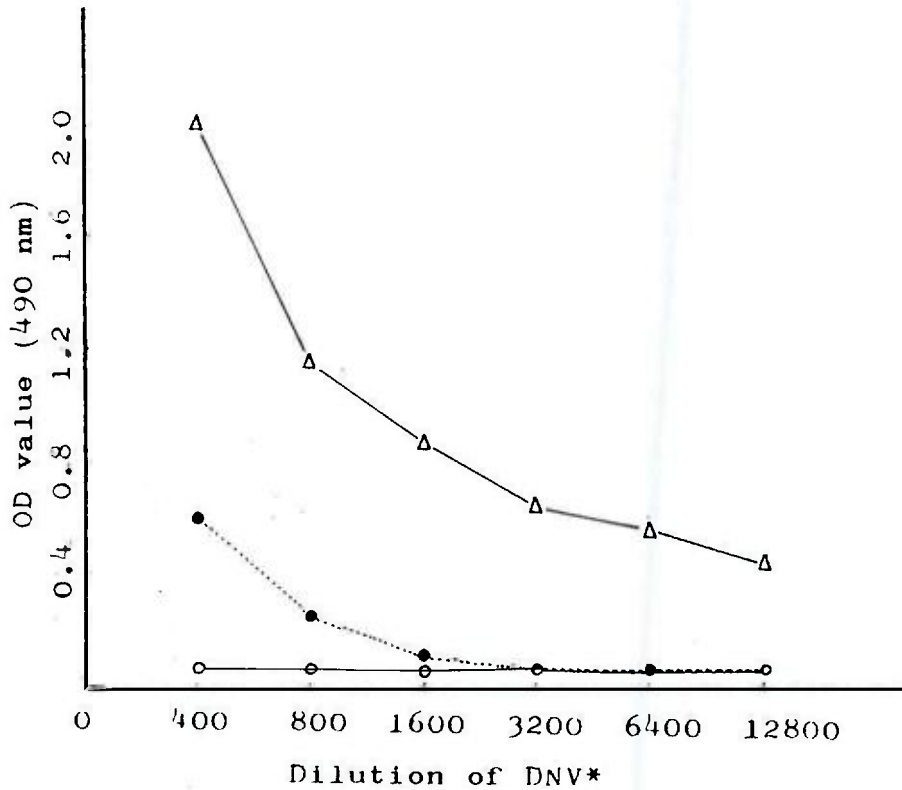


Fig. 2 : Block test with ABC-ELISA.

Fig. 2 : Test d'inhibition par la technique ABC-ELISA.

The conjugating systems utilized were as follows / Les systèmes inhibiteurs utilisés sont les suivants :

Δ—Δ : Absorption curve of positive sample / Courbe d'adsorption de l'échantillon positif.

●—● : Absorption curve of blocked positive sample / Courbe d'adsorption de l'échantillon positif inhibé.

○—○ : Absorption curve of negative sample / Courbe d'adsorption de l'échantillon négatif.

* Expressed as reciprocal dilution (original concentration of DNV is 1.626 mg/ml). / Exprimé sous forme de réciproque (la concentration originale en DNV est de 1.626 mg/ml).

other hand, if the amount of BNHS is too large, the OD values of blank wells and negative wells will be too high. So, both may influence the sensitivity of this technique. We used the proportion of 0.5-0.6 mg BNHS to 1 mg antibody and the dialysis of the mixture against PBS (0.01 M, pH 7.2) resulting in a better biotinylation effect of the antibody than others.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Dr. Bao Xinghao and Cheng Zhenqiu for the helpful instructions and encouragements during the study, Dr. Jiang Youlong and Yang Jinhou for reading the manuscript and providing helpful suggestions.

REFERENCES

- DU PING (1982), Experimental Virology for Medicine. Shanghai Microbiological Society, 137-142.
- GREEN N. M. (1963), J. Biochem, 89, 585-594.
- GUESDON J., THIERRY R., AVRAMEAS S. (1979), J. Allergy Clin. Immunol., 21, 1131-1142.
- KENDALL C., LONESCU-MATIU I., DREESMAN G. R. (1983), J. Immunol. Meth., 56, 329-339.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R. L. (1951), J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- MAEDA S., WATANABE H. (1978), Jap. J. Appl. Ent. Zool, 22, 98-101.
- QIAN YANJUN, HU XUEFANG, DAI RENMING (1981), Science of Sericulture, 7(2), 100-104.
- SHIMIZU S., ARAKAWA A. (1986), J. Sericul. Sci. Jpn., 55(2), 153-157.
- WILCHEK M. (1984), Immunol. Today, 5(2), 39-50.

ETUDES SUR LA DETECTION DU VIRUS DE LA DENSONUCLEOSE (DNV) (SOUCHE CHINOISE) PAR LE SYSTEME BIOTINE-AVIDINE (BAS) CHEZ LE VER A SOIE *BOMBYX MORI*

SHI L. et DING H.

Sericultural Research Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou, Chine.

Une nouvelle technique de détection spécifique du virus de la densonucléose (DNV) du ver à soie Bombyx mori a été développée à partir du principe de l'amplification biologique du système biotine-avidine (BAS) combiné avec l'immuno-adsorption sur enzymes fixées (ELISA). Donnant une faible non-spécificité et une bonne reproductivité, cette technique fournit une forte sensibilité grâce à laquelle on peut détecter la présence de 1 ng/ml de protéines DNV purifiées. Elle pourrait devenir un instrument de diagnostic au stade précoce et d'investigation épidémiologique des maladies par DNV chez Bombyx mori.

INTRODUCTION

Développé depuis quelques années, le système biotine-avidine (BAS) est un nouveau système d'amplification biologique à fortes sensibilité, spécificité et stabilité qui permet de détecter les antigènes et les anticorps en micro-quantité. Il est largement utilisé en immunochimie et dans d'autres domaines (Kendal et coll., 1983 ; Wilchek et coll., 1984). Une nouvelle technique de détection spécifique du virus de la densonucléose (DNV) chez *Bombyx mori* a été développée à partir du principe du BAS combiné avec la technique ELISA.

MATERIELS ET METHODES

DNV :

Le DNV a été propagé dans les larves de ver à soie par injection *per os*, et a été purifié selon la méthode décrite par Q. Yuanjun et coll. (1981).

IgG anti-DNV :

Le virus purifié a été suspendu dans une solution saline physiologique et mélangé à un volume égal d'adjuvant incomplet de Freund. Des lapins ont été immunisés avec cette émulsion par injection intra-musculaire pour constituer l'antisérum spécifique. Les sérums ont été portés à une température de 56°C pendant 30 mn et stockés à une température de -20°C jusqu'à leur utilisation. La fraction IgG des sérums de lapins anti-DNV a été isolée par précipitation au sulfate d'ammonium et par chromatographie sur colonne de DEAA-cellulose (D. PING, 1982).

Biotinylation des IgG anti-DNV :

On a utilisé du Biotinyl-N-hydroxysuccinimide-N-biotinyl (BNHS) lié de manière covalente avec des IgG anti-DNV. On a ajouté 20 µl d'une solution de BNHS à 30 mg/ml dans de la diméthyleformamide (DMF) à une solution d'IgG anti-DNV à 1 mg/ml dans 0,1 M NaHCO₃. Après incubation pendant 2 heures à température ambiante, le mélange a été dialysé durant 24 heures à 4°C contre un tampon phosphate 0,01 M, pH 7,2 (POS). L'efficacité de la biotinylation de l'IgG anti-DNV a été évaluée par l'avidine.

Procédé ABC-ELISA :

a) 55 plaques à puits ont été enduites d'IgG anti-DNV purifiés dilués dans un tampon d'enrobage (tampon à 0,05 M de carbonate-bicarbonate de sodium, pH 9,6). Après incubation pendant 24 heures à 4°C, les plaques ont été rincées avec le tampon de rinçage (PBST) (PBS, pH 7,4, contenant 1 % de Tween 20).

b) L'antigène (DNV) à détecter est ensuite ajouté aux puits. Des puits "blancs" et des puits négatifs sont utilisés comme témoins. Après incubation pendant 1 heure à 37°C, les plaques sont rincées avec du PBST.

c) On ajoute à chaque puits de l'IgG anti-DNV biotinylé dilué dans du PBST contenant de la sérumalbumine bovine à 1 % (PBST-BSA). Après incubation à 37°C pendant 30 mn, les plaques sont rincées avec du PBST.

d) Le complexe avidine-biotine-péroxydase (ABC) est ensuite ajouté dans chaque puits. Après incubation à 37°C pendant 30 mn, les plaques ont été rincées avec du PBST.

e) On ajoute dans chaque puits une solution de substrat OPD fraîche préparée avec de l'O-phénylènediamine à 0,05 mg/ml et de l'H₂O₂ à 0,4 % dans un tampon citrate à 0,1 M, pH 5,0. La coloration s'effectue à 37°C pendant 30 mn. La réaction enzymatique est stoppée par addition d'une solution de H₂SO₄ 2 M, puis la densité optique (DO) est mesurée à 490 nm dans un lecteur d'ELISA. Le critère de réaction positive est fixé à une valeur P/N 2,1.

Extraits d'intestins :

Des intestins de larves (contaminées par le DNV ou saines) ont été homogénéisés dans 30 vol. (W/V) de PBS 0,05 M, pH 7,2. L'homogénat a ensuite été centrifugé à 3 000 t/mn pendant 30 mn, puis le surnageant dilué dans du PBST pour la détection.

Détermination des protéines :

La concentration en protéines a été déterminée suivant la méthode de Lowry et coll. (1951) en utilisant de l'albumine de sérum bovin comme standard.

RESULTATS

La détection suivant la méthode de titrage par grille témoin a montré que les conditions optimales de détection du DNV par la technique ABC-ELISA chez le ver à soie étaient les suivantes : 4 µl/ml d'IgG anti-DNV pour l'enrobage des plaques, une dilution au 1/125^e d'IgG anti-DNV biotinylés et une dilution de ABC à 1/1000^e (Tableaux I et II). Si chaque concentration de travail est augmentée, les valeurs de DO des échantillons positifs seront alors augmentées, mais la valeur P/N diminuera du fait de l'augmentation du bruit de fond.

Dans ces conditions optimales, la détection du DNV purifié de ver à soie est indiquée au tableau III. Les résultats indiquent que l'ABC-ELISA permet de détecter la présence de 1 ng/ml de protéines de DNV purifiées. De plus, on a pu détecter la présence du DNV dans les intestins de larves contaminées. La dilution des intestins des larves infectées par DNV suit la valeur P/N (Figure 1). Les résultats suggèrent que le surnageant d'un homogénat d'intestin de larves contaminées n'entrave nullement la réaction antigène-anticorps dans la détection par ABC-ELISA et ne conduit pas non plus à une réaction non spécifique avec les composants ordinaires des larves saines.

La figure 2 présente le test de blocage par ABC-ELISA dans une solution DNV neutralisée par 4 µg/ml d'IgG anti-DNV à 37°C pendant 1 heure. La valeur de DO à 490 nm des puits bloqués est fortement diminuée et s'approche du niveau négatif, l'inhibition ayant largement dépassé 50 %. De plus, la réaction croisée avec le virus de la polyédrose nucléaire (NPV) et le virus de la polyédrose cytoplasmique (CPV) du ver à soie est inexistante avec ABC-ELISA (Tableau IV). Dans le même temps, on a également effectué le test répétitif ABC-ELISA. Le coefficient de variance des valeurs de DO est en moyenne de 7,4 % à l'intérieur d'un lot et de 15,7 % entre différents lots. Ces résultats montrent que cette technique donne une spécificité élevée et une bonne reproductibilité.

DISCUSSION

Le virus de la denso-nucléose du ver à soie est un virus non-occlus, dont la détection est analysée par des chercheurs de Chine et d'autres pays (S. Shimizu et coll., 1986 ; S. Maeda et coll., 1978). La biotine a une affinité très forte pour l'avidine, leur constante d'affinité étant un million de fois plus élevée que celle de l'antigène et l'anticorps (Green, 1963). La biotine peut être combinée de manière covalente avec un anticorps ou une enzyme sans que cela affecte l'activité biologique des deux processus (Guesdon et coll., 1979). Il existe quatre emplacements où l'on peut fixer de la biotine dans une molécule d'avidine. On peut conjuguer un complexe biotine-avidine avec au moins trois molécules d'enzyme et bon nombre de molécules de biotine peuvent être couplées à une molécule d'anticorps avec une efficacité de pratiquement 100 %. Ainsi, on obtient une poly-amplification à travers l'avidine et le système enzyme-biotine, ce qui augmente la sensibilité de la détection. L'expérience a tout d'abord permis de détecter la présence du DNV de ver à soie par ABC-ELISA. Avec ce système, on a pu détecté 1 ng/ml de protéine de DNV purifié de ver à soie. On a également détecté la présence de DNV dans les intestins de larves contaminées de manière spécifique et sensible, avec une spécificité élevée et une bonne reproductibilité. Ces résultats ont prouvé qu'il y avait une perspective intéressante d'application de cette technique qui pourrait devenir un instrument de diagnostic du stade précoce et d'investigation épidémiologique de la maladie du ver à soie par DNV. Cette étude présente un intérêt très important pour la production dans la lutte effective contre la maladie par DNV du ver à soie.

L'avidine, glycoprotéine du blanc d'oeuf possédant une charge positive dans le tampon usuel, est facilement adsorbée de manière non spécifique sur des plaques enduites afin d'augmenter la valeur de DO des puits négatifs et des puits "blancs". Dans nos expériences, nous avons utilisé des dilutions telles que P/N soit le plus élevé et ajouté 1 % de BSA dans le diluant afin de réduire l'adsorption non spécifique de l'avidine. De cette manière, on a pu obtenir des valeurs de DO à 490 nm très faibles pour les puits "blancs" et les puits négatifs.

La biotinylation de l'anticorps est simple mais le taux de BNHS doit être calculé avec précaution: si le taux de BNHS est trop faible, la coloration sera trop légère, si le taux de BNHS est trop élevé, les valeurs de DO des puits "blancs" et des puits négatifs seront trop élevées. Ainsi, tous deux peuvent avoir une incidence sur la sensibilité de cette technique. On a utilisé comme proportion 0,5 -0,6 mg de BNHS pour 1 mg d'anticorps et la dialyse de ce mélange contre le PBS (0,01 M, pH 7,2) a eu pour effet une meilleure biotinylation de l'anticorps.

STUDIES ON THE TRANSMISSION OF NOSEMA SP. IN TROPICAL TASAR SILKWORM *ANTHERAEA MYLITTA* D.

U. P. GRIYAGHEY & K. SENGUPTA.

Central Tasar Research & Training Institute, Ranchi 834-005 (Bihar), India.

Transmission of Nosema sp. infection in Antheraea mylitta D. takes place exclusively from the mother moth to the offspring through ovum, often at 85 to 90 % efficiency. The level of transmission and degree of infection in the offspring have been found to be directly correlated to the intensity of infection of the mother moth. The role of the male moth has been found to be absent in this process. As such, outdoor coupling of mother moths with wild moths giving better percentage of coupling could be safely adopted without any fear of transmission of infection.

Keywords : Microsporidiosis, *per os*, transovarial transmission, pebrine, monosporoblastic.

INTRODUCTION

Microsporidiosis in the tropical Tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D., caused by the *Nosema* sp. has become one of the most prevalent diseases. The pathogen which belongs to the order Microsporidia and family Nosematidae is monosporoblastic in nature and assigned to the genus *Nosema*.

The disease caused by the pathogen is popularly known as "Pebrine" because of the appearance of dark pepper like spots on the integument of the diseased Tasar silkworm larvae. However, the benign symptoms of the diseases, during the early stage of infection make it impossible to detect the presence of pathogen until it has seriously damaged the rearings. The outbreak of the disease in an epidemic form has made it imperative to device aseptic grainage/rearing conditions to maintain disease-free population. However, if such techniques are to be successful, we must understand how the microsporidian is transmitted. Transovarian mode of transmission of the pathogen holds more secrets than the *per os* type and has thus intrigued numerous investigators (Brooks, 1968, Tanabe *et al.*, 1967 ; Kellen *et al.*, 1973, and Thomson, 1958) over the years and stimulated much research.

In *A. mylitta* transovarian mode of transmission of *Nosema* sp. was reported by Jolly *et al.* (1972). The present study was conducted to understand the role of the male, if any, in transmitting the disease and the level of efficiency at which the pathogen is transmitted by the parents to the offspring.

MATERIALS AND METHODS

Temporary stained squash preparation of testes of freshly emerged male moths in aceto-carmin were prepared.

Similarly temporary slides of smears of *Nosema* sp. infected tissue suspension in distilled water were prepared. Ten slides of testes and spores were prepared and from each slide ten sperm head/spores were measured at 1,600 x magnification.

Further, the role of the male in transmitting the disease was observed through rearing performances. The layings obtained from the following possible cross combination of uninfected and infected parents were reared.

1. Infected female x Infected male
2. Infected female x Uninfected male

3. Uninfected female x Infected male
4. Uninfected female x Uninfected male

As per the norms of egg surface sterilization (Griyaghey *et al.*, 1974), the eggs were disinfected in 5 % formalin for 5 min and thereafter washed thoroughly with sterile distilled water. On hatching the larvae were reared on isolated patches of *Terminalia tomentosa* bushes.

To assess the extent of infection in the offspring, the infected mother moths with three different intensities of infection viz., 'light'¹, 'medium'² and 'heavy'³, were considered for the purpose. Five layings were prepared from each of the categories. The layings thus prepared were thoroughly disinfected, dried and kept in laying boxes. On hatching 30 worms were isolated at random from each laying, thus making 150 worms from each category.

These worms were reared individually under indoor conditions up to III instar and then smears of each worm were examined for *Nosema* infection.

RESULTS AND DISCUSSION

Male as the transmitting agent :

Size of the *Nosema* sp. spore was observed to be $5.8 \pm 1.16 \mu$ in length and $2.32 \pm 0.04 \mu$ in width. Similarly, the mature sperm measures $4.3 \pm 0.2 \mu$ in length and $0.50 \pm 0.05 \mu$ in width (Table I).

Table I.

Tableau I.

Material studied <i>Matériel étudié</i>	Length (in micron) <i>Longueur (en microns)</i>			Width (in micron) <i>Largeur (en microns)</i>		
	Minimum	Maximum	Mean	Minimum	Maximum	Mean
	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Moyenne</i>
Sperm head <i>Tête des spermatozoïdes</i>	4.10	4.50	4.30	0.40	0.55	0.50
<i>Nosema</i> sp. spore <i>Spore de Nosema sp.</i>	4.64	9.96	5.80	1.86	2.78	2.32

The marked difference between the size of the *Nosema* spore and sperm head of *A. mylitta* clearly shows that the spore can not be accommodated in the sperm head and as such, the possibility of transmission of *Nosema* spore through male moths is ruled out.

Rearing performance :

The results of the rearing performance of the laying from different combinations (Table II) show 88.43 and 88.20 % mortality due to microsporidiosis in the lots where infected females were used along with infected and uninfected males respectively.

Identical observation of a severe population reduction due to transovarian transmission was also observed by Andreadis (1984) and Hill & Gary (1979). In contrast the incidence of microsporidiosis was nil where uninfected females were used. Thus, almost equal quantum of loss due to microsporidiosis in combinations where females were infected and no loss due to microsporidiosis where females were uninfected clearly indicates the non-significant contribution of the male towards

Table II. Rearing performance of laying from various possible crosses.

Tableau II. Performance d'élevage des pontes provenant des divers croisements possibles.

Sl	Cross combination Sl Croisements	Hatching % % d'éclosion	Effective rate of rearing Taux effectif d'élevage	Disease mortality Mortalité par maladie			Cocoon weight Poids du cocon	Shell weight Poids coque	Silk ratio Richesse soyeuse
				Microsporidiosis Microsporidiose	Bacteriosis Bactériose	Polyhedrosis Polyédrose			
			(%)	(%)	(%)	(%)	(g)	(g)	(%)
1	Infected female X Infected males 1 Femelles contaminées X mâles contaminés	59.00	6.76	88.43	-	-	10.35	1.28	12.70
2	Infected females X Uninfected mâles 2 Femelles contaminées X mâles sains	58.00	6.91	88.20	-	-	10.41	1.31	12.50
3	Uninfected females X Infected males 3 Femelles saines X mâles contaminés	74.00	65.53	nil néant	10.59	18.69	1.48	1.53	13.30
4	Uninfected females X Uninfected males 4 Femelles saines X mâles sains	75.00	64.86	nil néant	11.12	18.91	11.51	1.50	13.00

the transmission of the pathogen. It is further observed that hatchability goes down considerably (59.0 & 58.0 %) in the case of eggs from infected females in comparison to uninfected females (75.0 and 74.0 %) irrespective of the fact whether the males were infected or uninfected. The results thus obtained in *A. mylitta* are in conformity with the results of *Trichoplusia ni* (Tanabe and Tamashiro, 1967) and *Malacosoma americanum* (Nordin, 1975). The decline in hatchability as observed in the uninfected females x infected males combination of *T. ni* was not noticed in *A. mylitta*.

Table III. Extent of infection in the progenies of infected mother moths.

Tableau III. Etendue de l'infection à la progéniture des mères infectées.

SI Intensity of No infection of moth <i>Intensité de l'infection du papillon</i>	No of larvae reared <i>Nb. de larves élevées</i>	Pebrine incidence %			Total	Pebrine free larvae % <i>Larves non- pébrinisées %</i>
		P(L)	P(M)	P(H)		
		<i>Incidence de la pébrine</i> P(L)	P(M)	P(H)	Total	<i>Larves non- pébrinisées %</i>
1 P(L)	150	48.00	23.33	14.00	85.33	14.67
2 P(M)	150	20.67	31.33	40.67	92.67	7.33
3 P(H)	150	4.67	36.67	57.33	98.67	1.33

P(L) up to five spores / *P(L) jusqu'à cinq spores.*

P(M) between 6-10 spores / *P(M) entre 6 et 10 spores.*

P(H) more than 10 spores in one microscopic field / *P(H) plus de 10 spores dans un champ microscopique.*

Extent of transovarial transmission :

Observations (Table III) indicate that while only 85.33 % of the worms were infected with *Nosema sp.* in the lots obtained from the mother with light infection, the same was 92.67 and 98.76 % from the lots obtained from mothers with medium and heavy infections respectively. Furthermore, the different degrees of infection among the progenies of the same mother was also observed.

Degree of infection was found to be maximum in the offsprings from mothers with heavy infection and minimum in the offsprings from mothers with lighter infection. Thus, it is clearly observed that the extent and intensity of infection in the offsprings is directly correlated to the intensity of infection in the mother-moth. This is quite in conformity with the findings of Siegel *et al.* (1986) who concluded that the level of infection at a particular stage should determine the level of infection in the succeeding generation due to transovarial transmission.

CONCLUSION

The study clearly indicates that the male moth can not transmit the disease to its offsprings. On the other hand, the female counterpart depending upon the intensity of infection can transmit the disease with nearly 85-98 % efficiency. The findings thus remove the fear of pebrine infection from outdoor coupling of mother moths with wild males, sometimes resorted to for rejuvenation and obtaining a better percentage of coupling.

REFERENCES

ANDREADIS T. G. (1984), Epizootiology of *Nosema pyrausta* in field populations of the European comborborer (Lepidoptera : Pyralidae). Environ. Entomol., 13, 882-887.

BROOKS W. M. (1968), Transovarian transmission of *Nosema heliothidis* in the corn earworm, *Heliothis zea*. J. Invertebr. Pathol., 11, 510-512.

GRIYAGHEY U. P., SEN. S. K., JOLLY M. S., SRIVASTAVA A. K. (1979), Studies on the egg surface sterilants against polyhedrosis virus of *A. mylitta* D. Proceedings of the first International Seminar on non mulberry silks.

JOLLY M.S., SEN S.K. (1972), Infection of *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera : saturniidae) by a microsporidian (*Nosema* sp.). Ind. J. Seric., 11, 52-57.

HILL R.E., GARY W.J. (1979), Effects of the microsporidium *Nosema pyrausta* on field populations of European cornborers in Nebraska Environ. Entomol., 8, 91-95.

KELLEN W.R., LINDERGREN J.E. (1973), Transovarian transmission of *Nosema plodia* in the Indian meal moth *Plodia interpunctella*. J. Invertebr. Pathol., 21, 248-254.

NORDIN G.L. (1975), Transovarial transmission of *Nosema* sp. infecting *Malacasoma americanum*. J. Invertebr. Pathol., 25, 221-228.

SIEGEL J. P., MADOX J. V., RUESINK (1986), Impact of *Nosema pyrausta* on a Braconid, *Macrocentrus quandii*, in central Illinois. J. Invertebr. Pathol., 47, 271-276.

THOMSON H. M. (1985), The effect of a microsporidian parasite on the development, reproduction and mortality of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Chem.). Can. J. Zool., 36, 499-511.

TANABE A.M., TAMASHIRO M. (1967), The biology and pathogenicity of a microsporidian (*Nosematrichoplusia* sp. n.) of cabbage looper, *Trichoplusia ni*. (Lepidoptera : Noctuidae). J. Invertebr. Pathol., 2, 188-195.

ETUDES SUR LA TRANSMISSION DE *NOSEMA* SP. CHEZ LE VER A SOIE TASAR TROPICAL, *ANTHERAEA* *MYLITTA* D.

U. P. GRIYAGHEY & K. SENGUPTA

Central Tasar Research & Training Institute, Ranchi 834-005 (Bihar), Inde.

La transmission de l'infection de Nosema sp. chez Antheraea mylitta D. s'effectue exclusivement du papillon femelle à sa progéniture à travers le système ovarien avec un taux d'efficacité de 85 à 90 %. Le niveau de transmission et le degré d'infection de la progéniture sont directement liés à l'intensité de l'infection du papillon femelle. Le rôle du papillon mâle est inexistant dans ce processus. Ainsi des accouplements de papillons femelles avec des papillons sauvages qui donnent un meilleur pourcentage d'accouplement pourraient être effectués en sécurité sans crainte de transmission de l'infection.

INTRODUCTION

La microsporidiose du ver à soie Tasar tropical *Antheraea mylitta* D. causée par *Nosema* sp. est devenue l'une des maladies les plus fréquentes. L'agent pathogène qui appartient à l'ordre des Microsporidiés et à la famille des Nosematidés est de nature monosporoblastique et appartient au genre *Nosema*.

La maladie causée par l'agent pathogène est communément appelée "pébrine" à cause de points noirs rappelant le poivre sur le tégument de la larve malade du ver à soie tasar. Cependant, les symptômes bénins des maladies, pendant les premiers stades de l'infection, rendent impossible la détection de l'agent pathogène jusqu'à ce qu'il n'ait sérieusement endommagé les élevages. Le déclenchement de la maladie sous forme d'épidémie a rendu impératif la mise en place de conditions d'élevage et de grainage aseptiques pour maintenir les populations saines. Cependant bien que de telles techniques soient couronnées de succès, nous devons essayer de comprendre comment le microsporidien est transmis. La transmission ovarienne de l'agent pathogène est plus mystérieuse que le type *per os* et a donc intrigué de nombreux chercheurs (Brooks, 1968 ; Tanabe et coll., 1967 ; Kellen et coll., 1973 et Thomson, 1958) pendant des années et a engendré de nombreuses recherches.

La transmission ovarienne de *Nosema* sp. chez *A. mylitta* a été mentionnée par Jolly et coll. (1972). La présente étude a été entreprise pour comprendre le rôle du mâle, s'il y en a un, dans la transmission de la maladie et le niveau d'efficacité avec lequel l'agent pathogène est transmis par les parents à leur progéniture.

MATERIELS ET METHODES

Des préparations de testicules écrasés provenant de papillons mâles nouvellement émergés ont été colorés au carmin acétique.

De même on a préparé des lamelles de frottis de tissus infectés par *Nosema* sp. à partir d'une suspension aqueuse. Dix lames de testicules et de spores ont été préparées et sur chaque lame dix têtes de spermatozoïdes et dix spores ont été mesurés à un grossissement de 1 600.

De plus, le rôle du mâle dans la transmission de la maladie a été observé à travers les performances d'élevage. Les pontes obtenues des croisements possibles et mentionnés ci-dessous entre parents infectés et sains ont été élevées :

- 1) femelle infectée x mâle infecté
- 2) femelle infectée x mâle sain
- 3) femelle saine x mâle infecté
- 4) femelle saine x mâle sain

Selon les normes de stérilisation des surfaces des oeufs (Griyaghey et coll. 1974), les oeufs ont été désinfectés avec du formol à 5 % pendant 5 minutes puis abondamment rincés dans de l'eau distillée stérile. A l'éclosion, les larves ont été élevées sur des lots isolés de buissons de *Terminalia tomentosa*.

Pour évaluer l'étendue de l'infection chez la progéniture, trois "doses" d'infection ont été utilisées sur les papillons femelles : "légère"¹, "moyenne"² et "forte"³. Cinq pontes ont été utilisées pour chacune de ces catégories. Les pontes ainsi préparées ont été entièrement désinfectées, séchées et gardées dans des boîtes de ponte. A l'éclosion, trente vers ont été isolés au hasard dans chaque ponte soit au total cent cinquante vers pour chaque catégorie.

Ces vers ont été élevés individuellement à l'intérieur jusqu'au troisième âge larvaire ; des frottis de chaque ver ont été alors examinés pour mesurer l'infection par *Nosema*.

RESULTATS ET DISCUSSION

Le mâle comme agent de transmission :

La taille de la spore de *Nosema* sp. est de $5,8 \pm 1,16 \mu$ de long et $2,32 \pm 0,04 \mu$ de large ; les spermatozoïdes matures mesurent $4,3 \pm 0,2 \mu$ de longueur et $0,50 \pm 0,05$ de largeur (Tableau I).

La différence marquée entre la taille de la spore de *Nosema* et celle de la tête du spermatozoïde de *A. mylitta* montre clairement que la spore ne peut être contenue dans la tête des spermatozoïdes et de ce fait la possibilité de transmission de la spore de *Nosema* par l'intermédiaire des papillons mâles est exclue.

Performance d'élevage :

Les résultats de la performance d'élevage des pontes des différentes combinaisons (Tableau II) montrent que la mortalité due à la microsporidiose est respectivement de 88,43 et 88,20 % dans les lots où les femelles infectées ont été utilisées avec des mâles sains et avec des mâles infectés.

Une observation identique de réduction de population importante due à la transmission transovarienne a été faite par Andreadis (1984) et Hill et Gy (1979). En revanche, l'incidence de la microsporidiose est nulle quand des femelles saines sont utilisées. Ainsi, des pertes presque égales dues à la microsporidiose sont obtenues pour des combinaisons où les femelles étaient infectées et aucune perte due à la microsporidiose n'a été observée quand les femelles étaient saines. Ceci montre clairement l'absence de contribution du mâle dans la transmission de l'agent pathogène. En outre, on a observé que l'éclosion est considérablement plus faible (59,0 et 58,0 %) chez les oeufs provenant des femelles infectées que chez ceux provenant des femelles saines (75,0 et 74,0 %) indépendamment du fait que les mâles aient été infectés ou non. Les résultats ainsi obtenus pour *A. mylitta* sont en conformité avec les résultats observés chez *Trichoplusia ni* (Tanabe et Tamashiro, 1967) et *Malacosoma americanum* (Nordin, 1975). La baisse de l'éclosion observée chez *Trichoplusia ni* dans la combinaison femelle saine x mâle infecté n'a pas été remarqué chez *A. mylitta*.

Etendue de la transmission transovarienne :

Les observations (Tableau III) montrent que seulement 85,33 % des vers ont été infectés par *Nosema* sp. dans les lots obtenus des mères faiblement infectées alors qu'on obtient 92,67 et 98,76 % d'infection pour les lots obtenus des mères moyennement et fortement infectées respectivement.

Différents degrés d'infection sont obtenus parmi les progénitures d'une même mère. Le degré d'infection est maximum chez les progénitures des mères fortement infectées et minimum chez les progénitures des mères faiblement infectées. Il apparaît clairement que l'étendue et l'intensité de l'infection chez les progénitures sont directement liées à l'importance de l'infection du papillon mère. Ceci est tout à fait conforme avec les découvertes de Siegel et coll.(1986) qui ont conclu que le niveau d'infection à un stade particulier devrait déterminer le niveau d'infection dû à la transmission transovarienne dans la génération suivante.

CONCLUSION

L'étude indique clairement que le papillon mâle ne peut transmettre la maladie à ses progénitures. D'autre part, la contrepartie femelle peut transmettre la maladie avec environ 85-98 % d'efficacité selon l'intensité de l'infection. Ces découvertes suppriment donc la crainte d'infection par la pébrine provenant des accouplements extérieurs des papillons femelles avec des mâles sauvages auxquels on a quelquefois recours pour le rajeunissement et pour obtenir un meilleur pourcentage d'accouplement.

STUDIES ON THE CROSS INFECTION OF *BOMBYX MORI* L. AND *PHILOSAMIA RICINI* H. LARVAE WITH THE *NOSEMA* SP. INFECTING *ANTHERAEA MYLITTA* D.

U. P. GRIYAGHEY & K. SENGUPTA

Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi-834005, Bihar, India.

In many areas of India, Tasar silkworm, Antheraea mylitta D., mulberry silkworm, Bombyx mori L. and Eri silkworm Philosamia ricini H. are concurrently reared. Each of them suffered from a disease commonly known as pebrine caused by some protozoan (genus : Nosema, Order : Microsporidia). It was of interest to know if the Nosema sp. infecting the three silkworms was the same and their status with regard to host specificity and cross infectivity identical. The first study conducted on the cross-infection of B. mori and P. ricini larvae with the Nosema sp. infecting A. mylitta showed exclusive negative results indicating the Nosema sp. infecting the Tasar silkworm different from other two and host-specific.

Keywords : Cross infection, host specificity, phylogenetic group, cytoplasmic polyhedrosis, species resistance, infective agent.

INTRODUCTION

The existence of more than one species in the same habitat and the presence of disease in any one of them may lead to the chances of cross-infection. But often this does not occur. Normally within each of the phylogenetic group a general lack of susceptibility is exhibited by the members of each of the groups to the microorganisms affecting the members of the other group. In a few instances cross-infections do occur in nature, but they are relatively few until one deals with animals of closely related categories. The parasites are generally very specific about their host. The insusceptibility of mammals other than man to infection with *Mycobacterium leprae* Hansen is an example of species immunity. In insects also, *B. mori* is not susceptible to *per os* infection with polyhedra of *Lymantria monacha*.

According to Bergold (1958) each species of insect virus has its specific host. However, Smith (1953) and Smith and Xeros (1952, 1953 a & b) studied cross infection tests with about 30 species of insects and they reported relatively easy success in obtaining positive results with nuclear and cytoplasmic polyhedrosis viruses. However, *B. mori* is not susceptible to the nuclear polyhedrosis viruses of *Prothetia dispar*, *Telea polyphemus*, *Sphinx ligustri*, *Samia ricini* and *Pauaxia dominula*. The species resistance is not confined to virus infection but has also been noted with certain protozoa, fungus and bacterial infection. The present study was taken up to find out the possibility of cross-infection of *B. mori* and *P. ricini* larvae with the *Nosema* sp. infecting *A. mylitta* D.

MATERIALS AND METHODS

Disease free layings of *B. mori* (Nistari) and *P. ricini* were used in the experiment. Spores of *Nosema* sp. were extracted from *A. mylitta* larvae. The spores were diluted to 8×10^8 spores/100 ml. concentration. Mulberry and castor leaves were smeared with the spores of *Nosema* sp. extracted as

Table I. Cross-infection studies with *Nosema* sp. of *Antheraea mylitta* to *Bombyx mori*.Tableau I. Etudes des infections croisées de *Antheraea mylitta* à *Bombyx mori* par *Nosema* sp.

Experiment <i>Expérience</i>	Nb. of worms treated, control <i>Nb. de larves témoins</i>	<u>Disease mortality</u>		Effective rate of rearing <i>Taux effectif d'élevage</i>	<u>Cocoon characters</u>		Fecundity <i>Fécondité</i>	<u>Moth Examination</u>		
		Pebrine	Other		C. wt.	S.R.		Pebrine	Other	Nil
		<i>Mortalité par maladie Pébrine</i>	<i>Mortalité par maladie Autres</i>		<i>Caractères des cocons Poids du cocon</i>	<i>Caractères des cocons Richesse soyeuse</i>		<i>Examen des papillons Pébrine</i>	<i>Examen des papillons Autres</i>	<i>Examen des papillons Néant</i>
		(%)	(%)	(%)	(g)	(%)		(%)	(%)	(%)
Treated lot (1 st crop) <i>Lot traité (1^{ère} récolte)</i>	445	-	7.4	92.6	1.026	10.52	394	-	8.4	91.6
Control I (untreated lot) 1 st crop <i>Témoin I (lot non traité) 1^{ère} récolte</i>	50	-	2.0	96.0	1.019	9.91	355	-	2.1	97.9
Control II (Treated lot of <i>A. mylitta</i>) <i>Témoin II (lot traité de A. mylitta)</i>	500	83.8	4.2	12.0	11.74	10.05	184	100.0	-	-
Treated lot (2 nd crop) <i>Lot traité (2^{ème} récolte)</i>	500	-	12.2	87.8	1.033	10.71	391	-	11.5	88.5
Control I (untreated lot) 2 nd crop <i>Témoin I (lot non traité) 2^{ème} récolte</i>	200	-	8.0	92.0	1.04	10.09	406	-	3.3	96.7
Control II (Treated lot of <i>A. mylitta</i>) <i>Témoin II (Lot traité de A. mylitta)</i>	500	76.2	9.0	14.8	11.24	10.05	207	100.0	-	-

Table II. Cross-infection studies with *Nosema* sp. of *Antheraea mylitta* to *P. ricini*Tableau II. Etudes des infections croisées de *Antheraea mylitta* à *P. ricini* par *Nosema* sp.

Experiment <i>Expérience</i>	Nb. of worms treated, control <i>Nb. de larves témoins</i>	<u>Disease mortality</u> <i>Mortalité par maladie</i>		Effective rate of rearing <i>Taux effectif d'élevage</i>	<u>Cocoon characters</u> <i>Caractères des cocons</i>		Fecundity <i>Fécondité</i>	<u>Moth Examination</u> <i>Examen des papillons</i>		
		Pebrine <i>Pébrine</i>	Other <i>Autres</i>		C. wt. <i>Poids du cocon</i>	S.R. <i>Richesse soyeuse</i>		Pebrine <i>Pébrine</i>	Other <i>Autres</i>	Nil <i>Néant</i>
		(%)	(%)	(%)	(g)	(%)		(%)	(%)	(%)
Treated lot (1 st crop) <i>Lot traité (1^{ère} récolte)</i>	300	-	18.3	81.7	2.95	13.55	365	-	10.2	89.8
Control I (untreated lot) 1 st crop <i>Témoin I (lot non traité) 1^{ère} récolte</i>	300	-	12.0	88.0	3.07	15.96	373	-	7.0	93.0
Control II (Treated lot of <i>A. mylitta</i>) <i>Témoin II (lot traité de A. mylitta)</i>	500	83.8	4.2	12.0	11.74	10.05	184	100.0	-	-
Treated lot (2 nd crop) <i>Lot traité (2^{ème} récolte)</i>	500	-	23.0	77.0	3.02	14.56	343	-	12.0	88.0
Control I (untreated lot) 2 nd crop <i>Témoin I (lot non traité) 2^{ème} récolte</i>	500	-	15.2	84.8	3.1	15.16	355	-	3.0	97.0
Control II (treated lot of <i>A. mylitta</i>) <i>Témoin II (lot traité de A. mylitta)</i>	500	76.2	9.0	14.8	11.24	10.05	207	100.0	-	-

above and fed to the larvae of *B. mori* and *P. ricini* respectively. The spores were fed at II, III and IV instars of the silkworm, 24 hours after passing of the moult. Separate untreated controls were also maintained for comparison. Dead worms were regularly examined. After pupation, the materials were allowed to emerge and microscopic examination of each of the moths was conducted. The co-rearings were conducted for two continuous generations.

RESULTS AND DISCUSSION

The data presented in Table I & II, indicate absolutely no mortality due to microsporidiosis in the lots which were fed with *Nosema* sp. spores from *A. mylitta* along with their food. In that respect they have behaved just like their untreated controls in case of *B. mori* as well as *P. ricini*. However, when the same quantity (8×10^8 spores/100 ml. concentration) of the *Nosema* sp. spores were fed to the larvae of *A. mylitta*, 76.2 to 83.8% mortality due to the disease was recorded.

No symptom of the microsporidian disease was observed at any of the developmental stages. Characters like cocoon weight, shell ratio, emergence percentage and fecundity in the treated lots were also at par with their untreated controls. In the emerged moths also, no infection of *Nosema* sp. was observed. The data thus reveal that the microsporidian failed to establish and multiply in the new host. Thus, it is clear that cross infection by *Nosema* sp. of *A. mylitta* to *B. mori* and *P. ricini* does not take place.

Further, it has also been observed that the spore size of *Nosema* sp. infecting *A. mylitta* is bigger (5.8 ± 1.16 by 2.32 ± 0.04 micron) in comparison to *Nosema bombycis* (3 - 4 microns by $1.5 - 2$ microns) and *Nosema* sp. (3 - 3.5 microns by $2 - 2.2$ microns) infecting *Philosamia ricini*. The polar filament in case of *Nosema* sp. of *P. ricini* is also comparatively shorter and thicker and has a knob at the anterior end.

The results are quite in agreement with the findings of Talukdar (1961), who observed that cross infectivity by the *Nosema* sp. of *P. ricini* to *B. mori* was not possible. Furthermore, it also agrees with the observations of Steinhaus (1949) who is of the opinion that cross infectivity is relatively rare unless one deals with the animal coming in the same minor taxonomic categories. This has also been substantiated by Vaughn (1974) who says that the microorganisms (viruses) will replicate in insects belonging to the same genus and in a few insects belonging to other genera within the same family, but seldom to insects belonging to another family. In other words the pathogen is very much host specific. Identical observations were also made by Jouvenaz and Lofgren (1984) who found that the microsporidium *Burenella dimorpha* was host specific to *Solenopsis geminata*.

The causes for the species immunity have been referred by Boyd (1970) to the chemical relationship between the tissue and the microorganism. If there is no affinity between the infective agent and the cells of the body, the animal will possess perfect immunity against that particular infection. The study has been of economic significance since in many areas of this country these three species of sericigenous insects are reared concurrently and it is essential to know the position with regard to their cross-infectivity.

REFERENCES

- BERGOLD G. H. (1958), Viruses of insects. In "Handbuch der Virus Forschung". (C. Hallauer and K.F. Meyer, eds.) Springer, Vienna, Vol. 4, 60-142.
- BOYD W. (1970), Immunity and hyper-sensitivity. In "A Text Book of Pathology", 142-184.
- JOUVENAZ D. P., LOFGREN C. S. (1984), Host specificity of *Burenella dimorpha* (Microspora: Microsporida). J. Invertebr. Pathol., 43, 441-442.
- SMITH K. M. (1953), The Polyhedral Viruses, Ser. Progr., 163, 411-417.
- SMITH K. M., XEROS N. (1952), Transmission of polyhedral viruses between different insect species. Nature, 170, 492.
- SMITH K. M., XEROS N. (1953), (a), Studies on the cross transmission of polyhedral viruses, Experiments with a new virus from *Pyrameis cardui*, the painted lady butterfly, Parasitology, 43, 178-185.

- SMITH K. M., XEROS N. (1953), (b), Cross inoculation studies with polyhedral viruses. Symposium interactions of viruses and cells, Rome, 81-96.
- STEINHAUS E. A. (1949), Principles of Insect Pathology, Mc Graw Hill Publication, 191 pp.
- TALUKDAR J. N. (1961), Further Report on the pebrine germ of *Philosamia ricini* Hutt. and its infective capacity on *Bombyx mori* Lin Curr. Sci, 30, 28-29.
- VAUGHN J. L. (1974), Virus and Rickettrial diseases in "Insect Disease". (G.E. Cantwell ed.) Vol. I, 49-85.

ETUDES DE L'INFECTION CROISEE DES LARVES DE *BOMBYX MORI* L. ET *PHILOSAMIA RICINI* H. PAR *NOSEMA* S.P. INFESTANT *ANTHERAEA MYLITTA* D.

U.P. GRIYAGHEY et K. SENGUPTA

Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi 834-005, Bihar, Inde.

Dans de nombreuses régions d'Inde, le ver à soie Tasar *Antheraea mylitta* D., le ver à soie du mûrier *Bombyx mori* L. et le ver à soie Eri *Philosamia ricini* H. sont élevés simultanément. Chacun d'eux a souffert d'une maladie appelée communément pébrine provoquée par certains protozoaires (genre : *Nosema*, ordre : *Microsporidiés*). Il était intéressant de savoir si le *Nosema* sp. infectant ces trois vers à soie était le même et si sa position par rapport à la spécificité de l'hôte et l'infectivité croisée était identique. La première étude réalisée sur l'infection croisée des larves de *B. mori* et *P. ricini* avec le *Nosema* sp. infectant *A. mylitta* a donné des résultats exclusivement négatifs indiquant que le *Nosema* sp. infectant le ver à soie Tasar était spécifique de l'hôte.

INTRODUCTION

L'existence de plus d'une espèce dans le même habitat et la présence de la maladie chez chacune d'elles peut conduire à une infestation croisée. Mais la plupart du temps cela n'arrive pas. Normalement à l'intérieur de chaque groupe phylogénétique, une absence générale de sensibilité est affichée par les membres de chaque groupe vis-à-vis des microorganismes touchant les membres de l'autre groupe. Parfois des infections croisées se produisent dans la nature mais elles sont relativement peu nombreuses tant qu'un individu n'entre pas en contact avec les animaux de catégories apparentées. Les parasites sont généralement très spécifiques pour leur hôte. La non-sensibilité des mammifères, autres que l'homme, à l'infection par *Mycobacterium Leprae* Hansen est un exemple d'immunité spécifique. Parmi les insectes aussi, *B. mori* n'est pas sensible à l'infection *per os* par le polyèdre de *Lymantria monacha*. Selon Bergold (1958), chaque espèce de virus d'insecte a son hôte spécifique. Cependant, Smith (1953) et Smith et Xéros (1952, 1953 a et b) ont étudié l'infection croisée avec environ 30 espèces d'insectes et ils ont facilement réussi à obtenir des résultats positifs avec des virus de la polyédrose nucléaire et de la polyédrose cytoplasmique. Cependant, *B. mori* est insensible aux virus de la polyédrose nucléaire de *Prothetria dispar*, *Telea polyphemus*, *Sphinx ligustri*, *Samia ricini* et *Pauuxia dominula*. La résistance des espèces n'est pas limitée à l'infection par les virus mais concerne également certains protozoaires, champignons et bactéries. La présente étude a été entreprise pour découvrir la possibilité d'une infection croisée des larves de *B. mori* et *P. ricini* avec le *Nosema* sp. infectant *A. mylitta* D.

MATERIELS ET METHODES

Des pontes saines de *B. mori* (Nistari) et *P. ricini* ont été utilisées dans l'expérience. Des spores de *Nosema* sp. ont été extraites des larves de *A. mylitta*. Les spores ont été diluées à une concentration de 8×10^8 spores / 100 ml. Les feuilles de mûrier et de ricin ont été enduites de spores de *Nosema* sp. extraites comme mentionné ci-dessus et données en nourriture aux larves de *B. mori* et *P. ricini* respectivement. Les spores ont été fournies aux vers à soie des 2^e, 3^e et 4^e âges, 24 heures après la mue. Des témoins non traités ont été élevés à titre de comparaison. Les vers morts ont été régulièrement examinés. Après la nymphose, les sujets ont pu émerger et un examen microscopique

de chaque papillon a été réalisé. Les élevages simultanés ont été conduits sur deux générations consécutives.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données présentées dans les tableaux I et II indiquent qu'aucun décès n'est dû à la présence de microsporidiose dans les lots qui ont été nourris avec les spores de *Nosema* sp. de *A. mylitta* présentes dans leur nourriture. A cet égard ils se sont comportés comme les témoins non traités pour *B. mori* et *P. ricini*. Cependant, quand les mêmes quantités (8×10^8 spores / 100 ml de concentration) de spores de *Nosema* sp. ont été données aux larves de *A. mylitta*, une mortalité s'échelonnant de 76,2 à 83,8 % due à la maladie a été enregistrée.

Aucun symptôme de maladie microsporidienne n'a été observé aux différents stades de développement. Des caractères tels que le poids du cocon, la richesse soyeuse, le pourcentage d'émergence et la fécondité ont la même valeur dans les lots traités que chez les témoins non traités. Parmi les papillons émergés aucune infection de *Nosema* sp. n'a été observée. Les données révèlent donc que le microsporidien n'a pas réussi à s'établir et à se multiplier dans le nouvel hôte. Il est clair que l'infection croisée par *Nosema* sp. de *A. mylitta* chez *B. mori* et *P. ricini* ne s'est pas réalisée. De plus, on a pu observer que la taille de la spore de *Nosema* sp. infectant *A. Mylitta* est plus grande ($5,8 \pm 1,16$ par $2,32 \pm 0,04$ micron) que celles de *Nosema bombycis* (3-4 microns par 1,5-2 microns) et de *Nosema* sp. infectant *Philosamia ricini* (3-3,5 microns par 2-2,2 microns). Dans le cas de *Nosema* sp. de *P. ricini*, le filament polaire est aussi comparativement plus court et plus épais et a une protubérance à l'extrémité antérieure. Les résultats s'accordent complètement avec les découvertes de Talukdar (1961) qui a observé que l'infection de *B. mori* par *Nosema* sp. de *P. ricini* n'était pas possible. De plus, ils s'accordent également avec les observations de Steinhaus (1949) qui pense que l'infection croisée est relativement rare à moins qu'il s'agisse d'un animal qui rentre dans les mêmes catégories taxonomiques mineures. Ceci a également été établi par Vaughn (1974) qui déclare que les microorganismes (virus) se reproduiront chez les insectes appartenant au même genre et chez quelques insectes appartenant à d'autres genres à l'intérieur de la même famille, mais rarement chez des insectes appartenant à une autre famille. En d'autres termes, l'agent pathogène est vraiment spécifique de l'hôte. Des observations identiques ont aussi été faites par Jouvenaz et Lofgren (1984) qui ont découvert que le microsporidium *Burenella dimorpha* était spécifique de l'hôte *Solenopsis geminata*. Les causes de l'immunité des espèces ont été attribuées par Boyd (1970) aux relations chimiques entre le tissu et le microorganisme. S'il n'y a pas d'affinité entre l'agent d'infection et les cellules du corps, l'animal aura une immunité parfaite contre cette infection particulière. Cette étude a eu une importance économique puisque dans beaucoup de régions de ce pays, ces trois espèces d'insectes séricigènes sont élevées simultanément et il est essentiel de connaître leur position par rapport à l'infection croisée.

STUDIES ON THE EFFECT OF SOME STRESS CONDITIONS ON THE INCIDENCE OF DISEASES IN TASAR SILKWORM, *ANTHERAEA MYLITTA* D.

U.P. GRIYAGHEY & K. SENGUPTA

Central Tasar Research & Training Institute, Ranchi 834-005 (Bihar), India.

*First to fifth instar larvae of *Antheraea mylitta* D. were exposed to high temperature and high humidity and fasting stress conditions ranging from 24 to 72 hours and 8 to 40 hours respectively and their effects studied in relation to the incidence of various diseases and total mortality. Exposure to high temperature and high humidity led to a higher mortality from viral and bacterial infections, being directly correlated to the duration of exposure and stage of the larvae. With regard to the effect of starvation, mortality during the last three stages was the same but the shock was found to be more drastic in case of early stage treatments leading in most cases to total mortality.*

Keywords : Stress conditions, disease incidence, high temperature and humidity, starvation, predisposing factors, synergistic effect.

INTRODUCTION

Tasar which is one of the important insect silk fauna belongs to the family Saturniidae and genus *Antheraea*. It includes the species of *Antheraea* like *mylitta*, *pernyi*, *assama* and *yamamai*. The tropical Tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D. is an economically important sericigenous insect which is under intensive commercial exploitation in the plateau of Central India. This Tasar silkworm which is semi-domesticated in nature is reared outdoors since immemorial times by the tribes inhabiting the area. The rearing demands utmost patience and vigilance on the part of the rearers.

Stress conditions like exposure to high temperature and humidity, lack of nutrition including fasting have been known to cause many direct and indirect injuries in insects (Hopf, 1940 ; Frankeil and Hopf, 1940 ; Jefferson, 1945) including synergistic effect leading to predisposition to diseases (Vago and Cayrol, 1955). Steinhaus (1963) emphasized the significance of predisposing causes and the importance of the environment including certain stressors, in the pathogen - host - environment triad involved in the diseases of insects. During the rearing of Tasar worms, which is an outdoor rearing, temperature often shoots up. Non-availability of food at times is also not uncommon. As such, it was considered worthwhile to undertake a study on the effect of such exposures in relation to disease mortality and death. In the present study, three factors, namely temperature, relative humidity and starvation have been considered.

MATERIALS AND METHODS

Larvae of *Antheraea mylitta* of different instars were subjected to 35°C temperature and 96 % R.H. just after hatching/moulting in a humidity oven for 24, 48 and 72 hours. Each of the treatments was replicated three times. After the treatment, the larvae were reared on *Terminalia arjuna* food plants. For studying the effect of starvation on the incidence of diseases, the larvae were starved just after hatching/moulting by putting them on bushes without foliage for 8, 16, 24, 32, and 40 hours respectively at each instar and were replicated four times.

RESULTS AND DISCUSSION

The data showing the effect of high temperature and humidity are presented in Table I. The results indicate that high temperature accompanied by high humidity induced multiplication of the diseases in all the treatmental durations. The effect was, however, less pronounced in the lots treated during early larval instars in comparison to late instar larvae.

Table I. Effect of high temperature and relative humidity on the larvae of *A. mylitta* D.

Tableau I. Effet de la haute température et de l'humidité relative sur les larves de *A. mylitta* D.

Stage of worms Age larvaire	Duration of treatment (hrs) Durée du traitement (h)	Disease mortality (%) Mortalité par maladie (%)				Effective rate of rearing Taux effectif d'élevage
		Virale	Bactérienne	Fongique	Autres	
I	24	31.2	15.2	1.2	4.0	48.4
	48	36.0	15.4	1.8	3.4	43.4
	72	39.4	18.0	1.4	3.2	38.0
	Control Témoin	27.6	12.4	1.4	4.6	54.0
II	24	38.4	13.8	2.0	3.2	42.6
	48	41.6	15.8	1.0	2.0	39.6
	72	46.2	20.2	0.8	0.8	32.0
	Control Témoin	23.8	10.6	1.2	2.2	62.2
III	24	44.2	12.8	1.4	2.0	34.6
	48	47.0	19.0	0.6	3.2	30.2
	72	51.6	23.0	1.0	1.8	22.6
	Control Témoin	19.8	10.2	0.8	3.0	66.2
IV	24	47.8	15.6	0.4	3.6	32.6
	48	50.0	22.6	0.6	2.6	24.8
	72	56.4	24.0	0.4	1.0	18.2
	Control Témoin	16.4	8.0	-	2.8	72.8
V	24	50.8	17.0	-	2.4	29.8
	48	54.2	24.8	-	2.0	19.0
	72	61.4	26.0	-	1.4	11.2
	Control Témoin	11.6	5.6	-	3.6	79.2

The treatments predisposed more effectively with the gradual increase in the age of the larvae and duration of the treatment. This is quite evident from the fact that minimum loss (31.2 % virosis and 15.2 % bacteriosis in comparison to 27.6 % and 12.4 % respectively in control) has been observed in case where I instar larvae were treated for 24 hours, whereas maximum disease mortality (61.4 %

virosis and 26.0 % bacteriosis in comparison to 11.6 % and 5.6 % respectively in control) has been observed in case where final instar larvae were treated for 72 hours.

Table II. Effect of starvation on *A. mylitta* worms.

Tableau II. Effet du jeûne sur les vers de *A. mylitta*.

Stage of worms <i>Age larvaire</i>	Starvation period (hrs) <i>Durée du jeûne (h)</i>	Disease mortality (%) <i>Mortalité par maladie (%)</i>			Effective rate of rearing <i>Taux effectif d'élevage</i>
		Viral <i>Virale</i>	Bacterial <i>Bactérienne</i>	Others <i>Autres</i>	
I	8	41.5	16.0	19.0	23.5
	16	50.0	24.5	53.5	2.0
	24	58.5	28.0	13.5	-
	32	51.0	30.0	19.0	-
	40	64.5	30.0	3.5	-
	Control <i>Témoin</i>	14.0	13.5	24.0	49.5
II	8	37.5	19.5	17.0	26.0
	16	40.0	23.0	23.5	13.5
	24	42.5	26.0	31.5	-
	32	47.0	21.5	31.5	-
	40	40.5	23.0	36.5	-
	Control <i>Témoin</i>	13.5	16.0	9.5	58.0
III	8	40.5	20.0	7.5	32.5
	16	51.0	24.5	6.5	18.0
	24	60.0	26.0	8.0	6.0
	32	64.0	25.5	10.5	-
	40	63.0	22.0	15.0	-
	Control <i>Témoin</i>	16.5	14.5	3.5	65.5
IV	8	48.0	18.0	1.0	33.0
	16	58.5	19.5	1.0	21.0
	24	70.0	20.0	2.0	8.0
	32	77.0	20.5	-	-
	40	80.0	19.5	0.5	-
	Control <i>Témoin</i>	16.0	11.5	2.0	70.5
V	8	38.0	14.5	1.5	46.0
	16	46.0	19.0	0.5	34.5
	24	52.5	21.0	6.0	20.5
	32	72.0	21.5	2.5	4.0
	40	75.5	19.0	5.5	-
	Control <i>Témoin</i>	11.5	6.0	1.5	81.0

The results obtained are quite in conformity with the findings of Vago (1956) who stated that in *Bombyx mori* L., the thermal shock of only 30°C even if it is for shorter duration causes rapid

multiplication of the disease. Increased mortality due to nuclear polyhedrosis has been recorded by Vago (1951) and Vago and Cayrol (1955) in *Plusia gamma* subjected to a relative humidity of 95 % and *Protheria dispar* under both natural and experimental conditions of high humidity. Further researches (Vago, 1960) have shown that high temperature and humidity results in respiratory troubles and slackening of the functioning of alimentary canal leading to rapid multiplication of the pathogen.

Effects of starvation :

The results to show the effect of starvation have been given in Table II. The results clearly indicate that the starvation of the larvae helps in inducing the disease and the effect is more pronounced when the worms are starved beyond sixteen hours. It is further observed that the larvae in the early stage, when starved become more prone to the diseases than the advanced stage worms. A minute observation of the larvae indicates that with the starvation, the larvae become sluggish, which has also been observed by Wellington (1957) in case of *Malacosoma pulviale* Dayar. The disease mortality in case of starved larvae have ranged between 52.5 % (38.0 % virosis and 14.5 % bacteriosis) in V instar larvae starved for 8 hours to 94.5 % (64.5 % virosis and 30 % bacteriosis) in I instar larvae starved for 40 hours, whereas in control it has ranged between 17.5 % (11.5 % virosis and 6.0 % bacteriosis) in V instar larvae to 27.5 % (14.0 % virosis & 13.5 % bacteriosis) in I instar larvae. The high mortality brought about by starvation is mainly due to gross histopathological and physiochemical conditions which are detrimental to the health of the insect. It causes dysfunction of digestion followed by abnormal growth of the pathogen and the excessive use of the reserved nutrients lead to the death of the insect (Steinhaus, 1949).

CONCLUSION

It is thus clear from the studies that high temperature accompanied by high humidity excites the multiplication of the pathogens. As such, rearing under such conditions should be avoided. Furthermore, starvation of the larvae results in high disease mortality. Therefore, it is suggested that the larvae, particularly after hatching/moulting should not be starved.

REFERENCES

- FRANKEIL G., HOPF H.S. (1940), The physiological action of abnormally high temperature on poikilothermic animals 1. Biochem J., 34, 1085-1092.
- HOPF H.S. (1940), The physiological action of abnormally high temperature on poikilothermic animals 3. Biochem. J., 34, 1396-1403.
- JEFFERSON G.T. (1945), Heat injury in insects. Nature, 156, 111-112.
- STEINHAUS E. A. (1949), Principles of Insect Pathology. 1st ed. McGraw Hills, New York 757 pp.
- STEINHAUS E.A. (1963), Insect Pathology an advanced treatise. Vol. 1, Academic press, New York/London, 661 pp.
- VAGO C. (1951), Phénomène de "Latentia" dans une maladie à ultravirus des insectes. Rev. can. biol., 10, 299-308.
- VAGO C. (1956), L'enchaînement des maladies chez les insectes. Ed., spec. Comm. séricicole Intern. 58 pp.
- VAGO C. (1960), Le problème de la flacherie en pathologie comparée. 11th conf. intern. tech. séricic., Murcie, Spain.
- VAGO C., VAYROL A. (1955), Une virose à polyèdres de la noctuelle *Plusia gamma* L. (Lepidoptera). Ann. Inst. Nat. Recherche Agron., Ser. A4, 421-432.

ETUDES DE L'EFFET DE CERTAINES CONDITIONS STRESSANTES SUR L'INCIDENCE DES MALADIES CHEZ LE VER A SOIE TASAR *ANTHERAEA MYLITTA* D.

U.P. GRIYAGHEY et K. SENGUPTA

Central Tasar Research and Training Institute, Ranchi 834-005 (Bihar), Inde.

Les larves d'Antheraea mylitta D. du premier au cinquième âge ont été exposées à une haute température, à une humidité importante et à des conditions stressantes de jeûne s'étalant de 24 à 72 heures et de 8 à 40 heures respectivement. Les effets ont été étudiés en relation avec l'incidence de différentes maladies et la mortalité. L'exposition à une température élevée et à une forte humidité conduit à une mortalité plus élevée due aux infections virales et bactériennes et ceci en relation directe avec la durée d'exposition et le stade larvaire. Par rapport à l'effet du jeûne, la mortalité durant les trois derniers stades est la même mais l'impact est plus important pour les traitements aux stades précoces conduisant dans la plupart des cas à une mortalité totale.

INTRODUCTION

Le Tasar est l'un des insectes séricicoles importants appartenant à la famille des Saturniidés et au genre *Antheraea*. Il comprend les espèces d'*Antheraea* telles que *mylitta*, *pernyi*, *assama* et *yamamai*. Le ver à soie tasar tropical *Antheraea mylitta* D. est un insecte séricigène économiquement important qui est très exploité commercialement sur la plateau de l'Inde Centrale. Ce ver à soie Tasar qui est semi-domestiqué est élevé en plein air depuis des temps immémoriaux par les tribus habitant la région. L'élevage demande beaucoup de patience et de vigilance de la part des éleveurs.

Des conditions stressantes telles que l'exposition à une forte température et à une forte humidité, le manque de nourriture y compris le jeûne ont causé de nombreux dommages directs et indirects chez les insectes (Hopf, 1940 ; Frankeil et Hopf, 1940 ; Jefferson, 1945) dont l'effet synergétique conduit à une prédisposition aux maladies (Vago et Cayrol, 1955). Steinhaus (1963) mit en évidence les causes de prédisposition aux maladies et l'importance de facteurs stressants dans la triade environnement-hôte-pathogène. Pendant l'élevage des vers Tasar, qui est un élevage en plein air, la température augmente souvent brutalement. L'absence de nourriture par moment est également courante. Ainsi, il est apparu intéressant d'entreprendre une étude sur l'effet de telles conditions en relation avec la mortalité par maladie et la mort. Dans cette étude, trois facteurs, à savoir la température, l'humidité relative et le jeûne ont été pris en considération.

MATERIELS ET METHODES

Les larves d'*Antheraea mylitta* de différents âges ont été soumises à une température de 35°C et à une humidité relative de 96 % juste après l'éclosion ou la mue dans une enceinte pendant 24, 48 et 72 heures. Chacun des traitements a été répété 3 fois. Après le traitement, les larves ont été nourries avec des plantes *Terminalia arjuna*. Pour étudier l'effet du jeûne sur l'incidence des maladies, les larves ont été privées de nourriture juste après l'éclosion ou la mue en les déposant sur des arbustes dépourvus de feuillage pendant 8, 16, 24, 32, et 40 heures pour chaque âge respectif et cette opération a été répétée 4 fois.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données montrant l'effet d'une haute température et d'une importante humidité sont présentées dans le tableau I. Les résultats indiquent qu'une température élevée ajoutée à une humidité importante entraîne une multiplication des maladies pour toutes les durées de traitement. Cependant, l'effet est moins prononcé dans les lots traités pendant les âges larvaires précoces en comparaison avec les âges larvaires tardifs.

Les traitements prédisposent plus fortement quand l'âge larvaire et la durée du traitement augmentent. Ceci est évident car une perte minimale (31,2 % de viroses et 15,2 % bactérioses en comparaison avec 27,6 % et 12,4 % respectivement pour le témoin) a été observée dans le cas où les premiers âges larvaires ont été traités pendant 24 heures, alors qu'une mortalité maximale par maladie (61,4 % viroses et 26,0 % bactérioses en comparaison avec 11,6 % et 5,6 % respectivement pour le témoin) a été observée dans le cas où les derniers âges larvaires ont été traités pendant 72 heures.

Les résultats obtenus sont tout à fait conformes aux découvertes de Vago (1956) qui établit que, pour *Bombyx mori* L., un choc thermique de seulement 30°C même pour une durée plus limitée entraîne une multiplication rapide de la maladie. Une mortalité accrue due à une polyédrose nucléaire a été mentionnée par Vago (1951) et par Vago et Cayral (1955) chez *Plusia gamma* soumis à une humidité relative de 95 % et chez *Prothetia dispar* soumis à des conditions naturelles et expérimentales de forte humidité. Des recherches ultérieures (Vago, 1960) ont montré que les conséquences d'une forte température et d'une forte humidité sur les troubles respiratoires et sur le ralentissement du fonctionnement du tube digestif conduisent à une multiplication rapide de l'agent pathogène.

Effet du jeûne:

Les résultats concernant l'effet du jeûne sont donnés dans le tableau II. Les résultats indiquent clairement que le jeûne des larves contribue à engendrer la maladie, l'effet étant plus prononcé quand les vers ne sont pas nourris pendant plus de 16 heures. Il est mentionné aussi que les larves qui sont privées de nourriture à un stade précoce sont plus prédisposées aux maladies que celles des stades larvaires avancés. Une observation minutieuse des larves indique qu'avec le jeûne, les larves deviennent paresseuses, observation qui a également été faite par Wellington (1957) chez *Malacosoma pulviale* Dayar. La mortalité par maladie pour les larves privées de nourriture varie de 52,5 % (38,0 % viroses et 14,5 % bactérioses) pour celles du cinquième âge larvaire privées de nourriture pendant 8 heures à 94,5 % (64,5 % viroses et 30,0 % bactérioses) pour celles du premier âge larvaire affamées pendant 40 heures, alors que chez les témoins elle varie de 17,5 % (11,5 % viroses et 6,0 % bactérioses) pour le cinquième âge larvaire à 27,5 % (14,0 % viroses et 13,5 % bactérioses) pour le premier âge larvaire. La forte mortalité occasionnée par le jeûne est principalement due aux conditions histopathologiques et physiochimiques qui sont préjudiciables à la santé de l'insecte. Le jeûne provoque le dysfonctionnement de la digestion suivi d'une croissance anormale de l'agent pathogène et l'utilisation excessive des réserves conduit à la mort de l'insecte. (Steinhaus, 1949).

CONCLUSION

Il est donc clair, d'après ces études, qu'une haute température associée à une forte humidité provoque la multiplication des agents pathogènes. L'élevage dans de telles conditions devrait donc être évité. De plus, le jeûne des larves se traduit par une forte mortalité par maladie. En conséquence, il est suggéré que les larves, surtout après l'éclosion et la mue, ne devraient pas être affamées.

REVUE SIGNALETIQUE

BIBLIOGRAPHY

INDICATIFS DES LANGUES UTILISEES

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 to indicate the language of the summary.

Sériciculture générale

General sericulture

La route de la soie.

The silk road.

BOULENOIS L.

1986 Ed. Olizane, Genève, 350 p. (F)

La soie.

Silk.

C.C.I.

1988 Centre du Commerce International, CNUCED/GATT.

La micro-irrigation dans le monde.

Micro-irrigation in the world.

DECROIX M.

1988 Coll. "Guide Pratique" Cemagref Dicova, 208 p. (F)

La route de la soie.

The silk road.

DREGE J-P.

1986 La Bibliothèque des Arts, 290 p. (F)

Marco Polo et la route de la soie.

Marco Polo and the silk road.

DREGE J-P.

1989 Ed. Découvertes Gallimard, histoire, 192 p. (F)

Studies on the rearing and silk production of the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. in tamil nadu state India.

Etudes sur l'élevage et la production de soie du ver à soie *Bombyx mori* L. dans l'état du Tamil nadu, Inde.

RADHAKRISHNAN S.

Department of Botany, Bharathidasan University, Tiruchirapalli 620 024, Tamil nadu, India.

1989 Ph.D. thesis, Dept. Bot., Bharathidasan Univ., India, p 300. (E)

Mûrier

Mulberry

Mulberry germplasm resistance to bacterial blight (*Pseudomonas syringae* pv. *mori*) in Pakistan.

Résistance d'une population de mûriers à la rouille bactérienne (*Pseudomonas syringae* pv. *mori*) au Pakistan.

AKHTAR M.A., SARWAR M.

Pakistan Agricultural Research Council, Islamabad, Pakistan.

1988 Pest Management, Vol. 34(2), 227-228. (E)

Preservation of genetic resources of mulberry by means of tissue culture.

Préservation des ressources génétiques du mûrier grâce aux cultures de tissus.

ENOMOTO S.

Department of Cell Biol., Nation. Inst. of Agrobiol. Resources, Yatabe, Ibaraki 305, Japan.

1987 J.A.R.Q., Vol. 21(3), 205-210. (E)

Absolute configuration of natural Diels Alder type adducts from the *Morus* root bark.

Configuration absolue des adduits de type Diels Alder naturels extraits de l'écorce de la racine de *Morus*.

HANO Y., SUZUKI S., NOMURAI T., IITAKA Y.

1988 Heterocycles, Vol. 27(10), 2315-2325. (E)

Control of mulberry scale with normal alkaline soap solution.

Lutte contre la teigne des mûriers avec une solution savonneuse alcaline normale.

HE C., et al.

1989 Canye Kexue, Acta Sericologica Sinica, Vol. 15(2), 107-109. (C)

Fundamental studies on effect of organic materials on chemical properties of mulberry field soil and on growth of mulberry (part 2).

Etudes fondamentales sur l'effet des matériaux organiques sur les propriétés chimiques des sols des champs de mûriers et sur la croissance du mûrier (2ème partie).

INAMATSU K., KIUCHI M.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 Bull. Seric. Exp. Sta., Vol. 30(5), 685-737. (J,e)

Colony formation in culture of mulberry mesophyll protoplast.

Formation de colonies en culture à partir de protoplastes du mésophylle de mûrier.

KATAGIRI K.

1989 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 58(3), 267-268. (J)

Varietal difference in value of leaves as food of silkworm, *Bombyx mori*, in mulberry.

Différence variétale des feuilles de mûrier en valeur alimentaire pour le ver à soie *Bombyx mori*.

KATAGIRI K., MACHII H.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 *Technical Bull. Seric. Experiment Station*, Vol. 134(8), 119-128. (J)

Breeding test of Thai mulberry varieties.

Test de culture des variétés de mûriers Thai.

KOBAYASHI S., NAKAJIMA K.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 *Acta Sericologica*, Vol. 142(9), 11-24. (J)

Biolumics of *Telenomus theophilae* Wu and Chen.

Biolumique de *Telenomus theophilae* Wu et Chen.

LIANG X., et al.

Department of Plant Protection, Zhejiang Agricultural University, China.

1989 *Canye Kexue, Acta Sericologica Sinica*, Vol. 15(2), 95-99. (C,e)

Analysis of growth characteristics and improvement of cultivation methods in the mulberry species, *Morus acidosa* Griff.

Analyses des caractéristiques de croissance et amélioration des méthodes de culture chez le mûrier, *Morus acidosa* Griff.

MACHII H.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 *Bull. of Seric. Exp. Sta.*, Vol. 30(5), 589-683. (J,e)

Isolation of total mulberry DNA.

Isolement de l'ADN total du mûrier.

MACHII H.

National Inst. of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1989 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 58 (4), 349-350. (E)

Studies on establishment of year-round pollination system by utilization of grafting in mulberry.

Etude sur l'établissement d'un système de pollinisation pendant toute l'année en utilisant le greffage chez le mûrier.

MAKI O., OKABE T.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 *Tech. Bull. of Seric. Experiment Station*, Vol. 135, 29-75. (J)

Comparison on efficiency of several mulberry shoot-reapers at different types of mulberry fields and their improvement.

Comparaison de l'efficacité entre plusieurs machines à récolter les pousses sur divers champs de mûriers et leurs améliorations.

NAOI T., KOBAYASHI T., ICHIKAWA A., OKABE T., HIGUTI T.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 *Technical Bull. Seric. Experiment Station*, Vol. 134(8), 149-172. (J)

On the protoplast fusion of mulberry and paper-mulberry by electrofusion method.

Sur la fusion du protoplasme chez le mûrier et le mûrier-papier en utilisant la méthode d'électrofusion.
OHNISHI T., TANABE K.

1989 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 58 (4), 353-354. (J)

Adventitious bud induction in leaves isolated from winter buds of mulberry.

Induction de bourgeons adventifs dans les feuilles isolées des bourgeons d'hiver du mûrier.

SAITO H., KATAGIRI K.

National Institute of Seric. and Entomological Science, Tsukuba City, Ibaraki 305, Japan.

1989 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 58(3), 197-202. (J,e)

The residual effect after large quantity application of animal waste to the mulberry field.

Effet résiduel après application d'une quantité importante de déchets organiques sur un champ de mûriers.

SHIBUYA K., INAMATSU K.

Agriculture Research Center, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1989 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 58(3), 169-174. (J,e)

Effect of the spraying of plant growth regulators on growth of mulberry tree.

Effet de la vaporisation de régulateurs de croissance des plantes sur la croissance des mûriers.

SHIRATA A., TUBOI A.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 *Tech. Bull. of Seric. Experiment Station*, Vol. 135, 1-27. (J)

Relationship between the spraying of gibberellin in autumn and the growth of mulberry tree and cold injury of shoot tip.

Rapport entre la pulvérisation de gibbérelline en automne et la croissance du mûrier et les lésions causées par le froid sur l'extrémité des tiges.

SHIRATA A., TSUBOI A.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 *Acta Sericologica*, Vol. 142(9), 1-10. (J)

A comprehensive prevention and control of mulberry yellow dwarf diseases.

Prévention et lutte contre le nanisme jaune du mûrier.

SUN S.

1989 *Canye Kexue, Acta Sericologica Sinica*, Vol. 15(2), 110-111. (C)

Physiology of ribulose biphosphate carboxylase as major leaf protein in mulberry (*Morus alba* L.).

Physiologie de la ribulose diphosphate-carboxylase comme protéine principale de la feuille chez le mûrier (*Morus alba* L.).

YAMASHITA T.

1988 *J.A.R.Q.*, 22(2), 121-127. (E)

Seasonal variations of cytokinin contents in mulberry. (2)

Variations saisonnières des contenus en cytoquinine chez le mûrier. (2)

YANAGISAWA Y., SHIOIRI H.

1989 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 58 (4), 357-358. (J)

Research of the polyploid breeding in mulberry *Morus alba* L. I. The successful breeding of the triploid plant in mulberry.

Recherche de cultures polyploïdes chez *Morus alba* L. I. Culture réussie de plants triploïdes de mûriers.

YANG D., et al.

1989 *Canye Kexue, Acta sericologica Sinica*, Vol. 15(2), 103-104. (C)

Breeding of artificial triploid in mulberry.

Culture de triploïdes artificiels du mûrier.

YANG J., YANG X.

The Sericultural Research Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, China.

1989 *Canye Kexue, Acta Sericologica Sinica*, Vol.15(2), 65-70. (C,e)

The surface ultramicrostructure of stigmas and classification of mulberries in Xinjiang autonomous region.

Ultramicrostructure de surface des stigmates et classification des mûriers dans la région autonome du Xinjiang.

YU M., et al.

1989 *Canye Kexue, Acta Sericologica Sinica*, Vol. 15(2), 104-105. (C)

Survey of weevil species in mulberry trees in Sichuan province.

Etude sur la présence de charrçons sur les mûriers de la province de Sichuan.

ZHOU W., et al.

1989 *Canye Kexue, Acta Sericologica Sinica*, Vol.15(2), 71-73. (C)

B. mori : élevage, nutrition, pathologie

B. mori : rearing, feeding, pathology

Regulation of larval development and quantitative characters of silkworm cocoon treated with bioactive substances.

Régulation du développement larvaire et caractères quantitatifs du cocon du ver à soie traité avec des substances bioactives.

AKAI H., KIMURA K., TAKABAYASHI K., KIUCHI M.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, JAPAN.

1988 Technical Bull. Seric. Experiment Station, Vol. 134(8), 25-40. (J)

Diagnosis of nuclear polyhedrosis by latex agglutination test in the silkworm, Bombyx mori.

Dépistage de la polyédrose nucléaire par le test de l'agglutination au latex chez Bombyx mori.

ARAKAWA A.

1989 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 58(3), 257-258. (J)

Studies on the effects of feeding leaves of varying maturity on the developmental stages of Bombyx mori L.

Effets du nourrissage avec des feuilles de maturité variée sur le développement de Bombyx mori.

ASKARI S., SHARAN R.K.

Department of Zoology, Patna University, Patna, India.

1982 J. Adv. Zool., Vol. 3(2), 90-94. (E)

Heat shock response in Bombyx mori cells infected by nuclear polyhedrosis virus (NPV).

Réponse au traitement thermique des cellules de Bombyx mori infectées par le virus de la polyédrose (NPV).

EVGEN'EV M.B., BRAUDE-ZOLOTAREVA T.Y. et al.

1989 Mol. Gen. Genetics, Vol. 215, 322. (E)

Effect of dietary pyridoxine content on diet efficiency of the silkworm larvae, Bombyx mori.

Effet du contenu en pyridoxine sur l'efficacité de l'aliment des larves de ver à soie Bombyx mori.

HAMANO K.

Faculty of Agriculture, Tokyo Univ. of Agric. and Tech., Fuchu, Tokyo 183, Japan.

1989 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 58(3), 245-253. (J,e)

Effect of dietary levels of proteins and pyridoxine on growth of younger larvae of the silkworm, Bombyx mori.

Effet des taux alimentaires en protéines et en pyridoxine sur la croissance des jeunes larves du ver à soie Bombyx mori.

HAMANO K., OKANO T.

Faculty of Agric., Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183, Japan.

1989 *J. Seric. Sc. Jpn.*, Vol. 58(3), 203-208. (J,e)

Breeding of a new silkworm variety "Feng 1" x "54A" for summer-autumn rearing.

Elevage d'une nouvelle variété de vers à soie "Feng 1" x "54A" pour l'élevage d'été-automne.

HE S., et al.

1989 *Canye Kexue, Acta Sericologica Sinica*, Vol. 15(2), 79-87. (C,e)

Susceptibility of the silkworm strain "Akebono" to the Bombyx mori viruses.

Sensibilité de la souche de vers à soie "Akebono" aux virus de Bombyx mori.

ICHIDA M., IZAKI T.

1989 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 58(3), 259-260. (J)

Effect of the artificial diet containing purified soybean meal (Solpea) on the development and egg productivity of original strain of the silkworm, Bombyx mori, reared on an artificial diet.

Effet d'une alimentation artificielle contenant du soja purifié (Solpea) sur le développement et la productivité en oeufs de la souche originale de Bombyx mori élevée sur aliment artificiel.

IMANISHI S.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 *Tech. Bull. of Seric. Experiment Station*, Vol. 135, 77-85. (J)

Effects of the amounts of phosphorus and sodium in diets on growth of the silkworm, Bombyx mori.

Effets des taux de phosphore et de sodium dans les régimes alimentaires sur la croissance du ver à soie Bombyx mori.

IWANARI Y.

Faculty of Agriculture, Tokyo Univ. of Agric. and Techn., Fuchu, Tokyo 183, Japan.

1976 *J. of Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 47(4), 337. (J,e)

Rearing of parent silkworm races for hybridization in early spring rearing season.

Elevage des souches parentales de vers à soie pour l'hybridation lors de l'élevage précoce de printemps.

KATO S., YOSHIMURA Y., FUJIMAKI T.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 *Acta sericologica*, Vol. 142(9), 73-84. (J)

Densonucleosis viruses of the silkworm, Bombyx mori.

Virus de la densonucléose chez le ver à soie Bombyx mori.

KAWASE S.

Faculty of Agriculture, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-01, Japan.

1989 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 58 (4), 295-301. (J)

Development of highly efficient and simple rearing methods of silkworms for spun-silk production.

Développement de méthodes simples et très efficaces d'élevage de vers à soie pour la production de soie filée.

KURIBAYASHI S., KOUSAKA T., SUDA Y., TAKABAYASHI K.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 *Technical Bull. Seric. Experiment Station*, Vol. 134(8), 173-190. (J)

Nucleotide sequence of a gene cloned from *Bacillus thuringiensis* subspecies *entomocidus* coding for an insecticidal protein toxic for *Bombyx mori*.

Séquence nucléotidique d'un gène cloné à partir de *Bacillus thuringiensis entomocidus* codant pour une protéine insecticide toxique pour *Bombyx mori*.

MASSON L., MARCOTTE P., PREFONTAINE G., BROUSSEAU R.

1989 *Nucl. Ac. Res.*, Vol. 17, 446. (E)

Development of automatic rearing machine for grown silkworms, *Bombyx mori*.

Développement de machines automatiques pour l'élevage des vers à soie *Bombyx mori*.

MIZUSAWA H., MARUYAMA C., YAMANOI F., WAKABAYASHI M.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 *Technical Bull. Seric. Experiment Station*, Vol. 134(8), 191-204. (J)

Evaluation of silkworm races by feed utilization.

Evaluation des races de vers à soie quant à l'utilisation de la nourriture.

NAGAYASU K., NINAKI O., WATANABE A.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 *Technical Bull. Seric. Experiment Station*, Vol. 134(8), 129-148. (J)

Studies on the detection of the densovirus (DNV) by using the ABC-ELISA in domestic silkworm.

Etudes sur la détection du virus de la denso-nucléose (DNV) par le système ABC-ELISA chez le ver à soie domestiqué.

SHI L.G., et al.

1989 *Canye Kexue, Acta Sericologica Sinica*, Vol.15(2), 91-94. (C)

Studies on the rearing techniques for trimolter silkworms.

Etudes sur les techniques d'élevage des vers à soie trimolturiants.

SUDA Y., KOUSAKA T., TAKABAYASHI K., KURIBAYASHI S.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 *Technical Bull. Seric. Experiment Station*, Vol. 134(8), 223-242. (J)

Effect of non-daily short photoperiods on the larval growth and reproductivity of the silkworm, *Bombyx mori*, reared on an artificial diet.

Effet des photopériodes courtes sur la croissance larvaire et la reproduction chez le ver à soie *Bombyx mori* élevé sur un aliment artificiel.

SUZUKI K.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 *Acta sericologica*, Vol. 142(9), 53-64. (J)

Egg productivity of parent silkworms for hybridization, San x Nichi 02 and Sen x Chu 02, reared on artificial diets.

Productivité en oeufs des souches parentales de vers à soie utilisées pour l'hybridation, San x Nichi 02 et Sen x Chu 02, élevés sur des aliments artificiels.

TAKIZAWA H., TANAKA Y., MATSUDA K., KINOSHITA D.-Y., et al.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 *Acta sericologica*, Vol. 142(9), 25-36. (J)

Séricigènes non-mûrier : élevage, nutrition, pathologie

Non-mulberry silkworms : rearing, feeding, pathology

Successful breeding of "80-2" a new bivoltine Tasar silkworm variety with high silk content.
Réussite de l'élevage de "80-2" une nouvelle variété de vers à soie tasar bivoltins donnant une quantité élevée de soie.

CHI B.

1989 *Canye Kexue, Acta Sericologica Sinica*, Vol. 15(2), 111-112. (C)

Synthetic study on nucleopolyhedrosis control of the field in *Antheraea yamamai*.

Etude synthétique de la lutte contre la polyédrose nucléaire chez *Antheraea yamamai*.

KOBAYASHI M., YANAGAWA S., TANAKA K.

Fac. of Textile Science and Technology, Shinshu University, Ueda, Nagano-Ken 386, Japan.

1989 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 58 (4), 344-348. (J,e)

Métabolisme du tréhalose et levée de diapause chez la Pyrale du maïs en fonction des conditions du milieu.

Trehalose metabolism and diapause termination in the european corn borer according to environmental conditions.

PEYPELUT L., GADENNE C., LAVENSEAU L., GOURDOUX L., MOREAU R.

Lab. de Neuro., Univ. de Bordeaux, Lab. de Physiol., Univ. Paris, TALENCE, VER-SAILLES, FRANCE

1988 *Bull. de la Société zoologique de France*, Vol. 114(1), 69-73. (F,e)

Occurrence of three generations on *Menophra atrilineata* in a year.

Existence de trois générations par an chez *Menophra atrilineata*.

YONEYAMA M.

1989 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 58(3), 261-262. (J)

Infection of BmDNV on ovarian cells of Tung oil tree geometrid.

Infection par le BmDNV des cellules ovariennes du géomètre l'abrasin.

ZOU S.

1989 *Canye Kexue, Acta Sericologica Sinica*, Vol. 15(2), 105-106. (C)

Vers à soie : génétique

Silkworms : genetics

Heredity of the size of cocoon filament, and gene analysis of fluffy cocoon strain.

Hérédité du diamètre de la bave du cocon et analyse des gènes des souches à cocon pelucheux.

AOKI H., FUJIMORI H., SIMIZU K.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 Technical Bull. Seric. Experiment Station, Vol. 134(8), 111-118. (J)

Linkage studies of Bombyx mori : discovery of the twenty-sixth linkage group, sooty and non-molting of Ishiko.

Etudes de linkage chez Bombyx mori : découverte du 26ème groupe de liaison, tacheté et non-muant d'Ishiko.

BANNO Y., KAWAGUCHI Y., ISHIKO S., DOIRA H.

Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan.

1989 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 58(3), 234-239. (J,e)

Production of grand parent eggs of F1 hybrid from grand parent silkworm of F1 hybrid.

Production d'oeufs des grand-parents de l'hybride F1 à partir des vers à soie grand-parents de l'hybride F1.

CHEN S.

1989 Canye Kexue, Acta Sericologica Sinica, Vol. 15(2), 100-102. (C)

Increase and stabilization in cocoon shell percentage of basic silkworm variety "123".

Croissance et stabilisation du pourcentage de la coque de la variété de ver à soie "123".

CHENG J., et al.

1989 Canye Kexue, Acta Sericologica Sinica, Vol. 15(2), 88-90. (C)

Characteristics and heredity of a "new small egg" mutant segregated from N132 strain in Bombyx mori.

Caractéristiques et hérédité d'un mutant "petit oeuf nouveau" provenant de la souche N132 de Bombyx mori.

EGUCHI R., OHTSUKI Y., SHIBUKAWA A.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 Acta sericologica, Vol. 142(9), 65-72. (J)

Crossing and back crossing between the domesticated silkworm, *Bombyx mori* and the wild silkworm, *Bombyx mandarina*; variation of cocoon characters in the advanced generations.

Croisement et croisement de retour entre le ver à soie domestique *Bombyx mori* et le ver à soie sauvage *Bombyx mandarina*; variation des caractères des cocons dans les générations suivantes.

HIRATA Y.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 *Acta sericologica*, Vol. 142(9), 85-98. (J)

Induction of malformation in *Bombyx mori* larvae by immersion of eggs into methyl nitrosourea solution.

Induction d'une malformation des larves de *Bombyx mori* par immersion des oeufs dans une solution de méthyl-nitrouree.

KAWAGUCHI Y., DOIRA H., BANNO Y.

Faculty of Agriculture, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan.

1989 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 58 (4), 338-343. (J,e)

Breeding of an autosexing silkworm race, N140 x C145.

Elevage d'une race de ver à soie autosexable, N140 x C145.

MANO Y., NISHIMURA M., KATO M., NAGAYASU K-I.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 *Bull. Seric. Exp. Sta.*, Vol. 30(5), 753-785. (J,e)

Evaluation and selection of silkworm races for fine and coarse size of cocoon filaments.

Evaluation et sélection de races de vers à soie pour obtenir des baves de cocons de calibres fin et épais.

NAGAYASU K-I., WATANABE A., MARUYAMA M., YAMAMOTO T.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 *Technical Bull. Seric. Experiment Station*, Vol. 134(8), 97-110. (J)

Effects of the successive backcrosses on characters in the sex-limited yellow cocoon strains.

Effets des croisements de retour successifs sur les caractères de la souche à cocon jaune lié au sexe.

NINO T., EGUCHI R., SHIMAZAKI A., SIBUKAWA A.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 *Tech. Bull. of Seric. Experiment Station*, Vol. 135, 87-105. (J)

Deficiency in xanthine dehydrogenase activity in the og and og' mutants of the silkworm, *Bombyx mori*.

Absence de l'activité xanthine-déshydrogénase chez les mutants og et og' de *Bombyx mori*.

TAMURA T.

Sericultural Experiment Station, Suginami-ku, Tokyo 166, Japan.

1977 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 46(2), 113-119. (J,e)

Deficiency of xanthine dehydrogenase activity in the oq oily mutant of the silkworm, *Bombyx mori*.

Absence de l'activité xanthine-déshydrogénase chez le mutant transparent oq du ver à soie *Bombyx mori*.

TAMURA T.

The Sericultural Experiment Station, Yatabe, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1982 *Japan J. Genet.*, Vol. 58, 165-168. (E)

Phenocopy induction of the translucent silkworm with allopurinol.

Induction de phénocopie du ver à soie transparent avec l'allopurinol.

TAMURA T.

Sericultural Experiment Station, Suginami-ku, Tokyo 166, Japan.

1978 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 47(4), 338-342. (J,e)

Granules in the meconium of og-mutant of Bombyx mori.

Granules dans le méconium du mutant og de Bombyx mori.

TAMURA T., SAKATE S.

Sericultural Experiment Station, Suginami-ku, Tokyo 166, Japan.

1975 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 44(6), 487-490. (J,e)

Relationship between expression of oily character and uric acid incorporation in the larval integument of various oily mutants of the silkworm, Bombyx mori.

Relation entre l'expression du caractère transparent et l'incorporation de l'acide urique dans le tégument larvaire de divers mutants transparents du ver à soie Bombyx mori.

TAMURA T., SAKATE S.

1983 *Bull. of Seric. Experiment Station*, Vol. 28(6), 719-740. (J,e)

Polymorphism of ribosomal genes with respect to insertion sequence content in Bombyx mori and heterosis hybrid genomes.

Polymorphisme des gènes ribosomiques en ce qui concerne la séquence d'insertion chez Bombyx mori et hétérosis des génomes hybrides.

TIKHOMIROVA T.P., TIMOFEEVA M.Y.

1988 *Dokl. Akad. Navk., SSSR*, Vol. 303(1), 223-226. (R)

Vers à soie : physiologie, biochimie

Silkworms : physiology, biochemistry

Hormonal regulation of larval development and its utilization in silk production by Bombyx silkmoth.

Régulation hormonale du développement larvaire et son utilisation dans la production de soie par le papillon Bombyx.

AKAI H.

1988 *J.A.R.Q.*, Vol.22(2), 128-134. (E)

Effects of anti-JH active substances on larval development of Bombyx mori.

Effets des substances actives anti-JH sur le développement larvaire de Bombyx mori.

AKAI H., KIMURA K., TAKABAYASHI K., KIUCHI M.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 *Technical Bull. Seric. Experiment Station*, Vol. 134(8), 11-24. (J)

A new approach to conjugated genes : synthesis of the pheromones of Lobesia botrana and Bombyx mori.

Une nouvelle approche pour les gènes conjugués : synthèse des phéromones de Lobesia botrana et Bombyx mori.

ALEXAKIS A., JACHET D.

1989 *Tetrahedron Symp.*, Vol. 35, *Recent Dev. in Organ. Chem. ed. Lipshutz B.*, 381. (E)

Polymorphism of digestive amylase isozyme in the silkworm, Bombyx mori.

Polymorphisme des isozymes de l'amylase digestive chez le ver à soie Bombyx mori.

ASAKAWA H., HAMANO K.

Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agric. and Tech., Fuchu, Tokyo 183, Japan.

1989 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 58 (4), 322-326. (J,e)

The structural characteristics of the 5.8 S rRNA gene of the silkworm Attacus ricini.

Les caractéristiques structurales du gène de l'ARNr 5,8S du ver à soie Attacus ricini.

DOU S., ZHENG Z., LI Z.

1987 *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao*, Vol. 19(5), 373-382. (Ch)

Increase in respiratory rate during feeding of the silkworm larvae, Bombyx mori.

Augmentation du taux respiratoire lors du nourrissage des larves de vers à soie Bombyx mori.

HAMANO K., FUKUSHI M.

1989 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 58(3), 263-264. (J)

Effect of dietary pyridoxin levels on the concentration and disc electrophoretic pattern of haemolymph protein of the silkworm.

Effet des niveaux de pyridoxine dans l'alimentation sur la concentration et le profil électrophorétique des protéines de l'hémolymphe du ver à soie.

HAMANO K., TSUCHIDA K.

1989 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 58 (4), 355-356. (J)

Peptide map analysis of insecticidal crystal proteins produced by strains of *Bacillus thuringiensis* by SDS-PAGE.

Analyse de la carte peptidique des protéines cristallines insecticides produites chez les souches de *Bacillus thuringiensis* par SDS-PAGE.

IIZUKA T., TERAIE N.

Faculty of Agriculture, Hokkaido University Sapporo 060, Japan.

1989 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 58 (4), 308-314. (J,e)

Delayed activation of glycogen synthase adjusted to the effective storage function of fat body in the premetamorphic instar of the silkworm, *Bombyx mori*.

Activation retardée de la glycogène-synthase ajustée à la fonction de stockage du corps adipeux au stade pré-métamorphose chez le ver à soie *Bombyx mori*.

INAGAKI S., YAMASHITA O.

1989 *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 92, 81. (E)

Chymotrypsin-like proteases in digestive juice of silkworm, *Bombyx mori*. Isolation, characterization and substrate specificity.

Protéases de type chymotrypsine dans le tube digestif du ver à soie *Bombyx mori*. Isolement, caractérisation et spécificité de substrat.

KAMAORI M., YOSHIDA N., TSURUYAMA S., TOJO A., OGATA F., MAKISUMI S.

1988 *Mem. Fac. Sci., Kyushu Univ., Ser. C.*, Vol. 16(2), 177-188. (E)

Sex pheromone conversion and degradation in antennae of silkworm moth, *Bombyx mori* L.

Conversion et dégradation de la phéromone sexuelle dans les antennes du papillon *Bombyx mori* L.

KASANG G., NICHOLLS M., VONPROFF L.

1989 *Experientia*, Vol. 45, 81. (E)

A comparison of trimolter races and trimolters induced by an anti-juvenoid for the growth of silkworm, *Bombyx mori*.

Une comparaison entre la croissance des races trimuantes et des trimuants induits par un anti-juvénoïde chez le ver à soie *Bombyx mori*.

KOZAKAI Y., MIZUSAWA H.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 *Technical Bull. Seric. Experiment Station*, Vol. 134(8), 205-222. (J)

Effects of gamma-BHC on physiological process of growth in the silkworm, *Bombyx mori*.

Effets de la gamma-BHC sur le processus physiologique de croissance du ver à soie *Bombyx mori*.

KUMARI J., NAIDU B.P.

1988 *Environ. Ecol.*, Vol. 6(2), 500-501. (E)

Expression of foreign genes in insects using baculovirus vectors.

Expression de gènes étrangers chez les insectes à l'aide de vecteurs baculovirus.

MAEDA S.

Department of Entomology, University of California, Davis, California 95616, USA.

1989 *Ann. Rev. Entomol.*, Vol. 34, 351-372. (E)

Isolation and primary structure of bombyxin IV, a novel molecular species of bombyxin from the silkworm, *Bombyx mori*.

Isolement et structure primaire de la bombycine IV, une espèce moléculaire nouvelle de bombycine. MARUYAMA K., HIETTER H., NAGASAWA H., ISOGAI A., TAMURA S., et al.
1988 *Agr. Biol. Chem.*, Vol. 52, 3035. (E)

Protein metabolism in the larval development of the silkworm, *Bombyx mori* : protein reutilization at the fourth molt.

Métabolisme des protéines au cours du développement larvaire du ver à soie *Bombyx mori* : réutilisation des protéines au cours de la quatrième mue.
NAGATA M., YOSHITAKE N.
Lab. of Seric. Sciences, Fac. of Agric., Univ. of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.
1989 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 58(3), 221-233. (J,e)

Evidence for phosphorylation of trans-activator p40X of human T-cell leukemia virus type I produced in insect cells with a baculovirus expression vector.

Mise en évidence de la phosphorylation de l'activateur p40X du virus de type I de la leucémie des cellules T humaines produit dans des cellules d'insectes par un vecteur baculovirus d'expression.
NYUNOYA H., AKAGI T., OGURA T., MAEDA S., SHIMOTOHNO K.
1988 *Virology*, Vol. 167, 538-544. (E)

Effects of a purified cecropin D from a chinese silk moth on growth, function and differentiation of murine hemopoietic cells.

Effets d'une cécropine D purifiée d'un papillon séricigène chinois sur la croissance, la fonction et la différenciation des cellules hémapoïétiques murines.
OKAI Y., QU X.
1989 *Immunol. Lett.*, Vol. 20, 127. (J)

Release of prothoracicotropic hormone in the 5th instar larva of silkworm, *Bombyx mori* L.

Hormone prothoracicotrope libérée chez le ver à soie *Bombyx mori* L. au 5ème âge.
SHIMADA J.
Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agric. and Tech., Fuchu, Tokyo 183, Japan.
1989 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 58 (4), 315-321. (J,e)

The fine structure of thermo/hygro sensitive sensilla in the silkworm, *Bombyx mori* : receptor membrane substructure and sensory cell contacts.

Structure fine de la sensille thermo/hygro sensible chez le papillon *Bombyx mori* : sous-structure du récepteur et contacts de la cellule sensorielle.
STEINBRECHT R.A.
1989 *Cell & Tissue Res.*, Vol. 255, 49-57. (E)

Volume and surface of receptor and auxiliary cells in hygro/thermoreceptive sensilla of moths (*Bombyx mori*, *Antheraea pernyi* and *A. polyphemus*).

Volume et surface d'un récepteur et des cellules auxiliaires dans la sensille hygro/thermoréceptive des papillons (*Bombyx mori*, *Antheraea pernyi* et *A. polyphemus*).
STEINBRECHT R.A., LEE J.K., ALTNER H., ZIMMERMANN B.
1989 *Cell & Tissue Res.*, Vol. 255, 59-67. (E)

Insulin-like peptide hormone isolated from the head of the adult silkworm, *Bombyx mori*.

Une hormone peptidique analogue à l'insuline isolée de la tête du ver à soie adulte *Bombyx mori*.
SUZUKI A.
1988 *Kagaku to kogyo*, Vol.41(12), 1126-1127. (J)

The hydrophobic anchor of membrane-bound trehalase from the silkworm (*Bombyx mori*) midgut.

Le bras hydrophobe de la tréhalase liée à la membrane de l'intestin moyen du ver à soie *Bombyx mori*.

TAKESUE Y., YOKOTA K., MIYAJIMA S., TAGUCHI R., IKEZAWA H.

1988 *Kankyo Igaku Kenkyusho Nenpo (Nagoya Daigaku)*, Vol. 39, 181-184. (J)

Sex- and cell-specific regulation of yolk polypeptide genes introduced into *Drosophila* by P-element-mediated gene transfer.

Régulation de la spécificité cellulaire et sexuelle des gènes des polypeptides de l'oeuf introduits chez *Drosophila* par transfert des gènes à l'aide de l'élément-P.

TAMURA T., KUNERT C., POSTLETHWAIT J.

Dept. of Biology, Univ. of Oregon, Eugene, OR 97403, USA.

1985 *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, Vol. 82, 7000-7004. (E)

Preservation of spermatozoa of the silkworm, *Bombyx mori*, by freezing.

Conservation des spermatozoïdes du ver à soie *Bombyx mori* par congélation.

TAMURA T., SAKATE S.

1985 *Sansi-Kenkyu Acta Sericologica*, Vol. 134, 123-128. (J,e)

Presence of bombyxin (4K-PTTH)-like molecules in neurosecretory granules of brain-corpora cardiaca complexes of *Locusta migratoria*. Developmental aspects.

Présence d'une molécule de bombyxine (4K-PTTH) dans les granules neurosécréteurs des complexes cerveau-corpora cardiaca chez *Locusta migratoria*. Aspects du développement.

ZACHARY D., GOLTZENE F., HOLDER F.C., BERCHTOLD J.P., et al.

1988 *Int. J. Invertebr. Reprod. Dev.*, Vol.14(1), 1-10. (E)

Vers à soie : oeufs, embryologie

Silkworms : eggs, embryology

Variation of the content of free amino acids in eri silkworm (*Philosamia ricini*) pupae during diapause as influenced by the treatment of larvae with keratof.

Variations du contenu en acides aminés libres chez les larves de vers à soie eri (*Philosamia ricini*) pendant la diapause influencées par le traitement au keratof.

DORDEA M., FLOCA L., PERSECA T.

1987 *Stud. Univ., Babes-Bolyai Biol.*, Vol.32, 56-59. (E)

Comparison of some components in parthenogenetic eggs and fertilized eggs of the silkworm, *Bombyx mori*.

Comparaison entre certains composants dans les oeufs parthénogénétiques et les oeufs fécondés du ver à soie *Bombyx mori*.

FUGO HAJIME.

1989 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 58 (4), 351-352. (J)

Changes in SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of egg proteins during the embryonic and diapause development of the Japanese oak silkworm, *Antheraea yamamai*.

Changements dans les profils électrophorétiques sur gel de polyacrylamide-SDS des protéines de l'oeuf pendant le développement embryonnaire et la diapause du ver à soie du chêne Japonais, *Antheraea yamamai*.

FURUSAWA T., UEDA T., MITSUDA K.

Dep. Applied Biology, Kyoto Inst. of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku Kyoto 606, Japan.

1989 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 58(3), 179-185. (J,e)

A study on the relation between the exposure of Tussar eggs to light and the appearance of diapause pupa. IV. Prolong exposure time of autumn Tusser eggs to light for avoiding occurrence of trivoltine moth.

Etude sur la relation entre l'exposition à la lumière des oeufs tussar et l'apparition de la diapause chez la chrysalide. IV. Exposition prolongée à la lumière des oeufs tussar d'automne pour éviter l'apparition de papillons trivoltins

GONG J., et al.

1989 *Canye Kexue, Acta Sericologica Sinica*, Vol. 15(2), 109-110. (C)

Application of trimolter inducer on silkworm egg production. I. Comparison between inductive trimolter and normal tetramolter characters.

Application d'un inducteur de trimuants sur la production d'oeufs de vers à soie. I. Comparaison entre les caractères des trimuants provoqués et les caractères des tétramuants normaux.

LU X., et al.

1989 *Canye Kexue, Acta Sericologica Sinica*, Vol. 15(2), 74-78. (C)

Changes in properties in lipophorin of the silkworm, *Bombyx mori* with ontogeny.

Changements des propriétés des lipophorines chez le ver à soie *Bombyx mori* au cours de l'ontogénie.

MIURA K., SHIMIZU I.

1989 *Comp. Biochem. Physiol.*, 92, 197. (E)

On the termination of diapause character hibernating egg of the authorized silkworm races in the Matsumoto Branch, Sericultural Experiment Station.

Terminaison de la diapause des oeufs hibernants des races de vers à soie du centre d'expérimentation séricicole de Matsumoto.

NAKAYAMA K., HIRABAYASHI T., HIGASHI Y.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 *Acta sericologica*, Vol. 142(9), 37-44. (J)

Hibernation of the eggs of the Japanese oak silkworm.

Hibernation des oeufs du ver à soie du chêne japonais.

SAKATE S.

1984 *Tech. Bull. of Seric. Experiment Station*, Vol. 123, 31-46. (J,e)

Labour-saving maintenance methods of the silkworm stocks by cold storage of eggs. VIII: Two years storage in the eggs of F1 hybrid races.

Méthodes d'entretien des souches de vers à soie permettant d'économiser du temps de travail par stockage des oeufs au froid. VIII: Stockage pendant deux ans des oeufs hybrides F1.

SHIMIZU F., AOKI H.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 *Acta sericologica*, Vol. 142(9), 45-52. (J)

Long term preservation of silkworm eggs following an acid treatment in low temperature.

Conservation à long terme des oeufs de vers à soie après traitement à l'acide à basse température.

YOSHIMURA Y.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 *Acta sericologica*, Vol. 142(9), 99-108. (J)

Vers à soie : glandes séricigènes

Silkworms : silk glands

Characterization of silk gland tRNA from the mutant silkworm and cloning of its tRNA gene.
Caractéristique de l'ARNt de la glande séricigène d'un ver à soie mutant et clonage de son gène d'ARNt.

MATSUZAKI K.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 *Bull. Seric. Exp. Sta.*, Vol. 30(5), 739-752. (J,e)

Factors involved in preferential transcription of the fibroin gene.

Facteurs intervenant dans la transcription préférentielle du gène de la fibroïne.

TAKIYA S., SUZUKI Y.

1989 *E. J. B.*, Vol. 179, 1-9. (J)

Ribosomal DNA insertion elements R1Bm and R2Bm can transpose in a sequence specific manner to location outside the 28S genes.

Les éléments d'insertion R1Bm et R2Bm de l'ADN ribosomique peuvent se transposer d'une manière séquentielle spécifique à l'extérieur des gènes 28S.

XIONG Y., BURKE W., JAKUBCZAK J., EICKBUSH T.

1988 *Nucl. Ac. Res.*, Vol. 16, 10561-10573. (E)

Soie

Silk

Weaving methods of spun like silks and properties of the fabrics.

Méthodes de tissage des soies filées et propriétés des tissus.

AOKI A., TAKAHASHI T., KANDA C.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 *Technical Bull. Seric. Experiment Station*, Vol. 134(8), 259-280. (J)

Effect of epoxide treatment on silk fabrics in the presence of neutral catalyst.

Effet du traitement époxyde sur les tissus de soie en présence d'un catalyseur neutre.

ASAI N., HAYASHI Y., OKAGAWA I.

1989 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 58(3), 255-256. (J)

¹⁵N and ¹³C NMR chemical shift calculations for the sequence analysis of Bombyx mori silk fibroin protein with FPT indo method.

Changement de calcul de RMN ¹⁵N et ¹³C pour l'analyse de la séquence de la fibroïne de Bombyx mori avec une méthode indo FPT.

ASAKURA T., YOSHIMIZU H., ANDO S., ANDO I.

1988 *Theochem.*, Vol.45, 135-139. (E)

Jacquard n'était pas Jacquard !

Jacquard was not Jacquard !

BRISAUD J.

Conservatoire Nationale des Arts et Métiers, 292, rue St-Martin, 75141 Paris, France.

1989 *Vouloir savoir*, 46, 21-22. (F)

Structure of silk, morphological aspects, chemical and physical.

Structure de la soie, aspects morphologiques, chimiques et physiques.

FREDDI G.

1988 *Tinctoria*, Vol. 85(7), 61-69. (I)

Present issues and factor analysis of the spun silk industry.

Analyse des facteurs et des problèmes actuels de l'industrie de la filature.

HAMAZAKI M.

1989 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 58 (4), 332-337. (J)

Growth control and rearing technique of silkworm for the production and utilization of cocoon filaments for new uses. Outlines of research progress and main results.

Contrôle de la croissance et technique d'élevage des vers à soie pour la production et l'utilisation des baves de cocons en vue de nouveaux usages. Aperçu des recherches et principaux résultats.

ISHIKAWA S., TAKIMIYA K.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 Technical Bull. Seric. Exper. Station, Vol. 134(8), 1-10. (J)

Producing of non-woven silk fabrics and silk felt.

Production de soies non tissées et de velours de soie.

KATO H., KOMATU K., MAGOSHI Y.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 Technical Bull. Seric. Experiment Station, Vol. 134(8), 281-295. (J)

Morphology and physical properties of tussah silk fibroin fiber degummed with enzyme.

Morphologie et propriétés physiques de la fibre de fibroïne tussah dégommée avec une enzyme.

MATSUMURA M., SHIOZAKI H., TSUKADA M. SATOH T.

National Institute of Seric. and Entomological Science, Tsukuba City, Ibaraki 305, Japan.

1989 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 58(3), 191-196. (J,e)

Compatibility in silk dyeing with acid dyes.

Compatibilité de teinture de la soie par un colorant acide.

MITSUISHI M., YAGI T., ISHIWATARI T.

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

1989 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 58(3), 186-190. (J,e)

Microstructure of dyed silk with acid dye.

Microstructure de la soie teinte par un colorant acide.

MITSUISHI M., YAGI T., ISHIWATARI T., HAMADA K.

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

1989 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 58(3), 240-244. (J,e)

A characteristic of spinning of silkworms and the distribution of the length of filaments produced by cutting cocoons.

Une caractéristique de filage des vers à soie et la distribution de la longueur des baves obtenues en cassant les cocons.

MIURA M., NISHIOKA T., SHIMAZAKI A., NISHIZAWA Y., KUMAGAI J.

Shinshu University, Ueda 386, Nagano NEC Software Co., Nagano 382, Japan.

1989 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 58(3), 209-215. (J,e)

Effect of the electrolytes used for pH control on the dyeing of silk with acid dye.

Effet des électrolytes utilisés pour le contrôle du pH dans la teinture de la soie par colorant acide.

NAKAJIMA T., SHIMIZU Y., KIMURA M.

Koka women's Junior Coll., Ukyoku, Kyoto 615, Dep. of Educ., Mie Univ., Tsu City 514, Japan.

1989 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 58(3), 216-220. (J,e)

Influence of sulfonated ricinoleic acid on the dyeing properties of silk with an acid dye.

Influence de l'acide ricinoléique sulfoné sur les propriétés de teinture de la soie avec un colorant acide.

NAKAJIMA T., SHIMIZU Y., SHIKATA M., KIMURA M.

Koka Women's Junior Col., Ukyo-ku, Kyoto 615, Dep. of Educ., Mie Univ., Tsu City 514, Japan.

1989 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 58(3), 175-178. (J,e)

Studies on metal complexes of biopolymers. Gelation from fibroin aqueous solutions in presence of metal ions.

Etudes sur les complexes de métal des biopolymères. Gélification des solutions aqueuses de fibroïne en présence d'ions métal.

NAKAMURA Y., SHIRAI H., HOJO N.

1988 *Kobunshi Ronbunshu*, Vol. 45(11), 889-894. (J)

Individual luminescence of fibroin from natural silk with different moisture degree.

Luminescence individuelle de la fibroïne de soie à différents degrés d'humidité.

NURIEV E.S., FOGEL V.R., KOTELNIKOV A.I., MAMEDOV Y.V.

1989 *Biofizika*, SSSR, Vol. 34(1), 147. (R)

La vie quotidienne des canuts passementiers et moulinières au XIXème siècle.

Everyday life of Lyons silk-weavers and throwers in the 19th century.

PLESSY B., CHALLET L.

1988 *Hachette, France*, 284 p. (F)

Dyeing properties of Chinese tussar silk.

Propriétés tinctoriales de la soie tussah chinoise.

SHIMIZU Y., DOHMYOU M., NAKAJIMA T., KIMURA M.

Shiga Prefectural Junior College, Hikone City 522, Japan.

1989 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 58 (4), 302-307. (J,e)

Crease-proofing property of silk fabrics woven of chemical-treated threads.

Caractère d'infroissabilité de la soie tissée avec des fils traités chimiquement.

SHIOZAKI H., YAGI K.

1989 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 58(3), 265-266. (J)

Evaluation of qualities in cocoon filaments of silkworms, *Bombyx mori* induced by juvenoid and anti-juvenoid.

Evaluation des qualités des baves de cocons de *Bombyx mori* induites par des juvénoïdes et des anti-juvénoïdes.

TSUBOI H., HAGA A., USHIYAMA R., MOROZUMI Y., IWADARE M.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 *Technical Bull. Seric. Experiment Station*, Vol. 134(8), 41-62. (J)

Development of spun raw silk by reeling.

Développement de soie grège filée par filature.

TSUBOI H., NAKAYA A., HAGA A., NAKAMURA K., AIZAWA H.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 *Technical Bull. Seric. Experiment Station*, Vol. 134(8), 243-257. (J)

Physical properties of the cocoon filaments of silkworms, *Bombyx mori*, induced by an anti-juvenoid.

Propriétés physiques des baves de cocons de *Bombyx mori*, induites par un anti-juvénoïde.

TSUBOUCHI K., IMAI T., OBO M.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 *Technical Bull. Seric. Experiment Station*, Vol. 134(8), 63-79. (J)

Effect of the drying rate on the structure of Tussah silk (*Antheraea pernyi*) fibroin.

Effet du taux de séchage sur la structure de la fibroïne de la soie Tussah (*Antheraea pernyi*).

TSUKADA M.

Sericultural Experiment Station, Ministry of Agric., 1-2 Yatabe, Ibaraki 305, Japan.

1986 *J. of Polymer Science, Polymer Physics ed.*, Vol. 24, 457-460. (E)

Structural characteristics of 2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA)/methacrylamide (MAA)-grafted silk fibers.

Caractéristiques structurelles de fibres greffées avec du 2-hydroxyéthylméthacrylate (HEMA)/méthacrylamide (MAA).

TSUKADA M.

Sericultural Experiment Station, Ministry of Agric., Yatabe, Ibaraki 305, Japan.

1988 *J. of Applied Polymer Science*, Vol. 35, 2133-2140. (E)

Structural changes in Poly(L-alanine) induced by heat treatment.

Changements structurels dans les Poly(L-alanine) provoqués par des traitements thermiques.

TSUKADA M., NAGURA M., ISHIKAWA H.

Sericultural Experiment Station, Ministry of Agric., 1-2 Yatabe, Ibaraki 305, Japan.

1987 *J. of Polymer Science, Part B Polymer Physics*, Vol. 25, 1325-1329. (E)

Chemical and property modification of silk with dibasic acid anhydrides.

Modification chimique et propriété de la soie traitée avec des anhydrides acides dibasiques.

TSUKADA M., SHIOZAKI H.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba City, Ibaraki 305, Japan.

1989 *J. of Applied Polymer Science*, Vol. 37, 2637-2644. (E)

Effect of the moisture absorption on the structural changes of silk fibroin fiber.

Effet de l'absorption d'humidité sur les changements structurels de la fibre de fibroïne.

TSUKUDA M., NAGURA M., ISHIKAWA H.

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

1989 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 58 (4), 327-331. (J,e)

Breeding of the silkworm races having characteristics in size of cocoon filament.

Elevage de races de vers à soie possédant des caractéristiques concernant le diamètre de la bave du cocon.

YAMAMOTO T., ENOKJIMA M., KAMIJYOU I., FUKASAWA M., MARUYANA M.

Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1988 *Technical Bull. Seric. Experiment Station*, Vol. 134(8), 81-95. (J)

Application of fibroin membrane to immobilizing coenzymes.

Application de membrane de fibroïne pour l'immobilisation des coenzymes.

YOSHIMURA T., SHIMIZU Y., KUROTANI W., YAMAOKA R., HAYASHIYA K.

1988 *Agr. Biol. Chem.*, Vol. 52, 3201. (E)

INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

1) Les articles présentés doivent concerner soit des travaux originaux soit des synthèses. Ils doivent être rédigés en français ou en anglais. Ils doivent avoir trait à la sériciculture qui inclut les vers à soie, les plantes nourricières, la filature de la soie quelle que soit la nature des recherches (fondamentales ou appliquées) et des sujets (biochimie, écologie, économie, virologie, génétique, etc.).

2) Les articles doivent être soumis à : **Dr. G. CHAVANCY**. Les articles soumis au Rédacteur doivent être inédits et ne doivent pas être présentés pour publication chez un autre éditeur. Les articles acceptés pour publication dans *SERICOLOGIA* ne pourront être publiés ailleurs sous la même forme sans le consentement écrit de l'éditeur.

3) Les manuscrits et illustrations doivent être soumis en double exemplaire, l'auteur conservant une copie. Dans le cas d'une co-rédaction, les auteurs doivent indiquer le nom de celui qui recevra les épreuves.

4) Les manuscrits doivent être dactylographiés avec un double interligne et des marges importantes. Les auteurs sont priés de rédiger des communications aussi concises que possible. Les renvois de bas de page sont à éviter et les caractères en italique ne doivent pas être utilisés pour la mise en relief.

5) L'article doit être présenté de la façon suivante:

- Le titre suivi du nom de l'auteur et de son adresse complète.

- Le résumé qui doit indiquer le contenu et les conclusions de l'article et doit faire référence à des informations nouvelles. Le résumé ne doit pas excéder 200 mots et peut être divisé en paragraphes numérotés.

- Les mots clés. Une petite liste de mots clés permettant une rapide analyse du contenu de l'article et utilisable pour la compilation de l'index.

- Les articles doivent être divisés en : Introduction, Matériel et Méthodes, Résultats et Discussion. Pour les articles de synthèse, les auteurs peuvent choisir la présentation qui leur convient.

- Remerciements.

- Références. Les auteurs doivent suivre le "Harvard system". Les références doivent être données dans l'ordre suivant : nom de l'auteur et ses initiales, date (entre parenthèses), titre de l'article, nom du journal tel qu'il est abrégé dans la liste mondiale des périodiques scientifiques (4ème édit. 1963), le volume et les première et dernières pages de l'article.

Pour les livres, il est nécessaire d'indiquer le nom de l'auteur et ses initiales, la date de publication, le titre, l'édition, le nombre de pages, le nom de l'éditeur et le lieu d'édition.

Dans le texte, les références doivent être indiquées sous la forme suivante : Dupont (1964) ou (Dupont, 1964). Lorsque la référence comprend plus de deux auteurs, par exemple Dupont, Durand et Martin, l'article doit être cité comme Dupont *et coll.* sauf si cela peut prêter à confusion. Si l'on cite des articles d'un même auteur publiés la même année, ils doivent être distingués par les lettres a, b, etc.

La référence à un article sous presse doit signifier que l'article a été accepté pour publication et elle doit s'écrire de la façon suivante :

SETOYAMA K. (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 silkworm, host plant, silk reeling, whatever the nature of studies (basic or applied) and topics (biochemistry, ecology, economy, virology, genetics, etc.).

2) Papers should be submitted to : **Dr. G. CHAVANCY**. Submission of a paper to the Editor implies that it has not previously been published, that it is not under consideration for publication elsewhere and that, if accepted in *SERICOLOGIA*, it will not be published elsewhere in the same form without the written consent of the Editor.

3) Manuscripts and illustrations should be submitted in duplicate and the author should retain one copy. In the case of multiple ownership, the authors indicate who is to receive the proofs.

4) Manuscripts should be typewritten with double spacing and wide margin. Authors are requested to keep their communication as concise as possible. Footnotes should be avoided and italics should not be used for emphasis.

5) The typescript should contain the following features:

- Title followed by the author's name and full address.

- Abstract which should be a brief summary of the contents and conclusions of the paper and should refer to any new information. It should not exceed 200 words and may be divided into numbered sections.

- Keywords. A short list of keywords provided for rapid scanning of the contents of the paper and used for compiling the index.

- Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion should be given for papers presenting original results. For review, authors may choose the convenient presentation.

- Acknowledgements.

- References. The 'Harvard system' is to be followed. References should be detailed in the following order: author's names and initials, date (in parentheses), the title of the article, the name of the journal as abbreviated in the *World List of Scientific Periodicals* (4th edit., 1963), the volume and the first and last pages of the article.

For books, the author's names, date of publication, title, edition, number of pages, reference, publisher's name and the place of publication should be given.

In the text, references should be given as Dupont (1964) or (Dupont, 1964). When a citation includes more than two authors, e. g. Dupont, Durand and Martin, the paper should be cited in the text as Dupont *et al.*, provided this is not ambiguous. If papers by the same author(s) in the same year are cited they should be distinguished by the letters a, b, etc.

References to a paper "In press" means that it has been accepted for publication and given as follows:

SETOYAMA K. (1982) Effect of water on molecular motion of silk fibroin. *J. Seric. Sci. Jpn.* In press.

6) Illustrations. All necessary illustrations should accompany the manuscript but should not be inserted in the text. All photographs, graphs and diagrams should be numbered consecutively in arabic numerals in the order in which they are referred to in the text.

Glossy photographs or positive prints (not X-ray, negatives or slides) should be sent, unmounted wherever possible, and should be restricted to the minimum necessary.

Charts, graphs or diagrams should be drawn boldly in black ink on good quality white paper or card. Lettering to appear on the illustration should be given in full and should be of sufficient size to allow for considerable reduction where necessary.

Illustrations should not be larger than 14 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 : 3^{ème} trimestre 1989