

sericologia

Journal of Silkworms

Revue des Vers à Soie

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

Managing Director
Chief Editor
Deputy Editor

H. BOUVIER
G. CHAVANCY
A. FOURNIER

Directeur Gérant
Rédacteur en Chef
Rédacteur Adjoint

COMITE DE REDACTION **EDITORIAL BOARD**

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

- Historical review on the prothoracicotrophic hormone in the silkworm, *Bombyx mori* 137
Historique de l'étude de l'hormone prothoracicotrope chez le ver à soie *Bombyx mori* 147
M. KOBAYASHI

Articles originaux / Original papers

- Effect of JH analogues on silkworm, *Bombyx mori* L., growth and development of silk gland 155
Effet d'analogues de l'hormone juvénile sur la croissance et la glande séricigène du ver à soie *Bombyx mori* 167
S.K. CHOWDHARY, P.S. RAJU, R.K. OGRA
- Tissue-specific expression of protein factors showing affinity for the promoter regions of silk protein genes in *Bombyx mori* 171
Spécificité tissulaire de l'expression de facteurs protéiques affines des régions promotrices des gènes des protéines de la soie chez *Bombyx mori* 183
J. DREVET, P. COUBLE
- Alternative chemicals for the acid treatment of bivoltine silkworm (*Bombyx mori* L.) eggs 189
Produits chimiques de substitution au traitement à l'acide des oeufs de ver à soie bivoltin (*Bombyx mori* L.) 197
M.T. SWAMY, K.C. DEVARAJ URS, R.V. KRISNAMOORTHY
- Adaptive changes in the respiratory activity of endoparasitic maggots of Uzi fly (*Exorista sorbillans*, Weidmann) in relation to its host, the silkworm (*Bombyx mori* L.) 201
Adaptation de l'activité respiratoire des larves de la mouche uzi (*Exorista sorbillans*, Weidmann) à son hôte, le ver à soie (*Bombyx mori* L.) 211
N.R. PRASAD, Y. SRINIVASA REDDY, N.B. KRISHNAMURTHY

Evaluation of loss in economic values of the tasar silkworm, <i>Antheraea paphia</i> (Linnaeus), cocoons following the parasitization by the tasar uji fly, <i>Blepharipa zebina</i> (Walker)	215
Evaluation de la perte des valeurs économiques des cocons du ver à soie tasar <i>Antheraea paphia</i> après parasitisme par la mouche uji tasar <i>Blepharipa zebina</i> (Walker)	225
G.M. PATIL, C.J. SAVANURMATH	

Relative contact toxicity of some insecticides to the wingless grasshopper, <i>Neorthacris acuticeps nilgiriensis</i> (Orthoptera : acrididae) and their persistence toxicity against larvae of silkworm on mulberry	229
Toxicité relative de contact de certains insecticides pour la sauterelle aptère <i>Neorthacris acuticeps nilgiriensis</i> (Orthoptera : acrididae) et sa persistance pour les larves du ver à soie du mûrier	235
P.P. SHARMA	

Incidence of fungal diseases of mulberry under different agronomical practices	237
Incidence des maladies fongiques du mûrier en fonction de différentes pratiques agronomiques	243
GOVINDAIAH, D.D. SHARMA, P.C. CHOUDHURY, B. MALLIKARJUNA, Y.R. MADHAVA RAO	

Notes brèves / Brief notes

New record of a bacterial pathogen, <i>Streptococcus faecalis</i> Andrewes and Horder, on mulberry silkworm <i>Bombyx mori</i> L., from India	247
Première observation de <i>Streptococcus faecalis</i> Andrewes et Horder comme agent pathogène bactérien du ver à soie du mûrier <i>Bombyx mori</i> en Inde	249
C.S. PATIL	

Studies on fortification of culture media with larval and pupal extract on the growth of <i>Beauveria bassiana</i>	251
Effet de l'enrichissement de milieux de culture par des extraits de larves et de chrysalides sur la croissance de <i>Beauveria bassiana</i>	255
M.V. SAMSON, B. NATARAJU, M. BAIG	

Incidence of leaf spot disease in relation to epidermal and cuticle thickness in some indigenous varieties of mulberry	257
Incidence de la maladie de la tache en fonction de l'épaisseur de l'épiderme et de la cuticule chez certaines variétés locales de mûriers	261
GOVINDAIAH, T. PHILIP, K. SENGUPTA, K. GIRIDHAR, N. SURYANARAYANA	

Changes in total phenolics of tukra-affected mulberry plants	263
Variations des taux de phénols chez les plants de mûrier atteints de tukra	267
MUTHE GOWDA, M. SANTA KUMARI, N.N. UMESH KUMAR, G. BORAI AH	

HISTORICAL REVIEW ON THE PROTHORACICOTROPIC HORMONE IN THE SILKWORM, *BOMBYX MORI*

M. KOBAYASHI

Lotte Central Laboratory, Numakage, Urawa, Saitama, 336 Japan.

The endocrinology of the silkworm, Bombyx mori, has been a matter of concern in sericulture, both scientifically and practically. This report aims to present a brief historical review on the bioassay and chemical nature of the prothoracicotropic hormone in this insect.

Keywords : Prothoracicotropic hormone, *Bombyx mori*, insect endocrinology, bombyxin.

INTRODUCTION

In insects, the endocrinological function of the brain was first described in *Lymantria dispar* by Kopeć (1922). Then neurosecretory cells, i.e. nerve cells which cytologically show signs of secretory activity, were found in the brain of *Apis mellifica* by Weyer (1935). Also, histophysiological observations of the neurosecretory cells in the brain of *Bombyx mori* had been made by Arvy *et al.* (1953 ; Bounhiol *et al.*, 1953). The first evidence of a function of neurosecretory cells was provided by Wigglesworth (1940), who demonstrated that the moulting of *Rhodnius prolixus* was initiated by a hormonal factor originating from the dorsal region of the protocerebrum, containing the neurosecretory cells. Thereafter, numerous studies on hormonal control of growth and development were reported (see review, Van der Kloot, 1962). Many investigations on the system of hormonal action in imaginal differentiation have been carried out with *Hyalophora cecropia* (Williams, 1947, 1952) and other insects (see review, Kerkut and Gilbert, 1985).

Williams (1947, 1952) found that pupal diapause of *Hyalophora cecropia* was caused by inactivation of the pupal brain. In the classical hypothesis, the brain is activated by exposure to low temperature and secretes a hormone affecting the prothoracic gland. The latter then secretes prothoracic gland hormone (moulting hormone, ecdysone), which induces metamorphosis.

However, in the silkworm, *Bombyx mori*, diapause does not occur in the pupal stage. Brain was thought for a long time to be unnecessary for the induction of metamorphosis, since Fukuda (1940a, b) using F₁ hybrid of two strains, Japanese and Chinese, was to note that pupal-adult development in *Bombyx* could not be curtailed by brain extirpation immediately following larval-pupal ecdysis, an observation later confirmed by Bounhiol (1952a, b).

Also, similar experiments were carried out by the author in the early 1950's using several strains of the silkworm, *Bombyx mori*. At that time more than 40 parental strains and above 25 F₁ hybrids were authorized by the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries as commercial silkworm for sericultural farmers in Japan. For example, as one of the preliminary experiments, when F₁ hybrid between two strains, J112 and C110 was used as specimens, the results obtained were similar to those reported by Fukuda (1944). Namely, larvae were ligatured behind the head from the end of the first half of the pre-pupal stage to obtain decapitated larvae by cutting their heads off. Of about 600 decapitated larvae, most resultants died within 10 days after pupation and only 10 pupae became moths 12 to 33 days following pupation without effective induction of artificially diapausing head-less pupae. The time of ligature in the experiment mentioned above was not appropriate compared with

the experiments of Fukuda in which the ligature was performed immediately before pupation. This work was presented by Kobayashi (1957).

These facts suggest that as a general way commercial silkworm, *Bombyx mori*, is apparently due to the fact that the head critical period for prothoracicotrophic hormone (PTTH) release occurs before pupation. Therefore, the author attempted to identify a suitable strain for use in a PTTH bioassay and the chemical work of PTTH in the silkworm, *Bombyx mori*.

In this mini-review, I would like to introduce the studies on the bioassay and chemical nature of PTTH in the silkworm, *Bombyx mori*, including recent research.

BIOASSAY OF PTTH

In 1955, Kobayashi succeeded in creating 'dauer-pupae' of *Bombyx mori* suitable for use in a PTTH bioassay. Namely, the F₁ hybrid pupae crossed between the two *Bombyx* strains, J122 and C115, were used as materials in the work and were kept at 25°C throughout the experiments. Two controls received only incisions in the head and were not cerebrectomized, while the brains of the experimental animals were extirpated. The controls emerged as moths 11-14 days after pupation. In the pupae whose brains had been extirpated immediately after pupation, no imaginal differentiation was observed for more than 40 days after pupation, although some of these pupae survived for 300 days. Such pupae were called 'Dauer-pupae'. When a fresh brain obtained either from larva, pupa or moth was implanted into the 'Dauer-pupa', the latter became an imago 16-25 days after implantation (Kobayashi, 1955, 1957, 1958 ; Kobayashi and Yamashita, 1959a).

Then to examine the relationship between the brain and the prothoracic gland which had been known to be the secretory organ of ecdysone, brains of the 5th instar larvae were implanted into abdomens of other individuals of the same age and the recipients were divided into two groups : One for removing their own original brain immediately after pupation and the other for ligaturing them behind the thorax immediately after pupation to obtain isolated abdomens by cutting their head and thoracic parts off.

Both groups were kept at 25°C thereafter to see their development to moths and it was found that many moths emerged from the first group, while almost no emergence of moths was observed in the second group.

Based on the fact that the presence of the brain alone was not able to induce imaginal differentiation and even an implanted brain could induce the emergence of moths if the prothoracic glands were present in the recipients, it was concluded that a hormone (PTTH) from the brain acted as a prothoracic gland stimulant and as a result the hormone related to the induction of metamorphosis was secreted from the prothoracic gland as in the case of other insects (Kobayashi and Yamashita, 1959a).

These experiments in *Bombyx* silkworm have initiated a clearly defined concept for the function of the PTTH.

To investigate the secretory centre of the PTTH, histological and histochemical studies on the neurosecretory cells were carried out in the brain of the silkworm ; the secretion from the neurosecretory cells of types A and B in the brain was presumed to be PTTH or its precursor. A secretion produced by the neurosecretory cells flowed from the cells into the *corpus cardiacum* through the *nervi corporis cardiaci* and from there to the *corpus allatum* through the *nervi corporis allati*, and also from the cells to the blood circulation through the cortex in the brain (Kobayashi, 1957).

Moreover, Kobayashi and Yamashita (1959b ; Kobayashi, 1960) demonstrated that in *Bombyx mori* when *corpora allata* from larvae, pupae, moths or dauer pupae were implanted into dauer pupae respectively, resultants emerged as moths in 2 to 3 weeks, showing the evidence of the axonal transport of the neurosecretory material containing PTTH via the brain-*corpus cardiacum*-*allatum* system, which presumably released the neurosecretory material originating from neurosecretory cells in the brain. Nishiitsutsuji-Uwo (1961) observed by electron microscopy the ultrastructure of the neurosecretory cells, showing that the release of the neurosecretory material from the perikaryon may take place into these *canaliculi* and from there into blood sinus, but there is also indication that the elementary granules are transported via axons into the *corpora allata* and stored there. Moroshi and

Shimada (1975) demonstrated the axonal transport of the neurosecretory granules, confirming our results (Kobayashi, 1957 ; Kobayashi and Yamashita, 1959b).

Recently, Mizoguchi *et al.* (1987) demonstrated on the basis of immunohistochemical studies that bombyxin (previously termed 4K-PTTH) which showed PTTH activity in *Samia cynthia ricini*, but not in *Bombyx mori*, was produced by four pairs of mid-dorsal neurosecretory cells of the brain and transferred to and released from the *corpora allata* of *Bombyx* (see next section : CHEMICAL NATURE OF PTTH). This evidence confirms that the same cells in *Bombyx* contain insulin immunoreactive and bombyxin (1-10) [4K-PTTH A-chain] immunoreactive material (Ishizaki *et al.*, 1986), even though the physiological significance of the secretion is still unknown in *Bombyx*.

The finding of the hormonal action of the brain in the silkworm (Kobayashi, 1955) aroused our interest in the extraction of the brain hormone (PTTH).

CHEMICAL NATURE OF PTTH

In 1958 Kobayashi and Kirimura made the first attempt to obtain "brain hormone" from the pupal brains of the silkworm, *Bombyx mori*. A crude extract, which showed the PTTH activity in a dose of 0.1 mg on 'Dauer-pupae' of the silkworm, was used as a starting material for the purification of the hormone.

One of the two active fractions, which had been obtained by counter-current distribution and which differed in their chemical properties, was purified further and identified by its chemical properties as cholesterol, indicating the presence of steroid hormones in insects (Kirimura *et al.*, 1962).

Although the activity of cholesterol was confirmed by Schneiderman and Gilbert (1964), cholesterol is known to be ubiquitous in the tissues of diapausing pupae. The ability of the sterol to mimic the activity of PTTH showed a bizarre and often inverse correlation with the amount injected. The nature of the solvent for sterols (9-10 per cent ethanol) proved to be crucial for the activity, and it was concluded by Gilbert and Goodfellow (1965) that cholesterol was probably not the hormone. Moreover, Karlson and Hoffmeister (1963) studied the biosynthesis of ecdysone in *Calliphora* larvae, and demonstrated that cholesterol was the precursor of ecdysone. This finding was later confirmed in *Bombyx* by Nakanishi *et al.* (1972). From these facts, we considered that cholesterol is not the hormone and a substance which mimics the action of PTTH as indicated in a previous paper (Kobayashi and Yamazaki, 1974).

Ishizaki *et al.* (1983a) reported that 10-day-old brainless *Bombyx* pupae respond specifically to brain extracts and can serve as a reliable assay animal for PTTH. This observation indicated that 0.02 µg of cholesterol did not show any sign of the PTTH activity, even though the Kobayashi group (Kirimura *et al.*, 1962) suggested that PTTH was cholesterol using 42-day-old, brainless *Bombyx* pupae as bioassay animals of the PTTH and that the sensitivity of the dauer pupae increased as demonstrated by the injection of heavy metals and various other nonspecific substances (Nishiitsutsuji-Uwo, 1972 ; Nishiitsutsuji-Uwo and Nishimura, 1975).

However, we have shown earlier that, in normal pupae of the silkworm, the rise and fall of both oxygen consumption and glycogen content are the same as in other insects, while in the dauer pupae, oxygen consumption remains at a low level for more than 100 days after pupation and glycogen content at a high level (Kobayashi, 1957). The electrophoretic pattern of blood protein in the dauer pupae coincides with that of normal young pupae for about 3 months (Aizawa *et al.*, 1960). Moreover, the nuclei in *corpora allata* in the dauer pupae are almost round or elliptical in shape until about 140 days of age and after that stage, the contour of the nuclei becomes irregular, suggesting increased activity (Kobayashi and Burdette, 1971). From the results mentioned above, we considered that the physiological condition of the dauer pupae of the silkworm is stable for a definite time after the extirpation of their brains.

Also in our long experience about the physiological characteristics of dauer pupae in *Bombyx* silkworm, we understand with Ishizaki's postulation (Ishizaki *et al.*, 1983a) that the sensitivity of the elder dauer pupae to mimic substances of PTTH was higher than that of younger ones. In addition yield of developmentally arrested, brainless pupae for assay was still found to vary greatly with

nutritional status, seasonal differences and parental history (Kobayashi, 1955, 1957; Kobayashi and Yamashita, 1958; Kobayashi *et al.*, 1960; Ishizaki, 1972; Ishizaki and Suzuki, 1980).

On the other hand, Ichikawa and Ishizaki (1961, 1963) reported that a water soluble fraction of a methanol extract of silkworm pupal brains exhibited the brain hormone activity, suggesting the presence of the PTTH. The purification was further pursued by column chromatography.

To purify a water soluble active fraction obtained by the counter-current distribution mentioned above (Kobayashi, 1963; Saito *et al.*, 1963), Kobayashi and Yamazaki (1966) ground silkworm brain in 0.1 M phosphate buffer, centrifuged it, purified it and the supernatant liquid through a CM-cellulose column and obtained a highly purified substance with PTTH activity. Gel filtration indicated that the active moiety had an apparent molecular weight of about 20,000. The hormonal activity in the crude extract was found to be resistant to trypsin and chymotrypsin but destroyed by Pronase and Nagarse.

Ishizaki and Ichikawa (1967) purified an extract of *Bombyx* brains by gel filtration on Sephadex and chromatography on a column of DEAE cellulose and obtained three active fractions, among which the most active fraction showed the hormone activity in a dose of 0.002 µg protein on *Samia cynthia pryeri* and was estimated to be 9,000-31,000 in molecular weight.

Williams (1968) had also studied the brain hormone in *Antheraea* and confirmed the results obtained by other investigators. However, he suspected the brain hormone was protein and guessed it may be mucopolysaccharide on the basis of such properties as its heat stability, its lack of specific absorption at 280 nm, its sensitivity to pepsin, trypsin and chymotrypsin, and its insensitivity to maneuvers which historically have been used to remove the last traces of protein.

In 1969, Yamazaki and Kobayashi reported the results of further purification studies of 20kDa PTTH. The hormone was heat stable, resistant to incubation with chymotrypsin, but inactivated by trypsin, Pronase, or Nagarse. Its molecular weight was estimated to 20,000 by gel filtration on Sephadex G-100. The isoelectric point of the hormone was pH 8.35-8.65. They suggested that it may be a glycopeptide on the basis of analysis for sugar contents.

By means of the procedure previously reported by Ishizaki and Ichikawa (1967), the changes in titer of brain hormone extracted from the brain, head, thorax, and abdomen during the development of *Bombyx mori* from the 4th larval moulting up to 6 days after adult emergence were investigated by Ishizaki (1969). It was shown that the head of an adult *Bombyx* silkworm contained approximately 50 *Samia* units of activity, in contrast to the pupal brain content of about 10-15 units. But it is not confirmed in *Bombyx mori* whether or not *Bombyx* PTTH activity in the head extract is originated from the secretion of the brain. The experiment was performed in order to confirm this matter by Kobayashi and Yamazaki (1978). As the results, it was found that *Bombyx* PTTH was not contained within the head of brainless moth induced from the dauer pupa of *Bombyx mori* by the injection of ecdysone, even though the hormone was contained within the head of the normal moth and that the nature of the active ingredient in the head of *Bombyx* moth seems to be the same as that in the brain of *Bombyx* pupa on chemical characteristics (Yamazaki and Kobayashi, 1969).

Nishiitsutsuji-Uwo (1972) partially purified PTTH following chemical procedure by Ishizaki and Ichikawa (1967) using *Bombyx* moth heads as materials for extraction and considered that the substance was a peptide with a molecular mass of less than 5kDa.

A few years later Suzuki *et al.* (1975) attempted the partial purification of PTTH using *Samia* assay and a purification procedure similar to that of Nishiitsutsuji-Uwo (1972). The molecular mass of the active principle extracted by this procedure was less than 5kDa.

Ishizaki *et al.* (1977) who analyzed the stability of partially purified PTTH treated with various enzymes and chemical reagents using *Samia* assay, showed that: (1) PTTH was a peptide, (2) the moiety with PTTH activity did not contain sugar, (3) N- and C-termini of the PTTH molecule were blocked, (4) a disulfide bond was essential for the activity, but a sulfhydryl group was not essential.

Nagasawa *et al.* (1979) reported that highly purified PTTH from adult heads of *Bombyx mori* has a molecular weight of ca 4,400 (Suzuki *et al.*, 1982; Nagasawa *et al.*, 1984a). This PTTH was able to induce the adult development of a dauer pupa of Eri-silkworm, *Samia cynthia ricini*, whereas it caused no adult development of a dauer pupa of the silkworm, *Bombyx mori* (Ishizaki *et al.*, 1983b). On the contrary, Kobayashi and Yamazaki (1966; Yamazaki and Kobayashi, 1969) purified PTTH from *Bombyx* pupal brain by using *Bombyx* dauer pupae as a test object and they obtained an active

protein with a molecular weight of 20,000 whose chromatographic behaviour and isoelectric point differed from those of the PTTH obtained by the Ishizaki and Suzuki group.

The reason for the discrepancy in the results obtained by the two groups on the molecular weight of PTTH in the silkworm, *Bombyx mori*, remained to be elucidated, even though different animals were used for the bioassay.

In 1983, the discrepancy mentioned above was resolved by the Ishizaki group who confirmed the presence of 22K-PTTH which specifically activated *Bombyx* pupae. Ishizaki *et al.* (1983b) described that the *Bombyx* brain contains PTTH-B and PTTH-S from their findings and PTTH-B is Kobayashi's while PTTH-S is Ishizaki and Suzuki's. They stated that the adult heads of the silkworm, *Bombyx mori*, have two kinds of PTTHs: 4K-PTTH, which is active to brainless pupae of *Samia cynthia ricini* and whose molecular weight is estimated to be 4,400 and 22K-PTTH, which is active to brainless pupae of *Bombyx mori* and whose molecular weight is estimated to be 22,000 (Ishizaki *et al.*, 1983b; Ishizaki and Suzuki, 1984).

Incidentally, Bollenbacher *et al.* (1984) reported that in the brain of tobacco hornworm, *Manduca sexta*, PTTH exists as two molecular forms, a big one (above 29kDa) and a small one (7kDa). They also demonstrated that the two PTTHs elicit the characteristic *in vitro* dose responses of activation of prothoracic glands of different developmental stages, indicating that the glands change in their sensitivity to the neurohormones. Thereafter O'Brien *et al.* (1986) made clear that the relative amounts of the two PTTHs changed from selected stages of the larval and pupal periods using an *in vitro* assay which monitors stimulation of ecdysone synthesis by prothoracic glands in response to PTTH. These findings on the PTTHs in *Manduca sexta* appear to differ substantially from the findings on the two neurohormones, 4K-PTTH and 22K-PTTH, in *Bombyx mori*.

On the other hand, we further purified on the PTTH from heads of *Bombyx* moths (Matsuo *et al.*, 1985; this work was preliminary reported at the 16th International Congress of Entomology, Kyoto, 1980). The highly purified hormone labeled with ¹²⁵I gave as a single band with a molecular weight of 18,000 on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The isolated hormone was likely to be a single polypeptide which induced adult development affecting the prothoracic gland in the dauer pupa of the *Bombyx* silkworm. Also, the PTTH induced a significant stimulation of RNA synthesis in cultured prothoracic glands, indicating a predominant increase in the synthesis of ribosomal RNA but it did not affect the *in vitro* uridine incorporation into the RNA of both the salivary gland and subesophageal ganglion of the dauer pupa of *Bombyx mori* (Aizono *et al.*, 1986).

Suzuki (1986) commented upon the report mentioned above (Matsuo *et al.*, 1985) that the active principle in the preparation may be similar molecular form to 22K-PTTH in view of its basic nature and molecular weight (Mr. 20,000) estimated from Sephadex G-75 chromatography, indicating the presence of at least 4 species of 22K-PTTH. Suzuki and his colleagues also showed that the molecular species of PTTH with a molecular weight of about 22,000 (22K-PTTH) is a basic protein (pI 7.7-8.7) containing disulfide bond(s). The amino-terminal amino acid sequence of 22K-PTTH was determined to be H-Gly-Asn-Ile-Gln-Val-Glu-Asn-Gln-Ala-Ile-Pro-Asp-Pro-Pro-Cys-Thr-Cys-Lys-Tyr-Lys- (Kataoka *et al.*, 1987; Suzuki, 1988).

In 1984, Nagasawa *et al.* (b) isolated these three molecular forms of the prothoracicotropic hormone i.e. 4K-PTTH-I, 4K-PTTH-II, and 4K-PTTH-III from the head of the *Bombyx* moth, and the amino acid sequence of 19 amino acid residues in the amino terminus of these prothoracicotropic hormones was determined. These residues showed significant homology with insulin and insulin-like factors.

Further studies on the 4K-PTTH-II have been carried out by Nagasawa *et al.* (1986). They have determined the complete amino acid sequence of 4K-PTTH-II which is active to brainless pupae of *Samia cynthia ricini*. Like vertebrate insulin, 4K-PTTH-II consisted of two nonidentical peptide chains (A and B chains). The A chain consisted of 20 amino acid residues. The B chain was a mixture of four micro-heterogeneous peptides, two of which consisted of 28 residues, and the other two, of 26 residues. 4K-PTTH-II has a considerable sequence homology (40 %) with human insulin. The identical distribution of the six cysteine residues also indicates that 4K-PTTH-II belongs to the insulin family.

Furthermore, a three-dimensional model of PTTH-II showed that PTTH-II can assume an insulin-like tertiary structure (Jhoti *et al.*, 1987).

Nagasawa *et al.* (1988) described the structure and synthesis of 4K-PTTH from the silkworm, *Bombyx mori* and this brain neuropeptide was designated as bombyxin. Also, bombyxin-IV was isolated and the primary structure of bombyxin-IV was determined by Maruyama *et al.* (1988), indicating that the isolated bombyxin-IV showed a specific activity of 0.1 ng/*Samia* unit, almost equal to that of bombyxin-I, -II, and -III. Thereafter a genomic DNA encoding bombyxin, 5kDa brain peptide (MW. ca. 5,000, previously termed 4K-PTTH) was isolated from the *Bombyx* silkworm, confirming that the bombyxin gene has no intron in contrast to other members of the insulin-gene family (Iwami *et al.*, 1989). Gene cloning by using oligonucleotide probes for *Bombyx* PTTH may promise more effective progress toward the determination of the PTTH primary structure of other insects.

Recently, the Ishizaki and Suzuki group has succeeded in analysing of molecular structure of *Bombyx* PTTH (previously termed 22K-PTTH) by means of gene cloning (Ishizaki's personal communication, 1989 ; see NOTE ADDED IN PROOF).

Also, Bollenbacher and Granger (1985) postulated that the *Manduca* PTTH appears to be similar to the putative larger molecular weight PTTHs isolated initially from *Bombyx* brains.

FURTHER IMPROVEMENT

Although the purification of PTTH has been carried out in some laboratories, using suitable bioassay animals such as *Bombyx*, *Manduca*, or others, the isolation of the hormones in those insects and analyses in molecular terms of genuine PTTH in each test-object remained as continuous matter.

It is likely that the purification of genuine PTTH will not be easy as the quantity of the hormone per head of insect is extremely small. In the silkworm, however, considerable progress has been made towards the determination of the molecular terms of PTTH.

It is therefore expected that progress will be made in the studies on the determination of the chemical nature of genuine PTTH and the elucidation of various mechanisms, including the stimulation of the action of the prothoracic gland as well as the secretion of ecdysone from the gland, opening the gate to modern biology.

NOTE ADDED IN PROOF

Since the preparation of this review, Kawakami *et al.* (1990) have reported the complete amino acid sequence of the 30kDa-PTTH molecule of *Bombyx mori*, which was previously termed 22K-PTTH but is now considered to be 30kDa from SDS electrophoresis data, by means of gene cloning. Also, they describe the PTTH to be synthesized by two pairs of dorsolateral neurosecretory cells which react immunochemically with monoclonal antibody that recognizes PTTH as is shown two pairs of brain neurosecretory cells at a similar position in *Manduca sexta* (O'Brien *et al.*, 1988). They also recognized the previous evidence that *Bombyx* PTTH is a glycoprotein (Yamazaki and Kobayashi, 1969) on the basis of identification on glycosylation site.

REFERENCES

- AIZAWA K., KOBAYASHI M., ABE F. (1960), Electrophoresis on filter paper of blood protein of the "Dauer-pupae" in the silkworm, *Bombyx mori*. J. Sericult. Sci., Japan, 29, 197-202.
 AIZONO Y., MATSUO N., YOSHIDA Y., FUNATSU G., FUNATSU M., KOBAYASHI M. (1986), *In vitro* action of prothoracicotrophic hormone on RNA-synthesis in the prothoracic gland of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol., 32(8), 711-717.
 ARVY L., BOUNHIOL J.-J., GABE M. (1953), Déroulement de la neuro-sécrétion protocérébrale chez *Bombyx mori* L. au cours du développement post-embryonnaire. C.R. Acad. Sci., 236, 627-629.
 BOLLENBACHER W.E., KATAHIRA E.J., O'BRIEN M., GILBERT L.I., THOMAS M.K., AGUI N., BAUMHOVER A.H. (1984), Insect prothoracicotrophic hormone : Evidence for two molecular forms. Science, 224, 1243-1245.

- BOLLENBACHER W.E., GRANGER N. (1985), Endocrinology of the prothoracicotrophic hormone. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Ed. by Kerkut G.A. and Gilbert L.I., 7, 109-151. Pergamon Press, Oxford, New York.
- BOUNHIOL J.-J. (1952a), L'achèvement de la métamorphose et la mue imaginale seraient commandés par le cerveau à la fin de la vie larvaire chez *Bombyx mori* L. C.R. Acad. Sci., 235, 671-672.
- BOUNHIOL J.-J. (1952b), Nature probablement sécrétoire du facteur cérébral conditionnant la mue imaginale de *Bombyx mori* L. C.R. Acad. Sci., Paris, 235, 747-748.
- BOUNHIOL J.-J., GABE M., ARVY L. (1953), Données histophysiologiques sur la neurosécrétion chez *Bombyx mori* L. et sur ses rapports avec les glandes endocrines. Bull. Biol. Fran., Bel., 87, 323-333.
- FUKUDA S. (1940a), Induction of pupation in silkworm by transplanting the prothoracic gland. Proc. Imp. Acad. Jpn., 16, 414-416.
- FUKUDA S. (1940b), Hormonal control of moulting and pupation in the silkworm. Proc. Imp. Acad. Jpn., 16, 417-420.
- FUKUDA S. (1944), The hormonal mechanism of larval moulting and metamorphosis in the silkworm. J. Fac. Sci. Tokyo Imp. Univ., 6, 447-532.
- GILBERT L.I., GOODFELLOW R.D. (1965), Endocrinological significance of sterols and isoprenoids in the metamorphosis of the American silkworm, *Hyalophora cecropia*. Zool. JB. Abt. Physiol., 71, 718-726.
- ICHIKAWA M., ISHIZAKI H. (1961), Brain hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. Nature, 191, 933-934.
- ICHIKAWA M., ISHIZAKI H. (1963), Protein nature of the brain hormone of insects. Nature, 191, 308-309.
- ISHIZAKI H., ICHIKAWA M. (1967), Purification of the brain hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. Biol. Bull., 133, 355-368.
- ISHIZAKI H. (1969), Changes in titer of the brain hormone during development of the silkworm, *Bombyx mori*. Devel. Growth Differ., 11, 1-7.
- ISHIZAKI H. (1972), Arrest of adult development in debrained pupae of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol., 18, 1621-1627.
- ISHIZAKI H., SUZUKI A., ISOGAI A., NAGASAWA H., TAMURA S. (1977), Enzymatic and chemical inactivation of partially purified prothoracicotrophic (brain) hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol., 23, 1219-1222.
- ISHIZAKI H., SUZUKI A. (1980), Prothoracicotrophic hormone. In *Neurohormonal Techniques in Insects*. Ed. by Miller T.A., 244-276. Springer-Verlag, New York.
- ISHIZAKI H., SUZUKI A., MORIYA I., MIZOGUCHI A., FUJISHITA M., O'OKA H., KATAOKA H., ISOGAI A., NAGASAWA H., SUZUKI A. (1983a) Prothoracicotrophic hormone bioassay : Pupal-adult *Bombyx* assay. Devel. Growth and Differ., 25(6), 585-592.
- ISHIZAKI H., MIZOGUCHI A., FUJISHITA M., SUZUKI A., MORIYA I., O'OKA H., KATAOKA H., ISOGAI A., NAGASAWA H., TAMURA S., SUZUKI A. (1983b), Species specificity of the insect prothoracicotrophic hormone (PTTH) : the presence of *Bombyx* and *Samia* specific PTTHs, in the brain of *Bombyx mori*. Devel. Growth and Differ., 25(6), 593-600.
- ISHIZAKI H., SUZUKI A. (1984), Prothoracicotrophic hormone of *Bombyx mori*. In *Biosynthesis, metabolism and mode of action of invertebrate hormones*. Ed. by Hoffmann J. and Porchet M., 63-77. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- ISHIZAKI H., MIZOGUCHI A., HATTA M., SUZUKI A., NAGASAWA H., KATAOKA H., ISOGAI A., TAMURA S., FUJINO M., KATADA C. (1986), Prothoracicotrophic hormone (PTTH) of the silkworm, *Bombyx mori* : 4K-PTTH. UCLA Symp., Molecular Entomology, 119-128. Steamboat, Springs, Colorado.
- IWAMI M., KAWAKAMI A., ISHIZAKI H., TAKAHASHI S.Y., ADACHI T., SUZUKI Y., NAGASAWA H., SUZUKI A. (1989), Cloning of a gene encoding bombyxin, an insulin-like brain secretory peptide of the silkworm, *Bombyx mori* with prothoracicotrophic activity. Devel. Growth Differ., 31(1), 31-37.

- JHOTI H., McLEOD A.N., BLUNDELL T.L., ISHIZAKI H., NAGASAWA H., SUZUKI A. (1987), Prothoracicotrophic hormone has an insulin-tertiary structure, *FEBS Lett.*, 219(2), 419-425.
- KARLSON P., HOFFMEISTER H. (1963), Zur Biogenese des Ecdysons. I. Umwandlung von Cholesterin in Ecdyson. *Hoppe-Seylers. Z. Physiol. Chem.*, 331, 298-300.
- KATAOKA H., NAGASAWA H., ISOGAI A., TAMURA S., MIZOGUCHI A., FUJIWARA Y., SUZUKI C., ISHIZAKI H., SUZUKI A. (1987), Isolation and partial characterization of a prothoracicotrophic hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Agric. Biol. Chem.*, 51(4), 1067-1076.
- KAWAKAMI A., KATAOKA H., OKA T., MIZOGUCHI A., KIMURA-KAWAKAMI M., ADACHI T., IWAMI M., NAGASAWA H., SUZUKI A., ISHIZAKI H. (1990), Molecular cloning of the *Bombyx mori* prothoracicotrophic hormone. *Science*, in press.
- KERKUT G.A., GILBERT L.I. (1985), *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, 7 and 8. Pergamon Press, Oxford, New York.
- KIRIMURA J., SAITO M., KOBAYASHI M. (1962), Steroid hormone in an insect, *Bombyx mori*. *Nature*, 195, 729-730.
- KOBAYASHI M. (1955), Relationship between the brain hormone and the imaginal differentiation of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Sericult. Sci., Japan*, 24, 389-392.
- KOBAYASHI M. (1957), Studies on the neurosecretion in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Bull. Sericult. Exp. Sta. Japan*, 15, 181-273.
- KOBAYASHI M. (1958), Effect of larval brain on the imaginal differentiation in the silkworm. *Nature*, 182, 110-111.
- KOBAYASHI M., KIRIMURA J. (1958), The "brain" hormone in the silkworm, *Bombyx mori*. *Nature*, 181, 1217.
- KOBAYASHI M., YAMASHITA Y. (1958), Seasonal differences in the rates of the appearance of "Dauer-pupa" in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Sericult. Sci., Japan*, 27, 93-98.
- KOBAYASHI M., YAMASHITA Y. (1959a), Effect of the imaginal brain on the imaginal differentiation and the hormonal system on the brain in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Sericult. Sci., Japan*, 28, 67-71.
- KOBAYASHI M., YAMASHITA Y. (1959b), A function of corpus allatum in neurosecretory system in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Sericult. Sci., Japan*, 28, 335-339.
- KOBAYASHI M. (1960), Function of the corpus allatum in "Dauer-pupa" of the silkworm, *Bombyx mori*. *Nature*, 187, 346-347.
- KOBAYASHI M., FUKAYA M., MITSUHASHI J. (1960), Imaginal differentiation of "Dauer-pupa" in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Sericult. Sci., Japan*, 29, 337-340.
- KOBAYASHI M. (1963), The chemistry and physiology of the brain hormone. *Proc. XVI Int. Cong. Zool.*, 4, 226-233.
- KOBAYASHI M., YAMAZAKI M. (1966), The proteinic brain hormone in an insect, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Ent. Zool.*, 1, 53-60.
- KOBAYASHI M., BURDETTE W.J. (1971), Histophysiological studies on the corpora allata in dauer pupae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Entomol. Essays to Commemorate the Retirement of Prof. K. Yasumatsu*, 243-252.
- KOBAYASHI M., YAMAZAKI M. (1974), Brain hormone. *In Invertebrate Endocrinology and Hormonal Heterophyly*. Ed. by Burdette W.J. 29-42. Springer-Verlag, New, Heidelberg, Berlin.
- KOBAYASHI M., YAMAZAKI M. (1978), Brain hormone in the head of *Bombyx* moth (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Ent. Zool.*, 13, 129-130.
- KOPEĆ S. (1922), Studies on the necessity of the brain for the inception of insect metamorphosis. *Biol. Bull.*, 42, 323-342.
- MARUYAMA K., HIETTER H., NAGASAWA H., ISOGAI A., TAMURA S., SUZUKI A., ISHIZAKI H. (1988), Isolation and primary structure of bombyxin-IV, a novel molecular species of bombyxin from the silkworm, *Bombyx mori*. *Agric. Biol. Chem.*, 52(12), 3035-3041.
- MATSUO N., AIZONO Y., FUNATSU G., FUNATSU M., KOBAYASHI M. (1985), Purification and some properties of prothoracicotrophic hormone in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*, 15(2), 189-195.
- MIZOGUCHI A., ISHIZAKI H., NAGASAWA H., KATAOKA H., ISOGAI H., TAMURA S., SUZUKI A., FUJINO M., KITADA C. (1987), A monoclonal antibody against a synthetic fragment

- of bombyxin (4K-prothoracicotrophic hormone) from the silkworm, *Bombyx mori* : characterization and immunohistory. *Molecul. Cell. Endocr.*, 51, 227-235.
- MOROHOSHI S., SHIMADA J. (1975), The control of growth and development in *Bombyx mori*. XXVII. Release of the brain hormone from the corpora allata through nerve axons from brain neurosecretory cells. *Proc. Jpn. Acad.*, 51, 744-748.
- NAGASAWA H., ISOGAI A., SUZUKI A., TAMURA S., ISHIZAKI H. (1979), Purification and properties of the prothoracicotrophic hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Devel. Growth and Differ.*, 21, 29-38.
- NAGASAWA H., KATAOKA H., HORI Y., ISOGAI A., TAMURA S., SUZUKI A., GUO F., ZHONG X., MIZOGUCHI A., FUJISHITA M., TAKAHASHI S.Y., OHNISHI E., ISHIZAKI H. (1984a), Isolation and some characterization of the prothoracicotrophic hormone from *Bombyx mori*. *Gen. Comp. Endocr.*, 53, 143-152.
- NAGASAWA H., KATAOKA H., ISOGAI A., TAMURA S., SUZUKI A., ISHIZAKI H., MIZOGUCHI A., FUJIWARA Y., SUZUKI A. (1984b), Amino-terminal amino acid sequence of the silkworm prothoracicotrophic hormone : Homology with insulin. *Science*, 226, 1344-1345.
- NAGASAWA H., KATAOKA H., ISOGAI A., TAMURA S., SUZUKI A., MIZOGUCHI A., FUJIWARA Y., SUZUKI A., TAKAHASHI Y., ISHIZAKI H. (1986), Amino acid sequence of a prothoracicotrophic hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 83, 5840-5843.
- NAGASAWA H., MARUYAMA K., SATO B., HIETTER H., KATAOKA H., ISOGAI A., TAMURA S., ISHIZAKI H., SEMBA T., SUZUKI A. (1988), Structure and synthesis of bombyxin from the silkworm, *Bombyx mori*. In *Peptide Chemistry*. Ed. by Shiba T. and Sakakibara S., 122-126. Protein Research Foundation, Osaka.
- NAKANISHI K., MORIYAMA H., OKAUCHI T., FUJIOKA S., KOREEDA M. (1972), Biosynthesis of α - and β -ecdysones from cholesterol outside the prothoracic gland in *Bombyx mori*. *Science*, 176, 51-52.
- NISHITSUTSUJI-UWO J. (1961), Electron microscopic studies on the neurosecretory system in Lepidoptera. *Z. Zellforsch. Mik. Anat.*, 54, 613-630.
- NISHITSUTSUJI-UWO J. (1972), Purification and some properties of insect brain hormone extracted from silkworm heads. *Botyu-Kagaku*, 37, 93-111.
- NISHITSUTSUJI-UWO J., NISHIMURA M.S. (1975), Brain hormone contained in the silkworm body of *Bombyx mori*. *Experimentia*, 31, 1105-1107.
- O'BRIEN M.A., GRANGER N.A., AGUI N., GILBERT L.I., BOLLENBACHER W.E. (1986), Prothoracicotrophic hormone in the developing brain of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* : Relative amounts of two molecular forms. *J. Insect Physiol.*, 32, 719-725.
- O'BRIEN M.A., KATAHIRA E.J., FLANAGAN T.R., ARNOLD L.W., HAUGHTON G., BOLLENBACHER W.E. (1988), A monoclonal antibody to the insect prothoracicotrophic hormone. *J. Neurosci.*, 8, 3247-3257.
- SAITO M., KIRIMURA J., KOBAYASHI M. (1963), Isolation and identification of the "brain" hormone in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Bull. Sericul. Exp. Sta. Japan*, 18, 173-190.
- SCHNEIDERMAN H.A., GILBERT L.I. (1964), Control of growth and development in insects. *Science*, 143, 325-333.
- SUZUKI A., ISOGAI A., HORII T., ISHIZAKI H., TAMURA S. (1975), A simple procedure for partial purification of silkworm brain hormone. *Agric. Biol. Chem.*, 39(11), 2157-2162.
- SUZUKI A., NAGASAWA H., KATAOKA H., HORI Y., ISOGAI A., TAMURA S., GUO F., ZHONG X., ISHIZAKI H., FUJISHITA M., MIZOGUCHI A. (1982), Isolation and characterization of prothoracicotrophic hormone from silkworm, *Bombyx mori*. *Agric. Biol. Chem.*, 46(4), 1107-1109.
- SUZUKI A. (1986), Prothoracicotrophic hormones and neurohormones in *Bombyx mori*. In *Insect Neurochemistry and Neurophysiology*. Ed. by Botkovec A.B. and Gelman D.B., 29-51. The Humana Press, New Jersey.
- SUZUKI A. (1988), Bioorganic chemistry of insect neuropeptides. *Nippon Nōgeikagaku Kaishi*, 62(10), 1435-1442.
- VAN DER KLOOT W.G. (1962), Comparative endocrinology of the invertebrates. *Ann. Rev. Ent.*, 24, 491-516.

- WEYER F. (1935), Über drusenartige Nervenzeller in Gehirn der Honigbiene, *Apis mellifica* L. Zool. Anz., 112, 137-141.
- WIGGLESWORTH V.B. (1940), The determination of characters at metamorphosis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). J. Exp. Biol., 17, 201-222.
- WILLIAMS C.M. (1947), Physiology of insect diapause. II. Interaction between the pupal brain and prothoracic glands in the metamorphosis of the giant silkworm, *Platysamia cecropia*. Biol. Bull., 93, 89-98.
- WILLIAMS C.M. (1952), Physiology of insect diapause. IV. The brain and prothoracic glands as an endocrine system in the *cecropia* silkworm. Biol. Bull., 103, 120-138.
- WILLIAMS C.M. (1968), The present status of the brain hormone. In *Insect and Physiology*. Ed. by Beament J.W.L. and Treherne J.E. 133-139. American Elsevier, New York.
- YAMAZAKI M., KOBAYASHI M. (1969), Purification of the proteinic brain hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol., 15, 1981-1990.

HISTORIQUE DE L'ETUDE DE L'HORMONE PROTHORACICOTROPE CHEZ LE VER A SOIE *BOMBYX* *MORI*

M. KOBAYASHI

Lotte Central Laboratory, Numakage, Urawa, Saitama, 336 Japon.

L'endocrinologie du ver à soie Bombyx mori préoccupe depuis longtemps les sériciculteurs, tant sur les plans scientifique que pratique. Cet article vise à présenter un bref historique des dosages biologiques et de la nature chimique de l'hormone prothoracicotrope chez cet insecte.

INTRODUCTION

Chez les insectes, la fonction endocrine du cerveau a été décrite pour la première fois chez *Lymantria dispar* par Kopeč (1922). Weyer (1935) a découvert par la suite des cellules neurosécrétrices, c'est-à-dire les cellules nerveuses qui donnent des signes d'activité sécrétoire, dans le cerveau d'*Apis mellifica*. Des observations histophysiologiques des cellules neurosécrétrices du cerveau ont également été réalisées par Arvy et coll. (1953) et Bounhiol et coll. (1953). La première preuve du fonctionnement de cellules neurosécrétrices a été apportée par Wigglesworth (1940) qui a démontré que la mue de *Rhodnius prolixus* était déclenchée par un facteur hormonal provenant de la région dorsale du protocérébrum qui contient les cellules neurosécrétrices. De nombreuses études concernant le contrôle hormonal de la croissance et du développement ont ensuite été effectuées (voir la revue de Van der Kloot, 1962). Un grand nombre de recherches sur le système de l'action hormonale dans la différenciation imaginale ont été réalisées chez *Hyalophora cecropia* (Williams, 1947, 1952) et chez d'autres insectes (voir la revue de Kerkut et Gilbert, 1985).

Williams (1947, 1952) a découvert que la diapause de la chrysalide de *Hyalophora cecropia* était provoquée par l'inactivation du cerveau de la chrysalide. L'hypothèse classique admet que le cerveau est activé par exposition à basse température et qu'il sécrète une hormone qui affecte la glande prothoracique. Celle-ci sécrète alors une hormone de la glande prothoracique (hormone de mue, ecdysone) qui induit la métamorphose.

Cependant, chez le ver à soie *Bombyx mori*, la diapause n'a pas lieu au stade chrysalide. Pendant longtemps, on a cru que le cerveau n'était pas nécessaire à l'induction de la métamorphose, Fukuda (1940a, b) ayant observé que, chez des hybrides F₁ de souches japonaise et chinoise, le développement de la chrysalide en l'adulte chez *Bombyx* ne pouvait être écourté par extirpation cérébrale aussitôt après l'ecdysis larve-chrysalide, observation qui fut ensuite confirmée par Bounhiol (1952a, b).

En outre, des expériences similaires furent effectuées par l'auteur au début des années 50 sur plusieurs souches de ver à soie *Bombyx mori*. A l'époque, l'utilisation de plus de 40 souches parentales et de 25 hybrides F₁ furent autorisée par le Ministère de l'Agriculture, des Forêts et de la Pêche comme souches commerciales pour l'élevage du ver à soie dans les exploitations séricicoles japonaises. Ainsi, au cours d'une expérience préliminaire qui portait sur des hybrides F₁ des souches J112 et C110 utilisées comme spécimens, les résultats obtenus se sont révélés similaires à ceux obtenus par Fukuda (1944). A savoir, les larves furent ligaturées derrière la tête dès la fin de la première moitié du stade pré-nymphal en vue d'obtenir des larves décapitées. Des quelque 600 larves décapitées, la plupart moururent dans les 10 jours suivant la pupaison et seulement 10 chrysalides atteignirent le stade de papillon 12 à 33 jours après la pupaison sans qu'il y ait eu une induction efficace de chrysalides étêtées.

artificiellement diapausantes. Le moment de la ligature dans l'expérience décrite ci-dessus ne correspond pas à celui de l'expérience réalisée par Fukuda, celle-ci ayant été faite juste avant la pupaison. Ce travail a été présenté par Kobayashi (1957).

Ces observations suggèrent que, d'une façon générale, chez le ver à soie commercial *Bombyx mori*, la période de libération de l'hormone prothoracicotrope dans la tête (PTTH) intervient avant la pupaison. L'auteur a donc tenté d'identifier une souche permettant un dosage biologique de la PTTH et d'étudier la chimie de la PTTH chez le ver à soie *Bombyx mori*.

Dans ce court historique, j'aimerais présenter les études portant sur le dosage biologique et la nature chimique de la PTTH chez le ver à soie *Bombyx mori*, y compris les derniers travaux réalisés.

DOSAGE BIOLOGIQUE DE LA PTTH

En 1955, Kobayashi réussit à obtenir des "chrysalides permanentes" de *Bombyx mori* adaptées au dosage biologique de la PTTH. Les chrysalides d'hybrides F₁ provenant du croisement entre les souches de *Bombyx* J122 et C115 servirent de matériel expérimental. Elles furent maintenues à une température de 25°C tout au long des expériences. De simples incisions ont été pratiquées sur la tête de deux témoins qui n'ont pas été cérébrectomisés, tandis que les cerveaux des animaux expérimentaux ont été extirpés. Les témoins atteignirent le stade papillon 11 à 14 jours après la pupaison. Chez les chrysalides dont le cerveau avait été extirpé tout de suite après la pupaison, on n'a remarqué aucune différenciation imaginale pendant plus de 40 jours après la pupaison, bien que certaines de ces chrysalides aient survécu pendant 300 jours ; celles-ci furent appelées "chrysalides permanentes". Quand un cerveau frais prélevé sur la larve, la chrysalide ou le papillon était greffé chez une "chrysalide permanente", celle-ci se transformait en imago 16 à 25 jours après la greffe (Kobayashi, 1955, 1957, 1958 ; Kobayashi et Yamashita, 1959a).

Des cerveaux de larves du cinquième âge furent ensuite greffés sur l'abdomen d'autres individus du même âge afin d'étudier la relation entre le cerveau et la glande prothoracique, connue comme organe sécréteur d'ecdysone. Les animaux receveurs furent divisés en deux groupes : le cerveau originel des individus du premier groupe fut prélevé tout de suite après la pupaison et les individus du second groupe furent ligaturés derrière le thorax immédiatement après la pupaison afin d'isoler l'abdomen en sectionnant la tête et la partie thoracique.

Les deux groupes furent ensuite maintenus à 25°C afin d'observer le développement jusqu'au stade papillon, il apparut que de nombreux papillons émergeaient dans le premier groupe, tandis que pratiquement aucune émergence n'a pu être observée dans le second groupe.

Du fait que la présence du seul cerveau ne peut induire de différenciation imaginale et que même un cerveau implanté peut induire l'émergence des papillons si les glandes prothoraciques sont présentes chez le receveur, il a été conclu qu'une hormone (PTTH) issue du cerveau stimule la glande prothoracique et que l'hormone liée à l'induction de la métamorphose est donc sécrétée par la glande prothoracique, comme c'est le cas pour d'autres insectes.

Ces expériences sur *Bombyx mori* ont donc permis de définir clairement le concept de la fonction de la PTTH.

Des études histochimiques et histologiques des cellules neurosécrétrices ont été effectuées sur le cerveau du ver à soie afin de connaître le centre sécréteur de la PTTH. Il a été supposé que la sécrétion émanant des cellules neurosécrétrices de types A et B dans le cerveau était la PTTH ou son précurseur. La sécrétion produite par les cellules neurosécrétrices s'écoule depuis les cellules jusqu'au *corpus cardiacum* à travers le *nervi corporis cardiaci* et de là au *corpus allatum* par le *nervi corporis allati* et également depuis les cellules jusqu'à la circulation sanguine par le cortex dans le cerveau (Kobayashi, 1957).

De plus, Kobayashi et Yamashita (1959b) et Kobayashi (1960) ont démontré que, chez *Bombyx mori*, lorsque les *corpora allata* des larves, des chrysalides, des papillons ou des chrysalides permanentes étaient respectivement implantés dans les chrysalides permanentes, les papillons émergeaient dans les deux à trois semaines, ce qui prouve le transport axonal du matériel neurosécrétoire contenant la PTTH via le système cerveau-*corpus cardiacum*-*allatum* qui libère probablement le matériel neurosécrétoire issu des cellules neurosécrétrices dans le cerveau. Nishiitsutsuji-Uwo (1961) a observé au microscope électronique l'ultrastructure des cellules

neurosecrétices et montré que la libération du matériel neurosecrétoire du périkaryon pourrait se produire dans ces *canaliculi* et de là dans le sinus sanguin. Toutefois il semblerait que des granules élémentaires soient transportés via les axones dans les *corpora allata* où ils sont stockés. Morohoshi et Shimada (1975) ont démontré le transport axonal des granules neurosecréteurs, ce qui confirme nos résultats (Kobayashi, 1957 ; Kobayashi et Yamashita, 1959b).

Récemment, Mizoguchi et coll. (1987) ont établi, sur la base d'études immuno-histochimiques, que la bombyxine (précédemment dénommée PTTH 4K), qui manifeste une activité PTTH chez *Samia cynthia ricini* mais pas chez *Bombyx mori*, était produite par quatre paires de cellules médio-dorsales neurosecrétices mid-dorsales du cerveau, transférée jusqu'aux *corpora allata* de *Bombyx* puis libérée (voir section suivante : NATURE CHIMIQUE DE LA PTTH). Ceci confirme que les mêmes cellules de *Bombyx* contiennent du matériel immuno-réactif de tyoe insuline et bombyxine (1-10) [chaîne A PTTH 4K] (Ishizaki et coll., 1986), même si la signification physiologique de la sécrétion n'est toujours pas connue chez *Bombyx*. La découverte d'une action hormonale du cerveau chez le ver à soie (Kobayashi, 1955) nous a incité à tenter l'extraction de l'hormone cérébrale (PTTH).

NATURE CHIMIQUE DE LA PTTH

En 1958, Kobayashi et Kirimura ont tenté pour la première fois d'obtenir une "hormone cérébrale" à partir de cerveaux de chrysalides de vers à soie *Bombyx mori*. Un extrait brut, manifestant une activité PTTH pour une dose de 0,1 mg sur la "chrysalide permanente" du ver à soie, a été utilisé comme matériel de base pour la purification de l'hormone.

L'une des deux fractions actives, obtenues par distribution à contre-courant et différant dans leurs propriétés chimiques, a été purifiée de manière plus approfondie et identifiée par ses propriétés chimiques telles que le cholestérol, ce qui indique la présence d'hormones stéroïdes chez les insectes (Kirimura et coll., 1962).

Bien que l'activité du cholestérol ait été confirmée par Schneiderman et Gilbert (1964), on sait que celui-ci est omniprésent dans les tissus des chrysalides diapausantes. La capacité du stérol à imiter l'activité PTTH s'exprime par une corrélation anormale et souvent inverse à la quantité injectée. La nature du solvant des stérols (9-10 % d'éthanol) régit l'activité hormonale, et Gilbert et Goodfellow (1955) en ont conclu que le cholestérol n'était probablement pas l'hormone. De plus, Karlson et Hoffmeister (1963) ont étudié la biosynthèse de l'ecdysone chez les larves de *Calliphora* et ont démontré que le cholestérol est précurseur de l'ecdysone. Cette observation a par la suite été confirmée par Nakanishi et coll. (1972) pour *Bombyx*. Aux vues de ces résultats, nous avons pensé que le cholestérol n'est pas l'hormone recherchée mais une substance qui imite l'action de la PTTH comme l'indique un article antérieur (Kobayashi et Yamazaki, 1974).

Ishizaki et coll. (1983a) ont établi que des chrysalides de *Bombyx* décérébrées âgées de 10 jours réagissaient de manière spécifique aux extraits cérébraux et permettaient de faire des dosages fiables de la PTTH. Cette dernière observation indique que 0,02 µg de cholestérol ne donne aucun signe d'activité PTTH, même si l'équipe de Kobayashi (Kirimura et coll., 1962) a suggéré que la PTTH était le cholestérol en étudiant des chrysalides de *Bombyx* décérébrées âgées de 42 jours pour le titrage biologique de la PTTH et que la sensibilité des chrysalides permanentes augmentait comme le démontre l'injection de métaux lourds et d'autres substances non spécifiques (Nishiitsutsuji-Uwo, 1972 ; Nishiitsutsuji-Uwo et Nishimura, 1975).

Par ailleurs, nous avons déjà démontré que chez les chrysalides normales du ver à soie, l'augmentation et la chute, tant de la consommation d'oxygène que du contenu en glycogène, étaient les mêmes que chez d'autres insectes, tandis que chez les chrysalides permanentes, la consommation d'oxygène reste à un niveau bas pendant plus de 100 jours après la pupaison alors que le contenu en glycogène demeure à un niveau élevé (Kobayashi, 1957). Le spectre électrophorétique des protéines sanguines des chrysalides permanentes coïncide avec celui des jeunes larves normales pendant environ trois mois (Aizawa et coll., 1960). Par ailleurs, les noyaux des *corpora allata* chez les chrysalides permanentes ont une forme à peu près sphérique ou ovale jusqu'au 140ème jour environ, puis après ce stade les noyaux prennent une forme irrégulière, ce qui suggère une augmentation de l'activité (Kobayashi et Burdette, 1971). A la lumière de ces résultats, nous considérons que la

condition physiologique des chrysalides permanentes du ver à soie reste stable pendant une période donnée après l'extirpation du cerveau.

En outre, notre longue expérience des caractéristiques physiologiques des chrysalides permanentes de *Bombyx mori* nous permet de penser, d'après le postulat d'Ishizaki (Ishizaki et coll., 1983a), que la capacité à mimer les substances PTTH est plus élevée chez les chrysalides permanentes âgées que chez les jeunes. De plus, on a découvert que chez les chrysalides décérébrées en arrêt de développement, le dosage variait considérablement suivant l'état nutritionnel, les variations saisonnières et les antécédents parentaux (Kobayashi, 1955, 1957 ; Kobayashi et Yamashita, 1958 ; Kobayashi et coll., 1960 ; Ishizaki, 1972 ; Ishizaki et Suzuki, 1980).

D'autre part, Ichikawa et Ishizaki (1961, 1963) ont démontré qu'une fraction soluble à l'eau d'un extrait méthanolique de cerveaux de chrysalides manifestait l'activité de l'hormone cérébrale, suggérant la présence de PTTH. La purification fut complétée par chromatographie sur colonne.

Pour purifier une fraction active soluble dans l'eau obtenue par distribution à contre-courant comme mentionné plus haut (Kobayashi, 1963 ; Saito et coll., 1963), Kobayashi et Yamazaki (1966) ont broyé des cerveaux de vers à soie dans un tampon phosphate à 0,1 M ; après centrifugation et purification du surnageant sur une colonne de CM-cellulose, on a obtenu une substance hautement purifiée avec une activité PTTH. La filtration sur gel a permis d'observer que la partie active avait un poids moléculaire apparent d'environ 20 000. On a découvert que l'activité hormonale de l'extrait brut était résistante à la trypsine et à la chymotrypsine mais était neutralisée par la Pronase et le Nagarse.

Ishizaki et Ichikawa (1967) ont fractionné un extrait de cerveaux de *Bombyx* par filtration sur gel de Sephadex et par chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose, ce qui leur a permis d'obtenir trois fractions actives ; parmi celles-ci, la fraction la plus active présente une activité hormonale à 0,002 µg de protéines chez *Samia cynthia ricini* et dont le poids moléculaire a été estimé entre 9 000 et 31 000.

Williams (1968) a également étudié l'hormone cérébrale chez *Antheraea* et a confirmé les résultats obtenus par d'autres chercheurs. Il pensait toutefois que l'hormone cérébrale était une protéine et qu'il pouvait s'agir d'un mucopolysaccharide en raison de ses propriétés comme sa stabilité thermique, l'absence d'absorption spécifique à 280 nm., sa sensibilité à la pepsine, à la trypsine et à la chymotrypsine, et son insensibilité à certaines manipulations qui ont par le passé été utilisées pour éliminer les dernières traces de protéines.

En 1969, Yamazaki et Kobayashi ont décrit les résultats des expériences de purification de la PTTH de 20 kDa. L'hormone était résistante à la chaleur, à l'incubation à la chymotrypsine, à la Pronase et au Nagarse. Son poids moléculaire a été estimé à 20 000 par filtration sur gel de Sephadex G-100. Le point isoélectrique de l'hormone est de pH 8,35-8,65. Ils ont émis l'hypothèse qu'il pouvait s'agir d'un glycopeptide d'après les résultats de l'analyse du contenu en sucre.

Ichizaki (1969) a étudié la modification du titre de l'hormone cérébrale extraite du cerveau, de la tête, du thorax et de l'abdomen au cours du développement de *Bombyx mori* de la quatrième mue jusqu'au 6ème jour de l'émergence du papillon suivant le procédé préalablement décrit par Ishizaki et Ichikawa (1964). Il a été démontré que la tête d'un papillon adulte de *Bombyx* contenait environ 50 unités *Samia* actives, alors que le cerveau de la chrysalide n'en contient que 10 à 15. Mais on n'a pas pu déterminer si, chez *Bombyx mori*, l'activité PTTH de *Bombyx* dans l'extrait céphalique provient ou non d'une sécrétion du cerveau. Une expérience a été réalisée par Kobayashi et Yamazaki (1978) afin de confirmer ce postulat. Les résultats ont permis de découvrir que la PTTH de *Bombyx* ne se trouvait pas dans la tête des papillons décérébrés induits à partir de chrysalides permanentes de *Bombyx mori* par injection d'ecdysone, bien que l'hormone se trouve dans la tête du papillon normal et que le nature du produit actif dans la tête du papillon de *Bombyx* semble avoir des caractéristiques chimiques identiques à celles du cerveau de la chrysalide de *Bombyx* (Yamazaki et Kobayashi, 1969).

Nishiitsutsuji-Uwo (1972) a partiellement purifié la PTTH suivant le procédé chimique d'Ishizaki et Ichikawa (1967) à partir des têtes de papillons de *Bombyx* puis a établi que cette substance était un peptide d'une masse moléculaire de moins de 5 kDa.

Quelques années plus tard, Suzuki et coll. (1975) ont tenté de purifier partiellement la PTTH en utilisant le test *Samia* et un procédé de purification identique à celui de Nishiitsutsuji-Uwo (1972). La masse moléculaire du principe actif extrait suivant cette méthode s'élevait à moins de 5 kDa.

Ishizaki et coll. (1977) ont démontré, après analyse de la stabilité de la PTTH partiellement purifiée traitée avec diverses enzymes et réactifs en utilisant le test *Samia*, que (1) la PTTH était un peptide, (2) la fraction possédant l'activité PTTH ne contenait pas de sucre, (3) les terminaux N et C de la molécule de PTTH étaient bloqués, (4) un pont disulfure était indispensable à l'activité, mais un groupe sulfhydryle ne l'était pas.

Nagasawa et coll. (1979) ont démontré que la PTTH hautement purifiée issue des têtes d'adultes de *Bombyx mori* avait un poids moléculaire de 4 400 (Suzuki et coll., 1982; Nagasawa et coll., 1984a). Cette PTTH est capable d'induire le développement des chrysalides permanentes du ver à soie *Eri Samia cynthia ricini* alors qu'elle ne provoquait aucun développement de l'adulte d'une chrysalide permanente du ver à soie *Bombyx mori* (Ishizaki et coll., 1983b). Au contraire, Kobayashi et Yamazaki (1966) et Yamazaki et Kobayashi (1969) ont obtenu, en purifiant la PTTH à partir du cerveau de chrysalides permanentes de *Bombyx*, une protéine active d'un poids moléculaire de 20 000 dont le comportement chromatographique et le point isoélectrique différaient de ceux de la PTTH obtenue par l'équipe d'Ishizaki et Suzuki.

La raison de l'écart entre les poids moléculaires de la PTTH obtenus par les deux groupes restait à élucider, l'utilisation de différents animaux pour le titrage biologique ne suffisant pas à l'expliquer.

En 1983, la cause de l'écart mentionné ci-dessus a été déterminée par l'équipe d'Ishizaki qui a confirmé la présence de PTTH à 22K qui active de façon spécifique les chrysalides de *Bombyx*. Ishizaki et coll. (1983b) ont démontré, d'après leurs expériences, que le cerveau de *Bombyx* contient la PTTH-B et la PTTH-S et que la PTTH-B est celle de Kobayashi et la PTTH-S, celle d'Ishizaki et Suzuki. Ils ont déterminé la présence de deux types de PTTH dans le cerveau des adultes du ver à soie *Bombyx mori* : la PTTH de 4K, qui est active sur les chrysalides décérébrées de *Samia cynthia ricini* et dont le poids moléculaire est estimé à 4 400 et la PTTH de 22K, qui est active sur les chrysalides décérébrées de *Bombyx mori* et dont le poids moléculaire est estimé à 22 000 (Ishizaki et coll., 1983b; Ishizaki et Suzuki, 1984).

A ce propos, Bollenbacher et coll. (1984) ont démontré que la PTTH se présentait sous deux formes moléculaires dans le cerveau de *Manduca sexta* : une grande (plus de 29 kDa) et une petite (7 kDa). Ils ont également démontré que les deux PTTH avaient des réactions au dosage *in vitro* caractéristiques de l'activation des glandes prothoraciques aux différents stades du développement, ce qui indique que la sensibilité des glandes aux neurohormones évolue. O'Brien et coll. (1986) ont par la suite clairement mis en évidence que les quantités relatives des deux PTTH dépendent des stades larvaires et nymphaux étudiés en utilisant un test *in vitro* qui contrôle la stimulation de la synthèse d'ecdysone par les glandes prothoraciques en réponse à la PTTH. Ces résultats sur les PTTH chez *Manduca sexta* semblent être très différents de ceux obtenus pour les deux neurohormones, PTTH 4K et PTTH 22K, chez *Bombyx mori*.

D'autre part, nous avons procédé à une purification supplémentaire de la PTTH issue des têtes de papillons de *Bombyx* (Matsuo et coll., 1985 : cette étude a été exposée pour la première fois au Congrès international d'Entomologie de Kyoto, 1980). L'hormone hautement purifiée et marquée à ¹²⁵I donne une bande unique d'un poids moléculaire de 18 000 après électrophorèse SDS sur gel de polyacrylamide. Il était vraisemblable que l'hormone isolée soit un polypeptide unique qui induit le développement de l'adulte affectant la glande prothoracique de la chrysalide permanente du ver à soie *Bombyx*. De plus, la PTTH induit une stimulation significative de la synthèse d'ARN dans les glandes prothoraciques en culture, avec une augmentation prédominante de la synthèse d'ARN ribosomique mais n'affecte pas l'incorporation d'uridine *in vitro* tant dans l'ARN de la glande salivaire que du ganglion suboesophagien chez la chrysalide permanente de *Bombyx mori* (Aizono et coll., 1986).

A propos de l'expérience rapportée ci-dessus (Matsuo et coll., 1985), Suzuki (1986) a remarqué que le principe actif de la préparation pourrait avoir une forme moléculaire similaire à la PTTH 22K étant donné sa nature fondamentale et son poids moléculaire (20 000 Mr) estimé par chromatographie sur Sephadex G-75, montrant ainsi la présence d'au moins quatre types de PTTH 22K. Suzuki et ses collaborateurs ont également démontré que les espèces moléculaires de la PTTH ayant un poids moléculaire d'environ 22 000 (PTTH 22K) correspondent à une protéine basique (pI 7,7-8,7) qui contient un ou des pont(s) disulfure(s). La séquence N terminale des acides aminés de la

PTTH 22K est le suivant : H-Gly-Asn-Ile-Gln-Val-Glu-Asn-Gln-Ala-Ile-Pro-Asp-Pro-Pro-Cys-Thr-Cys-Lys-Tyr-Lys- (Kataoka et coll., 1987 ; Suzuki, 1988).

En 1984, Nagasawa et coll. (b) ont isolé de la tête du papillon de *Bombyx* trois formes moléculaires de l'hormone prothoracicotrope, à savoir PTTH 4K, PTTH 4K II et PTTH 4K III, on a pu ensuite déterminer la séquence des 19 acides aminés N terminaux de ces hormones prothoracicotropes. Cette séquence présente une forte homologie avec l'insuline et les facteurs apparentés à l'insuline.

Des études approfondies sur la PTTH 4K II ont été réalisées par Nagasawa et coll. (1986). Ils ont déterminé la séquence complète des acides aminés de la PTTH 4K II qui est active sur les chrysalides décérébrées de *Samia cynthia ricini*. Comme l'insuline de vertébrés, la PTTH 4K II est composée de deux chaînes peptidiques différentes (les chaînes A et B). La chaîne A comprend 20 acides aminés. La chaîne B est un mélange de quatre micro-peptides hétérogènes dont deux comprennent 28 résidus et les deux autres, 26 résidus. La séquence de la PTTH 4K II présente une homologie très forte (40 %) avec l'insuline humaine. La distribution identique des six résidus de cystéine indique également que la PTTH 4K II appartient à la famille des insulines.

De plus, un modèle tri-dimensionnel de la PTTH-II montre que celle-ci peut assumer une structure tertiaire ressemblant à celle de l'insuline (Jhoti et coll., 1987).

Nagasawa et coll. (1988) ont décrit la structure et la synthèse de la PTTH 4K issue du ver à soie *Bombyx mori* et ont donné le nom de bombyxine à ce neuropeptide cérébral. En outre, on a pu isoler la bombyxine IV et Maruyama et coll. (1988) ont déterminé sa structure primaire, indiquant que la bombyxine IV isolée a une activité spécifique de 0,1 ng/unité *Samia*, équivalant pratiquement à celles des bombyxines I, II et III. Un ADN génomique codant pour la bombyxine, le peptide cérébral 5kDa (MW. 5 000 ca., précédemment dénommée PTTH 4K) a ensuite été isolé chez le papillon de *Bombyx*, confirmant le fait que le gène de la bombyxine n'a pas d'intron contrairement à d'autres membres de la famille des gènes d'insulines (Iwami et coll., 1989). Le clonage de gènes au moyen de sondes oligonucléotidiques pour la PTTH de *Bombyx* pourrait permettre de faire des progrès importants qui permettront de déterminer la structure primaire de la PTTH chez d'autres insectes.

Récemment, l'équipe d'Ishizaki et de Suzuki a réussi à analyser la structure moléculaire de la PTTH de *Bombyx* (dénommée précédemment PTTH 22K) par clonage de gènes (communication personnelle d'Ishizaki (1989), voir DERNIERES INFORMATIONS).

Par ailleurs, Bollenbacher et Granger (1985) supposent que la PTTH de *Manduca* est similaire aux PTTH dont le poids moléculaire putatif est plus élevé et qui ont initialement été isolées à partir de cerveaux de *Bombyx*.

VOIES DE RECHERCHES

Bien que la purification de la PTTH ait été réalisée dans certains laboratoires en utilisant des animaux adaptés au dosage biologique comme *Bombyx*, *Manduca* et autres, l'isolement des hormones chez ces insectes et les analyses en termes moléculaires de la PTTH chez chacun des animaux testés restent à l'étude.

Il est probable que la purification de la PTTH native ne sera pas facile étant donné que la quantité d'hormone par tête d'insecte est extrêmement faible. Chez le ver à soie, des progrès considérables ont été fait dans le domaine de la détermination des caractéristiques moléculaires de la PTTH.

On peut donc s'attendre à ce que des progrès soient accomplis dans les études de la détermination de la nature chimique de la PTTH native et l'élucidation de divers mécanismes, dont la stimulation de l'action de la glande prothoracique ainsi que la sécrétion d'ecdysone à partir de la glande, ouvrant de ce fait la voie à la biologie moderne.

DERNIERES INFORMATIONS

Depuis qu'a été mise en route la préparation de cet historique, Kawakami et coll. (1990) ont présenté la séquence complète des acides aminés de la molécule de PTTH 30kDa de *Bombyx mori*, précédemment désignée sous le nom de PTTH 22K, mais dont les caractéristiques obtenues par électrophorèse en SDS et par clonage de gènes permettent de penser maintenant qu'elle est de 30kDa.

Ils ont également établi que la PTTH est synthétisée par deux paires de cellules neurosécrétrices dorsolatérales qui réagissent immunochimiquement à un anticorps monoclonal qui reconnaît la PTTH, comme les deux paires de cellules neurosécrétrices cérébrales situées à un endroit similaire chez *Manduca sexta* (O'Brien et coll., 1988). Ils ont également confirmé, à partir de l'identification du site de glycosylation, les résultats antérieurs de Yamazaki et Kobayashi (1969) qui suggéraient que la PTTH de *Bombyx* est une glycoprotéine.

EFFECT OF JH ANALOGUES ON SILWORM, *BOMBYX MORI* L., GROWTH AND DEVELOPMENT OF SILK GLAND

S.K. CHOWDHARY, P.S. RAJU & R.K. OGRA

Regional Research Laboratory, Canal Road, Jammu-Tawi - 180 001, J. & K., India.

The effect of methoprene, labomin and 2,6-dimethyl, 9-(3,4 methylene-dioxyphenyl) nona 2,8-diene, applied topically on the abdominal tergum of silkworm, Bombyx mori L., after the fourth ecdysis has been studied. Previous studies have indicated that the administration of juvenoid at the 5th larval instar in B. mori L. resulted in an increase of silk production. Although the present study confirms the above observations, it has also been marked that, with the application of a higher dose of JH, the larval prolongation is more pronounced than the silk produced, when silk weight/silk ratio is taken into consideration. The most effective dose has been observed to be 0.01 µl/larva, when applied at 48 and 72 hrs. after resumption of the last moult. It has also been noted in the present studies that the development of the silk gland takes place up to a particular period, beyond which the larval development takes place with an increase in the larval/pupal weight due to the increase in the feeding period without any significant increase in silk and silk ratio.

Keywords : *Bombyx mori* L., methoprene, labomin, juvenoids, cocoon, larva, pupa, seripose, fecundity.

INTRODUCTION

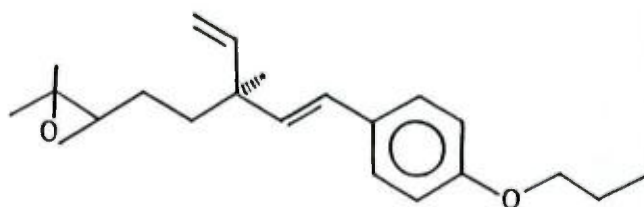
Many workers (Akai *et al.*, 1971 and 1985; Chang *et al.*, 1972; Murakoshi *et al.*, 1972; Nihmura *et al.*, 1972 and 1974) have reported that juvenile hormones or their derivatives and analogues can be used as growth regulators of the commercial silkworm to increase silk yield. Akai *et al.* (1985) reported a 30 % increase in silk layer weight over the control with synthetic hormone C₁₈ JH. Chang *et al.* (1972) observed a 20 % increase in cocoon and pupal weight with giant cocoon formation when the larvae were treated with methylenedioxy phenyl derivatives. Chowdhary *et al.* (1986) also reported 21 % increase in silk yield and more than 40 % increase in silk ratio over the control with JH, SJ-42-F.

The present study was undertaken with a view to evaluating the effect of different JH analogues on the growth and silk yield of the silkworm, *Bombyx mori* L., and the right time, dose of application of these JH analogues and also the larval prolongation.

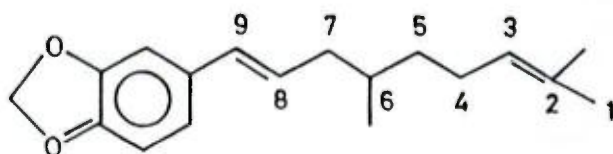
MATERIAL AND METHODS

Three compounds, namely methoprene (A), labomin (B) and 2,6-dimethyl, 9(3,4-methylene-dioxy phenyl) - nona 2,8-diene (C) were used to study their probable JH activity on *Bombyx mori* L.

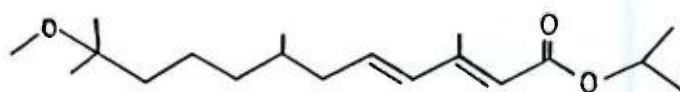
Compound A was supplied by the Director, Malti Chem Research Centre - Nandesari, Gujarat, compound B was supplied by Dr. F. Sehnal - Czechoslovak Academy of Sciences- and compound C from the Organic Chemistry Division -R.R.L., Jammu, India. Labomin is an emulsifiable concentrate of juvenoid methoprine. The structures of these compounds are given in Fig. 1.



BPE - EPOXIDE
(B)



2,6-DIMETHYL , 9.(3,4 METHYLENE- DIOXY PHENYL)
NONA 2,8- DIENE
(C)



METHOPRENE
(A)

Fig. 1 : Structures of compounds A, B and C.

Fig. 1 : Structures des composés A, B et C.

Preparation and application of the doses :

The compounds A and C were dissolved in alcohol and compound B in water separately. Three concentrations, i.e. 1.0 $\mu\text{l}/10\ \mu\text{l}$; 0.1 $\mu\text{l}/10\ \mu\text{l}$ and 0.01 $\mu\text{l}/10\ \mu\text{l}$ were prepared and topically applied on the abdominal tergum of the larva using a 100 μl micro-syringe controlled by a micro-applicator.

Test animals and method of application :

Silkworm, *Bombyx mori* L., larvae in the 5th instar of F₁ hybrid RL₂₆ × RL₃₀ (evolved by R.R.L., Jammu) were used for the treatments. The larvae were reared on mulberry leaves in wooden trays in the laboratory at 23±1°C and 70 % relative humidity. Test animals of equal size and weight were selected after the fourth ecdysis. For each compound 12 batches of test animals were taken and each batch consisted of 3 replicates. Each replicate had 50 animals. The first three batches were treated with compounds A, B and C of 1.0 $\mu\text{l}/10\ \mu\text{l}$; 0.1 $\mu\text{l}/10\ \mu\text{l}$ and 0.01 $\mu\text{l}/10\ \mu\text{l}$ and the 4th batch with 10 μl of alcohol (control water) at 48 hrs. after resuming from the fourth ecdysis. The remaining batches were treated at 72 hrs. and 96 hrs. after resuming from the fourth ecdysis with similar doses.

RESULTS

The results of the application of all the three test compounds, viz. methoprene (compound A), labomin (compound B) and 2,6-dimethyl-9(3,4-methylenedioxy phenyl) nona - 2,8-diene (compound C) are presented in Tables I, II and III respectively. A perusal of the tables shows that the time of application and the test doses are highly significant with respect to the larval period/larval prolongation, survival percentage, cocoon weight, pupal weight, shell weight and shell percentage.

Larval prolongation (length of development) :

Tables I, II and III reveal that the larval prolongation is directly proportional to the concentration of JH used. Methoprene (compound A), a well-known JH analogue for *Bombyx mori* L., prolonged the larval period over the control by 1 day and 20 hours at the concentration of 0.01 $\mu\text{l}/\text{larva}$ at 48 hrs. of treatment ; on the other hand 0.1 $\mu\text{l}/\text{larva}$ of compound A prolonged the larval period by 6 days when applied at 48 hrs. and 72 hrs. after the fourth ecdysis. Concentration of 1.0 $\mu\text{l}/\text{larvae}$ appeared to be too high as no cocoon formation occurred.

With test compound B, minimum larval prolongation of one day occurred at 0.01 $\mu\text{l}/\text{larva}$ at 48 hrs. of treatment and maximum of 6 days at 1.0 $\mu\text{l}/\text{larva}$ at all the three stages of treatment, i.e. at 48 hrs., 72 hrs. and 96 hrs. after the fourth ecdysis.

A larval prolongation by 4 days and 4 hours after treatment with compound C was observed at 0.01 $\mu\text{l}/\text{larva}$ when applied at 48 hrs. and of 8 days and 4 hrs. over the control at 1.0 $\mu\text{l}/\text{larva}$ when treated at 96 hrs. in the 5th instar.

The non-seriposed larvae with the treatment of test compound A were quite healthy and strong and were feeding well even after 10 days of the seriposition of the control larvae. On the other hand, the larvae treated with compound C stopped feeding after 2-3 days of the seriposition of the control larvae, became weak and died between 4 to 8 days.

Cocoon weight :

The highest average cocoon weight of 3.41 g was recorded with compound A when treated with 0.1 $\mu\text{l}/\text{larva}$ at 72 hrs., this is a 32.96 % increase in cocoon weight.

Similarly, a 3.215 g cocoon weight was observed with test compound B when treated with a dose of 1.0 $\mu\text{l}/\text{larva}$ at 48 hrs. In this case, the increase was only 22.39 %.

No cocoon formation took place with compound C.

Cocoon layer/Silk weight :

The maximum silk weight of 0.482 g was recorded after the larvae were treated with compound A, with 0.01 $\mu\text{l}/\text{larva}$ at 48 hrs. On the other hand, the test compound B gave a 0.496 g shell weight at 0.01 $\mu\text{l}/\text{larva}$ at 96 hrs.

Table I. Effect of methoprene (compound A).

Tableau I. Effet du méthoprène (composé A).

Sl. no. Numéro de série	Dose $\mu\text{l/larva}$ Dose $\mu\text{l/larve}$	Time of application (hrs) Heure d'application (H)	Larval period (D:H) Durée larvaire (J:H)	Larval prolongation (D:H) Prolongation larvaire (J:H)	Survival % Pourcentage de survie	Cocoon weight (g) Poids du cocon (g)	Pupal weight (g) Poids de la chrysalide (g)
1	1.0	48	34:00	Did not seripose, survived up to 38 days of larval period <i>Pas de séripose, survie jusqu'au 38ème jour de la période larvaire</i>			
2	0.1			6:00	35	3.161 $\pm (0.0133)$	2.736 $\pm (0.148)$
3	0.01		29:20	1:20	95	2.940 $\pm (0.523)$	2.458 $\pm (0.518)$
4	1.0	72		No cocoon formation, survived up to 38 days <i>Pas de formation de cocon, survie jusqu'au 38ème jour</i>			
5	0.1		34:00	6:00	55	3.41 $\pm (0.302)$	3.011 $\pm (0.306)$
6	0.01		30:00	2:00	60	2.402 $\pm (0.512)$	1.941 $\pm (0.491)$
7	1.0	96		No cocoon formation, survived up to 38 days <i>Pas de formation de cocon, survie jusqu'au 38ème jour</i>			
8	0.1			—Do—			
9	0.01		34:00	6:00	25	3.044	2.598 $\pm (0.392)$
	Control <i>Témoin</i>		28:00	-	90	2.295 $\pm (0.223)$	1.865 $\pm (0.218)$

Values are mean $\pm$ SD of 50 values.Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ l'intervalle de confiance de 50 valeurs.

Continued / Suite page suivante

Table I. Continued / *Tableau I. Suite*

Sl. no. <i>Numéro de série</i>	Dose μ l/larva <i>Dose μl/larve</i>	Time of application (hrs) <i>Heure d'application (H)</i>	Shell weight (g) <i>Poids de la coque (g)</i>	Shell % <i>Pourcentage de la coque</i>	Per cent increase over control <i>% d'augmentation par rapport au témoin</i>			
					Cocoon wt.	Pupal wt.	Shell wt.	Shell
					<i>% d'augmentation par rapport au témoin</i>			
					<i>Poids du cocon</i>	<i>Poids de la chrysalide</i>	<i>Poids de la coque</i>	<i>Richesse soyeuse</i>
1	1.0	48		Did not seripose, survived up to 38 days of larval period <i>Pas de filage, survie jusqu'au 38ème jour de la période larvaire</i>				
2	0.1		0.425 $\pm$ (0.059)	13.46	+ 27.30	+ 31.83	- 1.17	- 30.15
3	0.01		0.482 $\pm$ (0.100)	16.41	+ 21.03	+ 24.12	+ 10.78	- 14.13
4	1.0	72		No cocoon formation, survived up to 38 days <i>Pas de formation de cocon, survie jusqu'au 38ème jour</i>				
5	0.1		0.399 $\pm$ (0.064)	11.70	+ 32.69	+ 38.06	- 7.76	- 60.08
6	0.01		0.461 $\pm$ (0.058)	19.21	+ 4.45	+ 3.91	+ 6.72	+ 2.40
7	1.0	96		No cocoon formation, survived up to 38 days <i>Pas de formation de cocon, survie jusqu'au 38ème jour</i>				
8	0.1				—Do—			
9	0.01		0.446 $\pm$ (0.023)	14.65	+ 24.60	+ 28.2	+ 3.58	-27.84
	Control <i>Témoin</i>		0.43 $\pm$ (0.057)					

Values are mean $\pm$ SD of 50 values.*Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ l'intervalle de confiance de 50 valeurs.*

Pupal weight :

The highest pupal weight of 3.011 g was recorded with test compound A at 0.1 $\mu\text{l/larva}$ at 72 hrs. treatment which was 38.06 % higher than the control, whereas with test compound B, a 27.60 % higher pupal weight was observed at 1.0 $\mu\text{l/larva}$ at 48 hrs. after the last ecdysis.

Silk ratio :

The most significant silk ratio, i.e. 19.21 % was produced by test compound A at 0.01 $\mu\text{l/larva}$ at 72 hrs. which was 2.49 % higher with a 2-day-increase in the feeding period. Test compound B recorded the same 19.21 % silk ratio at 0.01 $\mu\text{l/larva}$ at 48 hrs. This was 8.33 % increase over the control with only one day's increase in the feeding period.

Survival ratio (up to pupal state) :

A maximum survival of 95 % was observed at 0.01 $\mu\text{l/larva}$ with compound A and 95 to 100 % at 0.01 $\mu\text{l/larva}$ at 48 hrs., 72 hrs. and 96 hrs. of treatment with the test compound B. At a higher concentration, i.e. 1.0 $\mu\text{l/larva}$ with compound A, no cocoon formation occurred but larvae survived even ten days after the control larvae seriposed ; whereas when treated with test compound B at 1.0 $\mu\text{l/larva}$ at 96 hrs., flimsy cocoons with dead pupae were recorded. On the contrary, with compound C, all the larvae failed to seripose and died between 4 and 8 days after the control larvae seriposed.

DISCUSSION

The present study on the effect of JH analogues, viz. methoprene (compound A), labomin (compound B) and 2,6-dimethyl, 9-(3,4 methylenedioxy phenyl) nona - 2,8-diene (compound C) on the silkworm, *Bombyx mori* L., reveals that the effective time of application of various JH analogues differ from one compound to another, but in almost all the compounds it ranges from 48 hrs. to 96 hrs. after the 4th ecdysis. In some compounds the effective time of application is 48 hrs. to get a significant increase in silk weight as is found in compound A ; it is indirectly proportional to the time of applications, i.e. at 48 hrs. it gave 10.78 % increase of silk, whereas at 72 hrs. and 96 hrs., it gave 6.72 % and 3.58 % respectively. On the other hand, in compound B, the time of application is directly proportional to silk yield, i.e. at 48 hrs., 4.77 % increase in shell and at 72 hrs. and 96 hrs. it gave 5.38 % and 11.49 % increase respectively with the same dose of 0.01 $\mu\text{l/larva}$. These findings had not been reported till now, though Chang *et al.* (1972) found that effect of JH on silkworm larvae was highest (in terms of silk production) when applied on the 2nd and 3rd days after the fourth ecdysis. On the other hand, Chowdhary *et al.* (1986) found that one of the JH (SJ-42-F) gave the highest silk increase when applied on the 3rd day i.e. at 72 hrs.

The prolongation of the larval period is directly proportional to the concentration of JH. The larval period could be prolonged from 1-10 days with a treatment of JH analogues in 5th instar larvae, at different concentrations ranging from 0.01 $\mu\text{l/larva}$ to 1.0 $\mu\text{l/larva}$. It is clear from both the tables I and II that the concentration of JH, when increased from 0.01 $\mu\text{l/larva}$ to 0.1 μl and 1.0 μl , entails an increase in the larval period also, both in compound A and compound B. But this prolongation in the larval period, however, was beneficial only at a low concentration (0.01 $\mu\text{l/larva}$) in both the compounds A and B, when treated at 48 hrs., 72 hrs. and 96 hrs. as a positive increase in shell (silk) weight was obtained with this dose only ; when compound A was applied at 48 hrs. with a dose of 0.01 $\mu\text{l/larva}$, there was an increase in silk weight by 10.78 %, while compound B, when applied at 96 hrs. with the same dose of 0.01 $\mu\text{l/larva}$ gave rise to an increase in silk weight by 11.49 %. This increase reflected the real increase in silk yield.

Increase in the pupal weight on the other hand has a negative value as it increases the weight of the cocoon pupa but not the silk layers, which is an economic character of silk reeling ; though larger pupae can give rise to an increase in fecundity but the prolongation of the larval period with a higher dose is so long that it becomes uneconomical to get larger pupae while feeding 3-6 days and get little increase in fecundity. On the other hand, it was reported by Chang *et al.* (1972) and Chowdhary *et al.* (1986) that at higher doses the larval period was increased ; larvae were malformed and died after 6 days of larval prolongation, which is also confirmed in the present findings too, when the larvae

Table II. Effect of labomin (compound B).

Tableau II. Effet du labomine (composé B).

Sl. no. <i>Numéro de série</i>	Dose μ l/larva <i>Dose μl/larve</i>	Time of application (hrs) <i>Heure d'application (H)</i>	Larval period (D:H) <i>Durée larvaire (J:H)</i>	Larval prolongation (D:H) <i>Prolongation larvaire (J:H)</i>	Survival % <i>Pourcentage de survie</i>	Cocoon weight (g) <i>Poids du cocon (g)</i>	Pupal weight (g) <i>Poids de la chrysalide (g)</i>
1	1.0	48	34:00	6:00	20	3.215 $\pm$ (0.46)	2.840 $\pm$ (0.517)
2	0.1		31:03	3:03	90	2.715 $\pm$ (0.407)	2.298 $\pm$ (0.374)
3	0.01		29:00	1:00	95	2.402 $\pm$ (0.482)	1.941 $\pm$ (0.456)
4	1.0	72	34:00	6:00	45	3.151 $\pm$ (0.441)	2.73 $\pm$ (0.438)
5	0.1		32:00	4:00	90	2.943 $\pm$ (0.242)	2.506 $\pm$ (0.402)
6	0.01		30:20	2:20	95	2.978 $\pm$ (0.505)	2.514 $\pm$ (0.495)
7	1.0	96	34:00	6:00-	Flimsy cocoons were formed with dead pupae <i>Formation de cocons légers avec chrysalides mortes</i>		
8	0.1		32:00	4:00	85	2.923 $\pm$ (0.571)	2.454 $\pm$ (0.564)
9	0.01		31:03	3:03	100	2.836 $\pm$ (0.428)	2.340 $\pm$ (0.437)
	Control <i>Témoin</i>		28:00	-	90	2.495 $\pm$ (0.398)	2.056 $\pm$ (0.372)

Values are mean $\pm$ SD of 50 values.

Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ l'intervalle de confiance de 50 valeurs.

Continued / Suite page suivante

Table II. Continued / *Tableau II. Suite*

Sl. no. <i>Numéro de série</i>	Dose μ l/larva <i>Dose μl/larve</i>	Time of application (hrs) <i>Heure d'application (H)</i>	Shell weight (g) <i>Poids de la coque (g)</i>	Shell % <i>Pourcentage de la coque</i>	Per cent increase over control			
					Cocoon wt. <i>Pourcentage d'augmentation par rapport au témoin</i>	Pupal wt.	Shell wt.	Shell
					<i>Poids du cocon</i>	<i>Poids de la chrysalide</i>	<i>Poids de la coque</i>	<i>Richesse soyeuse</i>
1	1.0	48	0.375 $\pm$ (0.086)	11.66	+ 22.39	+ 27.60	- 17.06	- 50.85
2	0.1		0.417 $\pm$ (0.065)	15.35	+ 8.10	+ 10.53	- 5.27	- 14.59
3	0.01		0.461 $\pm$ (0.058)	19.21	- 3.87	- 5.92	+ 4.77	+ 8.33
4	1.0	72	0.421 $\pm$ (0.067)	13.36	+ 20.81	+ 24.68	- 4.27	- 31.66
5	0.1		0.437 $\pm$ (0.066)	14.86	+ 15.22	+ 17.95	- 0.45	- 18.37
6	0.01		0.464 $\pm$ (0.061)	15.59	+ 16.21	+ 18.21	+ 5.38	- 12.90
7	1.0	96		Flimsy cocoons were formed with dead pupae <i>Formation de cocons légers contenant des chrysalides mortes</i>				
8	0.1		0.469 $\pm$ (0.05)	16.05	+ 14.64	+ 16.21	+ 6.30	- 0.59
9	0.01		0.496 $\pm$ (0.100)	17.50	+ 12.02	+ 12.13	+ 11.40	- 0.51
	Control <i>Témoin</i>		0.439 $\pm$ (0.052)	17.59				

Values are mean $\pm$ SD of 50 values.*Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ l'intervalle de confiance de 50 valeurs.*

Table III. Effect of compound C.

Tableau III. Effet du composé C.

Sl. no. <i>Numéro de série</i>	Dose μ l/larva <i>Dose μl/larve</i>	Time of application (hrs) <i>Heure d'application (H)</i>	Larval period (D:H) <i>Durée larvaire (J:H)</i>	Larval prolongation (D:H) <i>Prolongation larvaire (J:H)</i>	Cocoon weight (g) <i>Poids du cocon (g)</i>	Shell weight (g) <i>Poids de la coque (g)</i>	Shell % <i>% de la coque</i>	Increase in shell % over control <i>Augmentation de la richesse soyeuse/témoin</i>
1	1.0	48	34:04	6:04	No cocoon formation			
2	0.1		33:00	5:00	<i>Pas de formation de cocon</i>			
3	0.01		32:04	4:00				
4	1.0	72	34:10	6:10	—Do—			
5	0.1		34:05	6:05				
6	0.01		33:00	5:00				
7	1.0	96	36:04	8:04	—Do—			
8	0.1		35:04	7:04				
9	0.01		34:10	6:10				
	Control <i>Témoin</i>		28:00		2.495	0.439	17.59	

were treated with methoprene, they were feeding well and were healthy even 10 days after the control larvae seriposed and after that they died. The effect of compound C was totally negative as the larvae started to die from the 4th day onwards after the control larvae seriposed. None of the treated larvae with compound C could seripose.

It was reported that cocoon weight and pupal weight were directly proportional to the concentration of JH and the feeding period (Akai *et al.*, 1971 ; Chowdhary *et al.*, 1986) ; whereas in the present study with a higher concentration of methoprene, larvae did not seripose even 10 days after the control larvae seriposed. Thus it is clear that the effective doses have to be found in each and every JH analogues.

Silk weight and silk ratio are characters which are only significant as far as the industrial point of view is concerned. Recently, Chowdhary *et al.* (1986) pointed out that with the prolongation of the larval period, the increase in silk weight continued only up to 1-3 days, beyond which silk ratio is found to be negative as is evident from tables I and II in the present studies with methoprene and labomin also. The reason is quite evident that with the increase in the feeding period beyond 1-3 days, only the larval weight increase which contributes to an increase in the pupal weight only and not in the shell weight.

According to the present study, the survival ratio is dependent on different factors such as the dose of JH given, the nature of JH analogue applied and thirdly on the type of solvent used. It is clear from the tables (I, II and III) that with a lower dose given in both compounds, i.e. A and B, the survival is higher and as we increase the dose the survival ratio goes on decreasing. In the case of labomin (compound B), the survival ratio can also be higher because this compound is water soluble and the worm would not get affected, as it may happen with compound A in which alcohol is used as a solvent.

Thus while working with JH analogues for silkworms, the main consideration should be to produce more silk. Secondly, the increase in feeding periods exceeding more than 1-2 days is uneconomical because of higher labour and feed inputs. As is evident from the treatment of labomin with the dose of 0.01 µl/larva, there is an average increase of about 1 kg of silk/ounce of reared seed. If we take into consideration the inputs (leaf and labour), the output is significantly very high, thus the use of labomin - JH analogue can significantly increase silk production. Secondly, labomin is at present the only compound which is water soluble and can be easily used by farmers.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are highly thankful to Dr. Sukh Dev, Director, Multi-Chem Research Centre, Nandesari, Gujarat, for providing compound A and Dr. F. Sehnal - Czechoslovak Academy of Sciences - for providing compound B. We are also thankful to Dr. K.L. Dhar - RRL, Jammu - for providing compound C.

REFERENCES

- AKAI H., KIGUCHI K., MORI K. (1971), Increased accumulation of silk protein accompanies KJH-induced prolongation of larval life in *Bombyx mori* L. Appl. Entomol. Zool., 6, 218-220.
 AKAI H., KIGUCHI K. (1971), Abst. Paper. 41st Annual Meet., Sericulture Society, Tokyo, Japan, 40.
 AKAI H., KIMURA K., KIUCHI M., SHIBUKAWA A. (1985), Increase of silk production by repeated treatment with a juvenile hormone analogue. J. Seric. Sci. Jpn., 54(4), 297-299.
 CHANG C.F., MURAKOSHI S., TAMURA S. (1972), Giant cocoon formation in the silkworm, *Bombyx mori* L., topically treated with methylenedioxyphenyl derivatives. Agric. Biol. Chem., 36(4), 692-694.
 CHOWDHARY S.K., SEHNAL F., RAJ S.K., RAJU P.S., MATHU SARITA (1986), Giant cocoon formation in *Bombyx mori* L. topically treated with juvenile hormone SJ-42-F. Sericologia, 26(4), 455-459.
 MURAKOSHI S., CHANG C.F., TAMURA S. (1972), Increase in silk production by silkworm, *Bombyx mori* L. due to oral administration of juvenile hormone analogue. Agri. Biol. Chem., 36, 695-696.

- NIHMURA M., AOMORI S., MORI K., MATSUI M. (1972), Utilization of synthetic compounds with JH activity for the silkworm rearing. *Agri. Biol. Chem.*, 38, 889-892.
- NIHMURA M., AOMORI S., OZAWA Y., MORI K., MATSUI M. (1974), Effect of novel analogues of the juvenile hormone. I. Effect of juvenile hormone analogues with different alkyl substituents at C-7 and C-11 on the silkworm *Bombyx mori* L., (Lepidoptera : Bombycidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 9(1), 34-40.

EFFET D'ANALOGUES DE L'HORMONE JUVENILE SUR LA CROISSANCE ET LA GLANDE SERICIGENE DU VER A SOIE *BOMBYX MORI*

S.K. CHOWDHARY, P.S. RAJU & R.K. OGRA

Regional Research Laboratory, Canal Road, Jammu-Tawi - 180 001, J. & K., Inde.

Les effets du méthoprène, du labomine et du diméthyle 2,6, 9(3,4 méthylène dioxypényl) nona 2,8 diène, ont été étudiés en applications locales sur le tergum abdominal du ver à soie, Bombyx mori L., après la quatrième mue. Des études précédentes ont montré que l'administration de juvénoides au 5ème âge larvaire chez B. mori provoque une augmentation de la production de soie. Bien que cette étude confirme ces observations, il a également été constaté qu'avec l'application de doses plus élevées de JH, la prolongation de la période larvaire est plus importante que la production de soie lorsque l'on prend en compte le poids de la soie/richeesse soyeuse. La dose la plus efficace est 0,01 µl/larve, lorsqu'elle est appliquée 48 heures et 72 heures après la dernière mue. On a également remarqué, dans cette étude, que le développement de la glande séricigène a lieu jusqu'à un moment bien précis, au-delà duquel le développement larvaire s'effectue avec une augmentation du poids larvaire/nymphal due à une augmentation de la période de nourrissage sans aucune augmentation significative de soie et de richesse soyeuse.

INTRODUCTION

De nombreux chercheurs (Akai et coll., 1971, 1985 ; Chang et coll., 1972 ; Murakoshi et coll., 1972 ; Nihmura et coll., 1972, 1974) ont démontré que les hormones juvéniles, leurs dérivés et analogues peuvent être utilisés comme régulateurs de croissance du ver à soie commercial pour améliorer son rendement en soie. Akai et coll. (1985) ont constaté que l'hormone synthétique JH C18 augmente de 30 % le poids de la couche soyeuse par rapport au témoin. Chang et coll. (1972) signalent une augmentation de 20 % du poids du cocon et du poids de la chrysalide et la formation de cocons géants lorsque les larves sont traitées avec des dérivés méthylène-dioxy-phényl. Chowdhary et coll. (1986) ont aussi constaté que l'hormone juvénile SJ-42 F permet d'augmenter de 21 % le rendement en soie et de plus de 40 % la richesse soyeuse par rapport au témoin.

Cette étude est menée pour évaluer l'effet des différents analogues de l'hormone juvénile sur la croissance et le rendement en soie du ver à soie *Bombyx mori* L., et permettre de déterminer le moment propice pour l'application de ces doses d'analogues de l'hormone juvénile et l'augmentation de la durée larvaire.

MATERIELS ET METHODES

Trois composés, à savoir le méthoprène (A), le labomine (B) et le 2,6 diméthyl 9(3,4 méthylène-dioxyphényl)-nona 2,8 diène (C) ont été utilisés afin de déterminer leur activité JH probable chez *Bombyx mori* L.

Le composé A a été fourni par le directeur du Malti Chem Research Centre - Nandesari, Gujarat - le composé B a été fourni par le Dr. F. Sehna - Académie des Sciences Tchécoslovaquie - et le composé C par l'Organic Chemistry Division - R.R.L., Jammu, India. Le labomine est un concentré

émulsifiable de méthoprine juvénile. Les structures de ces composés sont représentées sur la figure 1.

Préparation et application des doses :

Les composés A et C sont dissous dans de l'alcool et le composé B est dissous séparément dans de l'eau. Trois concentrations, à savoir : 1,0 µl/10 µl, 0,1 µl/10 µl et 0,01 µl/10 µl, ont été préparées et appliquées localement sur le tergum abdominal des larves à l'aide d'une micro-seringue de 100 µl contrôlée par un micro-applicateur.

Test des animaux et méthodes d'application :

Des larves au 5ème âge de l'hybride F1 RL 26 × RL 30 du ver à soie *Bombyx mori* L., (élevées au R.R.L. Jammu) ont été utilisées pour les traitements. Les larves ont été élevées sur des feuilles de mûriers sur des claies en bois en laboratoire à une température de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ et une humidité relative de 70 %. Des animaux tests de taille et poids identiques sont sélectionnés après la 4ème mue. Pour chaque composé, on a utilisé 12 lots d'animaux tests comprenant chacun trois réplicats. Chaque réplicat contient 50 animaux. Les trois premiers lots sont traités avec les composés A, B et C à 1,0 µl/10 µl, 0,1 µl/10 µl, 0,01 µl/10 µl et le 4ème lot avec 10 µl d'alcool (témoin eau) 48 heures après la sortie de la 4ème mue. Les autres lots sont traités avec des doses identiques 72 heures et 96 heures après la sortie de la quatrième mue.

RESULTATS

Les résultats des applications des trois composés test, à savoir méthoprène (composé A), labomine (composé B) 2,6 diméthyle-9(3,4 méthylendioxy phényl) nona 2,8 diène (composé C), sont donnés dans les tableaux I, II et III. Une lecture attentive des tableaux montre que le temps d'application et les doses tests ont un effet tout à fait significatif sur la période larvaire/l'augmentation de la durée larvaire, le pourcentage de survie, le poids du cocon, le poids de la chrysalide, le poids et le pourcentage de la coque.

Prolongation larvaire (durée du développement) :

Les tableaux I, II et III montrent que le prolongement de la période larvaire est proportionnel à la concentration de JH utilisée. Le méthoprène (composé A) un analogue d'hormone juvénile bien connu pour *Bombyx mori*, prolonge la période larvaire d'un jour et 20 heures par rapport au témoin pour une concentration de 0,01 µl par larve appliquée à 48 heures. D'autre part, l'application de 0,1 µl/larve de composé A 48 heures et 72 heures après la 4ème mue prolonge la période larvaire de 6 jours. Une concentration de 1,0 µl/larve semble être trop élevée et ne permet pas la formation du cocon.

Avec le composé B, une prolongation larvaire minimum d'un jour est obtenue avec une concentration de 0,01 µl/larve pour le traitement à 48 heures et une prolongation de 6 jours avec une concentration de 1,0 µl/larve pour les différents stades du traitement à savoir 48 heures, 72 heures et 96 heures après la 4ème mue.

On constate une prolongation larvaire de 4 jours et 4 heures par rapport au témoin après traitement avec une concentration du composé C dosé à 0,01 µl/larve et appliqué 48 heures après la mue ; et une prolongation de 8 jours et 4 heures avec une concentration de 1,0 µl/larve appliquée 96 heures après la mue au 5ème âge.

Les larves n'ayant pas été traitées avec le composé A sont saines et fortes et s'alimentent correctement même 10 jours après la sériposition des larves témoins. Par ailleurs, les larves traitées avec le composé C cessent de s'alimenter 2 à 3 jours après la sériposition des larves témoins, s'affaiblissent et meurent dans les 4 à 8 jours.

Poids du cocon :

Le poids du cocon moyen le plus élevé 3,41 g a été enregistré avec le composé A traité avec 0,1 µl/larve à 72 heures, ce qui donne une augmentation de 32,96 % du poids du cocon.

Avec le composé B dosé à 1,0 µl/larve à 48 heures, le poids du cocon est de 3,215 g ; dans ce cas, l'augmentation est de 22,39 %.

Avec le composé C pas de formation de cocon.

Coque soyeuse / Poids de soie :

On obtient un poids maximum de soie de 0,482 g lorsque les larves sont traitées avec le composé A, dosé à 0,01 µl/larve à 48 heures. Par ailleurs, avec le produit B dosé à 0,01 µl/larve à 96 heures, on obtient un poids de coque de 0,496 g.

Poids des chrysalides :

On obtient le poids de chrysalide le plus élevé (3,011 g), soit une augmentation de 38,06 % par rapport au témoin, avec le composé A dosé à 1 µl/larve 72 heures après la sortie de mue, alors qu'on obtient une augmentation du poids des chrysalides de 27,60 % avec une application à 1,0 µl/larve 48 heures après la dernière mue.

Richesse soyeuse :

La richesse soyeuse la plus significative, à savoir 19,21 %, est obtenue avec le composé A dosé à 0,01 µl/larve à 72 heures, ce qui correspond à une augmentation de 2,49 % avec un prolongement de la période de nourrissage de 2 jours. Le composé B donne la même richesse soyeuse (19,21 %) appliqué à 0,01 µl/larve après 48 heures, ce qui correspond à une augmentation de 8,33 % par rapport au témoin avec un prolongement de la période de nourrissage d'un jour seulement.

Taux de survie (jusqu'à la chrysalide) :

On enregistre un taux de survie de 95 % avec le composé A dosé à 0,01 µl/larve et de 95 à 100 % pour la même dose après 48 heures, 72 heures et 96 heures de traitement avec le composé B. Avec une concentration plus forte à savoir 1,0 µl/larve pour le composé A, la formation du cocon n'a pas lieu mais les larves survivent même dix jours après sérirposition des larves témoins traitées avec le composé B dosé à 1,0 µl/larve à 96 heures. Les larves donnent des cocons légers avec des chrysalides mortes. A l'inverse, avec le composé C, toutes les larves meurent au bout de 4 à 8 jours après la sérirposition des larves témoins.

DISCUSSION

Cette étude concernant l'effet des analogues d'hormone juvénile, à savoir le méthoprène (composé A), le labomine (composé B) et le 2,6-diméthyl 9-(3,4 méthylènedioxy phényl) nona-2,8-diène (Composé C), sur le ver à soie *Bombyx mori*, montre que le temps d'application efficace des divers analogues d'hormone juvénile diffère d'un composé à un autre ; mais pour la plupart des composés, il se situe entre 48 heures et 96 heures après la 4ème mue. Pour certains composés, le temps d'application efficace pour obtenir une augmentation significative du poids de la soie est 48 heures, comme c'est le cas pour le composé A ; cette augmentation est inversement proportionnelle au temps d'application : à savoir à 48 heures, on obtient une augmentation de soie de 10,78 % alors qu'à 72 heures et 96 heures, on obtient respectivement 6,72 % et 3,58 %. Par ailleurs, avec le composé B, le temps d'application est directement proportionnel au rendement en soie : à savoir à 48 heures, on obtient une augmentation du poids de la coque de 4,77 % et, à 72 heures et 96 heures, on obtient respectivement une augmentation de 5,38 % et 11,49 % avec une même dose de 0,01 µl/larve. Ces résultats sont nouveaux, puisque Chang et coll. (1972) ont découvert que l'effet de l'hormone juvénile sur les larves de vers à soie était plus élevé (du point de vue de la production de soie) lorsque celle-ci est appliquée 2 ou 3 jours après la 4ème mue. D'autre part, Chowdhary et coll. (1986) ont constaté qu'une des hormones juvéniles (SJ-42-F) donne l'augmentation de soie la plus forte lorsque celle-ci est appliquée le 3ème jour et 72 heures après la mue.

L'allongement de la période larvaire est proportionnel à la concentration d'hormone juvénile. La période larvaire peut être prolongée de 1 à 10 jours par traitement des larves au 5ème âge avec des analogues d'hormone juvénile, à différentes concentrations allant de 0,01 µl/larve jusqu'à 1,0 µl/larve. Les tableaux I et II montrent clairement que lorsqu'il y a augmentation de concentration

d'hormone juvénile de 0,01 µl/larve à 0,1 µl/larve et 1,0 µl/larve on observe également une augmentation de la durée de la période larvaire, aussi bien avec le composé A qu'avec le composé B. Mais cet allongement de la période larvaire n'est cependant bénéfique qu'avec une faible concentration (0,01 µl/larve) tant pour les composés A que pour B, utilisés à 48 heures, 72 heures et 96 heures, puisqu'une augmentation positive du poids de la coque (soie) est obtenue avec cette dose uniquement ; lorsque le composé A, dosé à 0,01 µl/larve, est appliqué 48 heures après la mue, on constate une augmentation du poids de la soie de 10,78 %, alors qu'avec le composé B dosé également à 0,01 µl/larve et appliqué à 96 heures, le poids de la soie augmente de 11,49 %. Cette augmentation indique une hausse réelle du rendement en soie.

L'augmentation du poids de la chrysalide est un facteur négatif puisqu'elle correspond uniquement à une augmentation du poids de la chrysalide du cocon et non de la couche de soie, ce qui est un caractère économique important pour la filature ; bien que des chrysalides plus grosses peuvent permettre une augmentation de la fécondité, le prolongement de la période larvaire obtenu avec une concentration plus forte est si longue qu'il n'est pas économique d'avoir de plus grosses chrysalides nourries 3 à 6 jours de plus pour obtenir une faible augmentation de la fécondité. D'autre part, Chang et coll. (1972) et Chowdhary et coll. (1986) signalent que des doses plus élevées augmentent encore la période larvaire mais les larves présentent des malformations et meurent après six jours de prolongation larvaire. Nous avons également constaté cela au cours de cette étude, lorsque les larves sont traitées avec du méthoprène, elles s'alimentent bien et sont saines même dix jours après la séruposition des larves témoins puis elles meurent. L'effet du composé C est lui négatif puisque les larves meurent dès le 4ème jour après la séruposition des larves témoin. Aucune des larves traitées avec le composé C n'a filé de cocon.

Il a été montré que le poids du cocon et le poids de la chrysalide sont proportionnels à la concentration d'hormone juvénile et à la durée du nourrissage (Akai et coll., 1971 ; Chowdhary et coll., 1986) ; notre étude montre cependant qu'avec une forte concentration la séruposition n'a pas lieu même dix jours après la séruposition des larves témoins. Ceci montre clairement que les doses efficaces doivent être déterminées pour chacun des analogues d'hormone juvénile.

Le poids de soie et la richesse soyeuse sont des caractères qui n'ont une signification que d'un point de vue industriel. Récemment, Chowdhary et coll. (1986) ont montré que le poids de la soie augmentait pendant 1 à 3 jours au cours de la prolongation de la période larvaire, après quoi la richesse soyeuse évolue négativement, comme le montrent les tableaux I et II de cette étude, pour le méthoprène et le labomine. Il apparaît clairement qu'avec l'augmentation de la durée de nourrissage de 1 à 3 jours, seul le poids larvaire augmente, ce qui entraîne une augmentation du poids de la chrysalide seulement et non du poids de la coque.

D'après cette étude, le taux de survie dépend de différents facteurs tels que le dosage d'hormone juvénile, la nature des analogues JH appliqués et enfin du type de solvant utilisé. Les tableaux I, II et III montrent clairement qu'avec une dose plus faible pour chacun des composés A et B, le taux de survie est plus élevé et celui-ci décroît si l'on augmente la dose. En ce qui concerne le labomin (Composé B), le taux de survie est également plus élevé, puisque ce composé est soluble dans l'eau, ce qui n'affecte pas le ver à soie. Il n'en est pas de même pour le composé A pour lequel l'alcool est utilisé comme solvant.

L'objectif principal, lorsque l'on a recours aux analogues d'hormone juvénile chez le ver à soie, est d'obtenir davantage de soie. Par ailleurs, une période de nourrissage plus longue (1 à 2 jours) n'est pas économique puisqu'elle demande plus de travail et de nourriture. On constate une augmentation moyenne d'environ 1 kgde soie par once de graines élevées, lorsqu'elles sont traitées au labomine à raison de 0,01 µl/larve. Si l'on tient compte des surcharges en feuilles et en travail, le rapport est bénéfique, puisque l'utilisation de labomine (analogue d'hormone juvénile) augmente la production de soie de manière significative. D'autre part, le labomine est, pour l'instant, le seul composé soluble dans l'eau et pouvant être utilisé par tous les agriculteurs.

TISSUE-SPECIFIC EXPRESSION OF PROTEIN FACTORS SHOWING AFFINITY FOR THE PROMOTER REGIONS OF SILK PROTEIN GENES IN *BOMBYX MORI*

J. DREVET & P. COUBLE*

Centre de Génétique moléculaire et cellulaire, CNRS, UMR 106, Bat^{nt} 741, Université Claude Bernard, Lyon I, 43, boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

*The analysis of DNA-protein interactions in the fibroin and P25 gene 5'-flanking regions showed the presence of common protein factors (Drevet, 1989 ; Drevet et al., submitted). In order to determine whether these factors can account for the close coordination and limited expression of P25 and fibroin genes in the territory of *Bombyx mori* posterior silk gland, migration retardation assays involving protein fractions from the gland median cells (middle silk gland territory) were carried out, as well as with probes encompassing P25 and fibroin promoter region and a probe deriving from a gene specifically expressed in the middle silk gland (sericin gene 1). Identical DNA-protein complexes (on the basis of their electrophoretic migration and on the basis of competition tests) were thereby underscored. These findings suggest that DNA-protein interactions common to P25 and fibroin genes do not directly govern the territory-regulated expression of these two genes and reinforce the idea that these protein factors have a part to play in the expression intensity of these genes.*

Keywords : *Bombyx mori*, silk gland, P25, fibroin and sericin 1 silk genes, DNA-protein interactions, gene expression regulation, tissue specificity.

INTRODUCTION

The silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*, is an organ specialized in the production of a limited number of proteins that make up the silk thread. Each gland comprises two secretory parts which are separate morphologically and functionally :

- a posterior region, or secretor, where the major silk proteins are synthesized, i.e. the large and the small fibroin, (the protein P25), and a median region, or middle silk gland, where sericins are elaborated.

In the secretor cells P25 and fibroin genes are transcribed in an intense and coordinated manner. This coordination shows itself at the same time in the intensity of the transcript accumulation (Couble *et al.*, 1983) in time, since the activity of these genes is punctuated by the cycle of the insect larval development (genes are expressed during inter-molt periods and silent during molts) and in space since the activity of both these genes is restricted to the posterior silk gland only (Couble *et al.*, 1987).

One of the interesting aspects of this biological system lies in the fact that the middle silk gland cells, in which at least two sericin genes are expressed, operate synchronously with the posterior silk gland and undergo the same events during the development. This coupling does not result from a direct control of sericin production by fibroin accumulation in the middle silk gland, since *Nd* (Suzuki,

* To whom correspondence should be addressed.

1977) and *Nd-S* (Takei *et al.*, 1984) mutants were proved to produce a normal amount of sericins instead of silk fibroin.

On the contrary, the occurrence of *Fic* (flimsy cocoon) mutants which produce very little silk (Suzuki, 1977) makes it probable that regulation will exert itself directly on each gene.

These characteristics enable one to think that a level of gene expression coordination exists throughout the organ. Indeed, besides the close concertation leading to intensive production of two proteins (P25 protein and fibroin) in the same tissue (the posterior silk gland), a question arises as to the mechanisms regulating secretion synchronism of silk proteins between the median and posterior parts of the silk gland.

It was previously demonstrated that similar protein factors, present in posterior silk gland cell extracts, bind to conserved sequences upstream from P25 and fibroin genes (Drevet, 1989 ; Drevet *et al.*, submitted). The presence of these factors in a sequence domain acting as a fibroin gene enhancer enabled us to suppose that they determine the intensity of expression of both these genes in the posterior silk gland territory. We thereafter tried to determine whether these DNA-protein interactions, the only intense complexes underscored in a region of strong homology between the two genes, could also account for the tissue specificity of P25 and fibroin gene expression in the posterior silk gland.

MATERIALS AND METHODS

The techniques used to prepare the protein extracts and to analyse the DNA-protein interactions have already been described (Drevet, 1989 ; Drevet *et al.*, submitted).

Biological material :

The experiments were conducted with first generation hybrids from the European strains 200 × 300 of the silkworm, *Bombyx mori*, maintained at the Unité Nationale Séricicole (La Mulatière, Lyon). The rearings were carried out on mulberry leaves under monitored conditions (22°C, 70 % humidity, 12-hour photoperiod). The silk gland (posterior or middle silk gland) was taken from fifth instar larvae at 48 hours.

Recombining DNAs :

P25 P₁, P_{1A} and P_{1B}, sericin S₁ and fibroin F₁ fragments (see fig. 1) are respectively derived from sub-clones pUC18/P25₁₄₅ (Taq I [-162] / Dpn I [-18]), pUC18/Ser₁₂₂₆ (Hind III [-280] / Taq I [-54]) and pUC18/Fib₁₆₇ (Dra I [-232] / Taq I [-65]). P25, fibroin and sericin 1 sub-clones are respectively derived from the genomic clones pBmP25.21, pFB29 and Bm SJ 5 isolated from Eco RI library (Japanese strain 703) constructed by T. Eickbush and F. Kafatos (1982, Harvard, Cambridge).

Protein analysis :

One-dimension electrophoresis (Laemmli, 1970)

Proteins were precipitated in acetone, the protein pellets were resuspended in a buffer (tris-HCl 62.5 mM pH 6.8; 2.3 % SDS ; 2 % DTT ; 10 % glycerol) and the extracts were incubated for 5 minutes at 100°C. The separation was carried out in a discontinuous system with 4 % acrylamide in stacking gel and 7.5 or 12 % in resolving gel (size : 200 × 200 × 0.75 mm). Migration was done in a 10°C-chilled "Biorad: Protean II" apparatus, in a buffer (0.025 M Tris-HCl pH 8.3, 0.192 M glycine, 0.1 % SDS), in the following electric conditions (for two gels) :

- stacking gel : 40 mA (constant intensity), 1 hour.
- resolving gel : 80 mA (constant intensity), 2.5 hours.

3 to 5 µg protein deposits per sample were made and pyronine was used as a stained marker. The molecular weight tracers (Pharmacia kit) were catalase (232 kDa), dehydrogenase lactate (140 kDa), phosphorylase B (94 kDa), bovine serum albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa) and lactalbumin (14.4 kDa). The separate proteins were stained with silver nitrate according to Morrissey's technique (1981). The background was reduced after staining by gel incubation for 20 seconds in Farmer reducer (Heukeshoven and Dernick, 1985).

Computer analysis of the sequences :

The computer analysis of the sequences was carried out on VAX 730 computer of the Institut d'Evolution Moléculaire in Lyon, with the assistance of its members and with the programs they have perfected. Secondary structure research was carried out with the program of Papnicolaou *et al.* (1984).

RESULTS

Figure 1 summarises the results of P25P1, P1A and P1B and F1 fibroin probe incubation in the protein extracts of posterior silk glands (Drevet, 1989 ; Drevet *et al.*, submitted). From these investigations it appears that at least one identical DNA-protein complex occurs in the 5'-flanking regions of P25 and fibroin gene, involving protein factors contained in the posterior silk gland cells.

In order to test whether the affine protein factors for sequences upstream from P25 and fibroin genes—specific to the posterior silk gland—also govern the tissue-specific expression of these genes in this territory, protein extracts from the middle silk gland and posterior silk gland cells were prepared at the same time. After fractionation under standard conditions on heparin-sepharose column, an aliquot part of each fraction was loaded on acrylamide gel (7.5 and 12 %), so as to compare the band patterns obtained with the two types of extracts (figure 2). It can be noted that there is a close homogeneity between the proteic fractions stemming from the cells of both territories of the silk gland. There is therefore no major variation in the number, the amount and the distribution of the protein species contained in the cells of either territories of the organ.

In the first set of experiments, P1A and P1B probes (see figure 1) were incubated with constant quantities (15 and 30 µg) of proteins 0.1 M KCl fractions from both types of extracts (figure 3). These experiments reveal that identical complexes, on the basis of their electrophoretic migration, are obtained with the two probes in both fractionated protein extracts. As is the case for the protein extracts from the posterior silk gland cells, only the 0.1 M KCl chromatographic fraction of the middle silk gland cell extract gives strong intensity complexes. The intensity of the retarded band is similar in the fractions stemming from both extracts, which suggests that bound protein factors have an identical abundance in the middle and posterior silk gland cells (the numbers of cells per gland and per territory being approximately similar, Fayard, 1976). Hence the protein factors bound *in vitro* to domains -162 to -18 of P25 gene, expressed solely in the posterior silk gland cells, seem to be also present in the middle silk gland cells.

In the second set of experiments, we first tried to determine whether the 5'-flanking sequences of a selectively expressed gene in the middle silk gland (in this case sericin 1 gene) could give DNA-protein complexes with protein extracts from the posterior silk gland cells and secondly whether the complexes formed could be specific to this gene or not. To this end, a sericin S1 probe stretching between -280 and -54 positions (see Fig. 4) was incubated with the 0.1 M KCl fraction of a posterior silk gland protein extract. A retarded complex was obtained in such conditions, its specificity was established by homologous competition with an excess of S1 non-radioactive fragment (5 to 10 times in molar concentration).

Cross competition assays were carried out to assess the formation of this complex by non-radioactive fragments corresponding to P25 P1 and F1 fibroin probes (see Fig. 4). They showed that small amounts of either competing fragments inhibit the complex formation between protein(s) contained in the 0.1 M KCl fraction of an extract of posterior silk gland and Ser 1 probe. The factor(s) binding to sericin 1 gene -280 to -54 sequence domain therefore is (are) common to the three genes.

DISCUSSION

The protein factors giving A and B complexes with DNA upstream from P25 gene do not seem to be specific to the posterior silk gland cells since identical complexes were observed with cell extracts from the middle silk gland and since the sequences upstream from Ser1 gene give complexes which compete with P25 and fibroin gene promoters in posterior silk gland protein extracts. Similar observations have been made by the group of Y. Suzuki. In the same way, protein extracts elaborated from middle silk gland, posterior silk gland or ovarian tissue cells gave identical electrophoretic migration complexes with the fibroin gene enhancer (Suzuki and Suzuki, 1988). Besides, Tsuda and

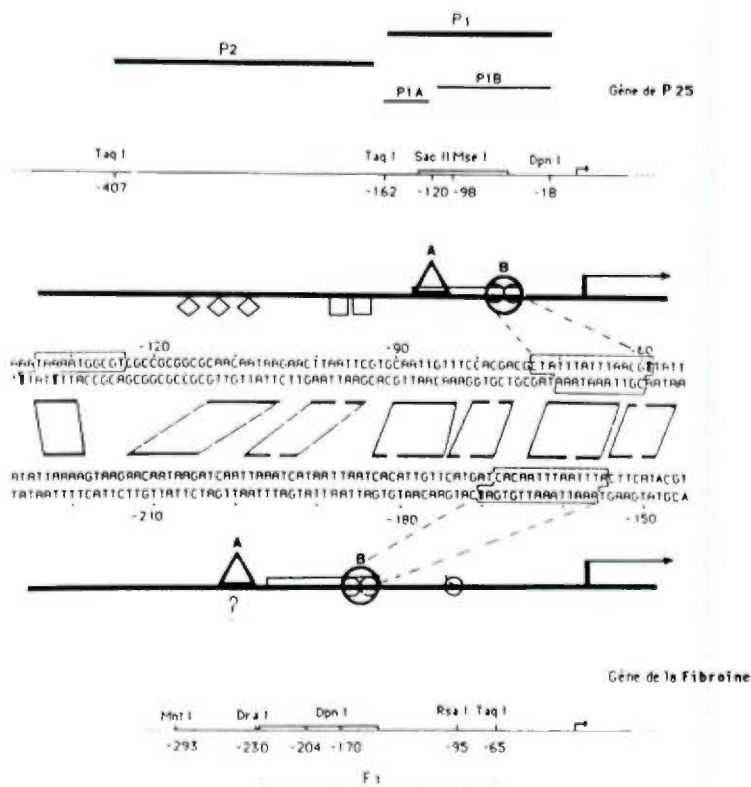


Fig. 1 : Summary of the DNA-protein interactions found upstream from P25 and fibroin genes (Drevet, 1989 ; Drevet *et al.*, submitted) in fractionated protein extracts from *Bombyx mori* posterior silk gland cells.

A protein complex (called B) is carried by P25 and fibronin gene 5'-flanking regions. The site corresponds to a sequence which is rich in T and A residues and which is present in regions of strong homology between the two genes. The second complex (called A) located upstream, and whose formation is independent from that of complex B is observed on the 5'-flanking regions of P25 gene. Its presence upstream from the fibronin gene is under study (manuscript in progress). DNA-protein interactions have also been observed in the -406 to -163 sequence domain and are being studied.

Fig. 1 : Résumé des interactions DNA-protéines trouvées en amont des gènes de P25 et de la fibroïne (Drevet, 1989 ; Drevet et coll., soumis) dans des extraits protéiques fractionnés de cellules postérieures de la glande séricigène de *Bombyx mori*.

Un complexe protéique (nommé B) est porté à la fois par les régions 5'-flanquantes des gènes de P25 et de la fibroïne. Le site de reconnaissance correspond à un motif riche en résidus A et T, présent dans des domaines de fortes homologies entre les deux gènes. Un second complexe (nommé A) situé en amont, dont la formation est indépendante de celle du complexe B, est observé sur les séquences 5'-flanquantes du gène de P25. Sa présence en amont du gène de la fibroïne est en cours d'étude (manuscrits en préparation). Des interactions ADN-protéines ont aussi été observées avec le domaine de séquence -407 à -163 et sont en cours d'études.

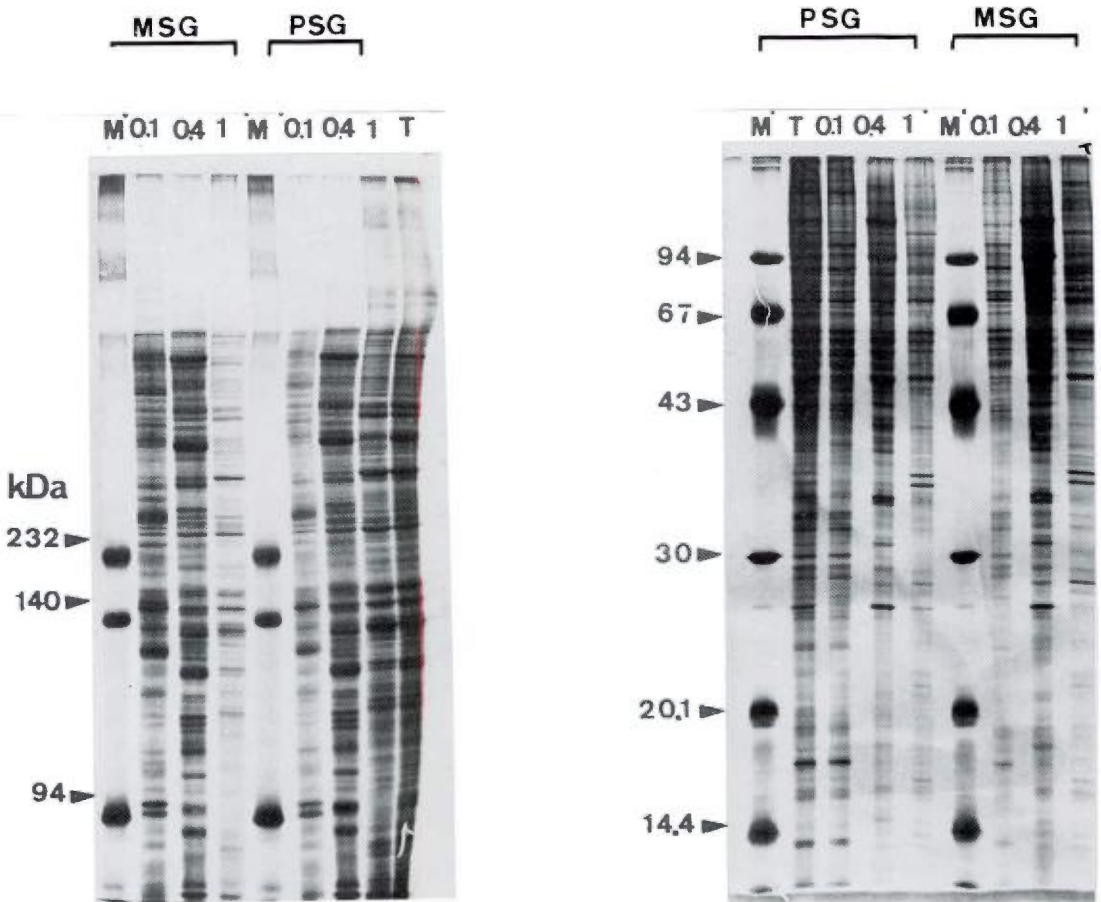


Fig. 2 : Comparative one-dimension electrophoresis of Heparin-sepharose fractions of protein extracts from the middle silk gland and posterior silk gland cells of *Bombyx mori*.

An aliquot part of the proteins of 0.1, 0.4 and 1 M KCl fractions (about 20 µg proteins) derived from fractionated extracts from the posterior silk gland cells (PSG) or from middle silk gland cells (MSG) were separated by using 7.5 % and 12 % acrylamide gels SDS-PAGE.

Fig. 2 : Electrophorèses mono-dimensionnelles comparatives des fractions Héparine-sépharose d'extraits protéiques de cellules de réservoirs et de sécréteurs de la glande séricigène de *Bombyx mori*.

Une partie aliquote des protéines des fractions 0,1, 0,4 et 1 M KCl (soit 20 µg de protéines environ) issus des extraits fractionnés de cellules postérieures (PSG) ou de cellules médianes (MSG) de la glande séricigène ont été séparées sur gel SDS-PAGE 7,5 % et 12 %.

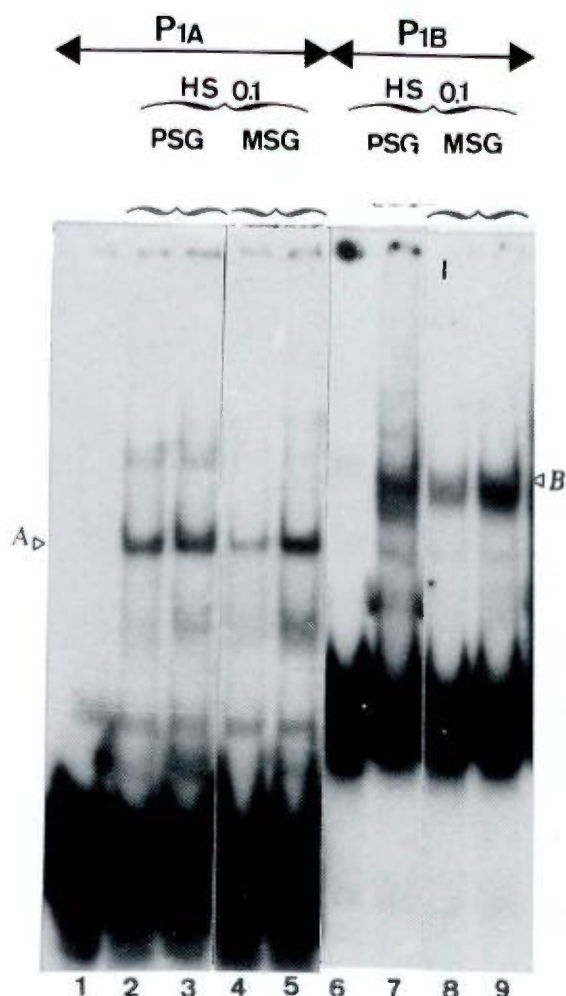


Fig. 3 : Migration retardation assay with P_{1A} and P_{1B} probes. Comparison between 0.1 M KCl fractions from middle silk gland and posterior silk gland protein extracts.

P_{1A} and P_{1B} (1ng) probes were incubated without proteins (lanes 1 and 6) and with 15 μ g (lanes 2, 4 and 8) and 30 μ g (lanes 3, 5, 7 and 9) 0.1 M KCl protein factors of posterior silk gland cells (lanes 2, 3 and 7) or middle silk gland cells (lanes 4, 5, 8 and 9).

Fig. 3 : Test de retardement de migration avec les sondes P_{1A} et P_{1B} . Comparaison entre les fractions 0,1 M KCl des extraits protéiques de réservoirs et de sécréteurs.

Les sondes P_{1A} et P_{1B} (1 ng) ont été incubées en absence de protéines (puits 1 et 6) et en présence de 15 μ g (puits 2, 4 et 8) et 30 μ g (puits 3, 5, 7 et 9) des fractions protéiques 0,1 M KCl de cellules de sécréteurs (puits 2, 3 et 7) ou de cellules de réservoirs (puits 4, 5, 8 et 9).

Suzuki (1983) demonstrated that, in an *in vitro* transcription system prepared with cells from the posterior silk gland, both fibroin gene and sericin 1 gene can be transcribed, the two genes are also transcribed in a system prepared from middle silk gland cells. Hence, all the factors necessary for the transcription of both genes are present in the middle silk gland and posterior silk gland cells. Firstly, it may be suggested that there is no factor repressing the activity of these genes in cells in which they do not normally express. The hypothesis that the same factor may act as an activator in the posterior silk gland cells and as a repressor in the middle silk gland cells cannot, however, be discarded.

The studies of Tsujimoto and Suzuki (1984) and Suzuki and Adachi (1984) on the fibroin gene stemming from producing (posterior silk glands) and non-producing (middle silk glands) tissues showed neither sequence difference upstream from the +1 nucleotide, nor methylating difference in the two DNAs, and gave evidence that both are transcribed equally efficiently in an homologous transcription system. The non-expression of the fibroin gene in the middle silk gland cells is not consequently due to structure modifications of the gene itself. Moreover, Tsuda and Suzuki (1983) reported that the region upstream from sericin 1 gene stimulates the transcription of its own promoter as well as that of heterologous promoters in silk gland extracts. Lastly, recently Hui and Suzuki (1988, submitted) observed that this stimulation could be partially inhibited by adding a competitor fragment covering the fibroin gene enhancer. These observations suggest that common factor(s) may be involved in the control of both these genes.

Two possibilities can then be put forward to explain the strict tissue expression specificity of genes in the silk gland.

- First possibility : two categories of factors exist in the silk gland cells. Factors specific to each territory of the organ and factors common to both regions or even to other tissues. Thus, the proteins giving complexes A and B with the region upstream from P25 gene could be found to be common to several cellular types. Tissue-specific gene expression in the posterior silk gland territory might then be ensured by other proteins, probably at a second level by means of protein-protein interactions. As suggested by several authors (Yamamoto, 1985 ; Echols, 1986 ; McKnight and Tjian, 1986) expression specificity could be generated by the presence in one particular tissue of a single combination of transcription factors even though each factor is also present in several tissues.

- Second possibility : affine proteins from the 5'-flanking regions of P25 and fibroin genes although seemingly ubiquitous in the cells of *Bombyx mori* are specifically modified in posterior silk gland cells so as to play a part in the tissue specificity of P25 and fibroin gene expression. It has indeed been reported in several systems that the specific factors which regulate transcription in a given cell or tissue can be activated by post-translational modifications (phosphorylations, glycosylations, ...) of precursors present in many different cellular types (Sen and Baltimore, 1986 ; Lee *et al.*, 1987 ; Angel *et al.*, 1987 ; Jackson and Tjian, 1988 ; Krause *et al.*, 1988).

At this stage of the analysis, it is difficult to choose between either possibility. It may even be possible that both processes be implemented in the posterior silk gland cells of *Bombyx mori*. In fact, we have seen (Drevet, 1989 ; Drevet *et al.*, submitted) that certain retarded complexes were indeed due to protein-protein associations on the DNA affine factors upstream from fibroin and P25 genes. Furthermore, recent results have confirmed that protein-protein interactions are necessary for factors present in posterior silk gland cell extracts to acquire a capacity to bind with the enhancer of fibroin gene (Matsuno *et al.*, 1989). Lastly, we have recently noted that, during the purification of the factor involved in the formation of complex B, the latter presented itself in the posterior silk gland cells in a glycosylated form (B. Durand, personal communication). Further investigations are under way to establish whether the factors we have brought to the fore regulate the tissue specificity of silk gene expression in the silk gland or if the latter is governed by other factors and/or other sequences. Indeed, the DNA-protein interactions underscored on P25 gene upstream from the homologous region (Drevet, 1989 ; Drevet *et al.*, submitted) may play an essential part in these phenomena of territory-regulated expression.

On the other hand, if the experiments related in this paper tend to demonstrate that protein factors which give the major complexes on the 5'-flanking regions of silk genes (P25, fibroin and sericin 1) do not directly govern the territory specificity of expression of these genes in the silk gland, they reinforce the idea we have already put forward on the presumed role of these factors in the intensity

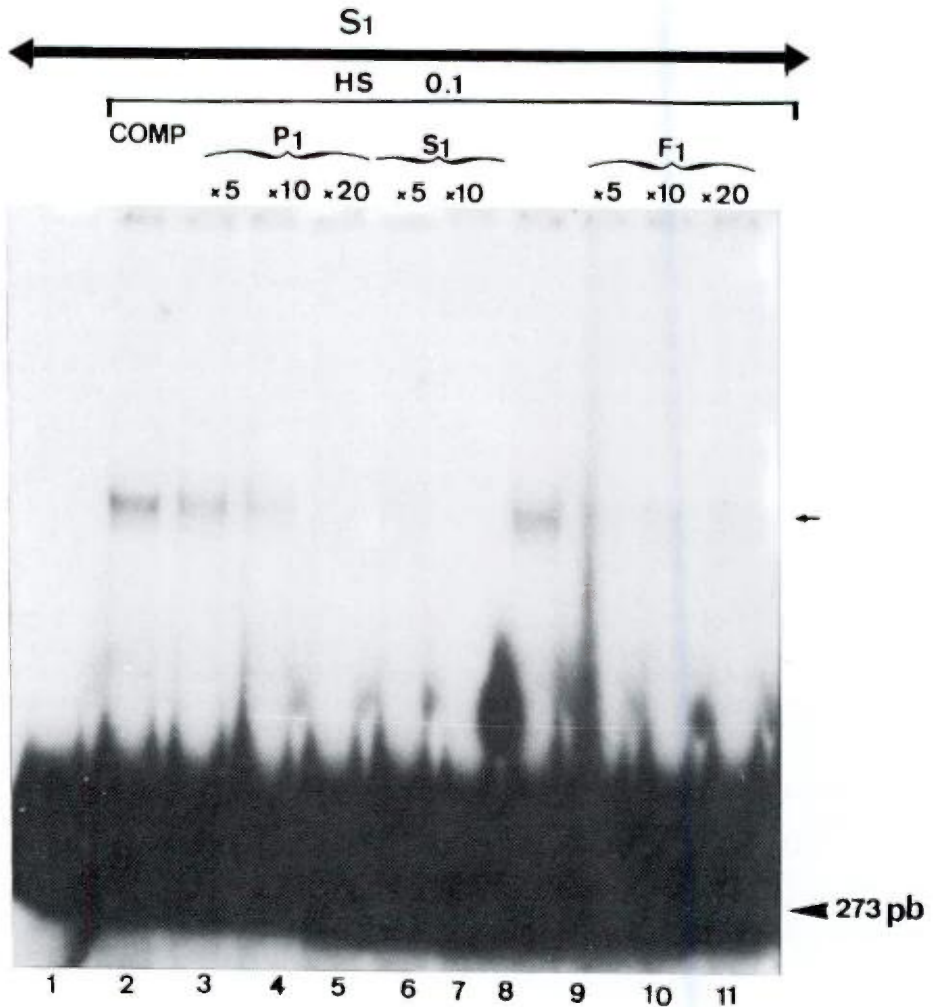


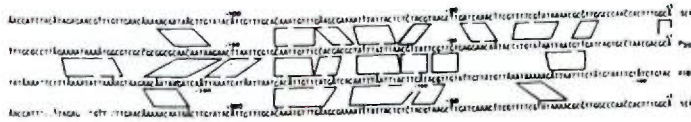
Fig. 4 : Migration retardation assay with sericin 1 probe (S₁ ; -280/-54) and the 0.1 M KCl fraction of a posterior silk gland protein extract. Competition through P₁ P25 and F₁ fibroin fragments.

S₁ (1 ng) probe was incubated without proteins (well 1) and with 30 µg 0.1 M KCl protein fraction (lanes 2 to 11). The competitions were carried out with a 5, 10 and 20 fold-molarity excess of P₁ non-radioactive fragment (lanes 3 to 5), 5 and 10 fold of S₁ homologous cold fragment (lanes 6 and 7) and 5, 10 and 20 fold of F₁ cold fragment (lanes 9 to 11).

Fig. 4 : Test de retardement de migration avec la sonde sérécine 1 (S₁ ; -280/-54) et la fraction 0,1 M KCl d'un extrait protéique de cellules de sécréteurs. Compétitions par les fragments P25 P₁ et fibroïne F₁.

La sonde S₁ (1 ng) a été incubée en absence de protéines (puits 1) et avec 30 µg de protéines de la fraction 0,1 M KCl (puits 2 à 11). Les compétitions ont été réalisées avec un excès de 5, 10 et 20 fois en molarité du fragment froid P₁ (puits 3 à 5), 5 et 10 fois du fragment froid homologue S₁ (puits 6 et 7) et 5, 10 et 20 fois du fragment froid F₁ (puits 9 à 11).

5A



58

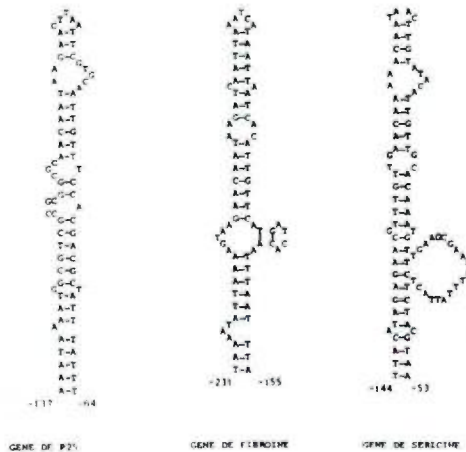


Fig. 5 : 5a. Sequence homologies upstream from P25 and sericin 1 gene with the enhancer region of fibroin gene.

5b. Putative secondary structures spotted in P25, fibroin and sericin 1 gene 5'-flanking regions.

They partially cover the domains presented above (Fig. 5a).

Fig. 5 : 5a. Homologies de séquences en amont des gènes de P25 et de séricine 1 avec la région enhancer du gène de la fibroïne.

5b. Structures secondaires putatives repérées dans les régions 5'-flanquantes aux gènes de P25, fibroïne et sérine 1.

Elles recouvrent partiellement les domaines présentés ci-dessus (figure 5a).

of transcription of these three genes. Indeed, Michaille (1987) demonstrated that during the fifth instar the accumulation of Ser1 gene messenger RNAs in the middle silk gland is exponential and comparable to that of the fibroin gene and P25 messengers in the secretor (Maekawa and Suzuki, 1980 ; Couble *et al.*, 1981). Now a number of sequence homologies exists in the region upstream from Ser1 gene with the domains which have already been found to be homologous between 5'-flanking sequences of P25 and fibroin genes (see Fig. 5a) (Couble *et al.*, 1985 ; Chevillard, 1986). The absence of equivalent homologies upstream from a second gene encoding for a sericin (Ser2) (Michaille, 1987), expressed with a low intensity in the middle silk gland, as well as the lack of repeated inversed sequences potentially able to form stable secondary structures -as shown upstream from the other three genes (Fig. 5b) (Couble *et al.*, 1985 ; Chevillard, 1986)- suggest that these sequences, via the protein factors which recognize them, could control the level of expression of these three genes.

REFERENCES

- ANGEL P., IMAGAWA M., CHIU R., STEIN B., IMBRA R.J., RAHMSDORF H.J., JONAT C., HERRLICH P., KARIN M. (1987), Phorbol ester inducible genes contain a common *cis* -element recognized by a TPA-modulated *trans*-acting factor. *Cell*, 49, 729.
- CHEVILLARD M. (1986), Structure fine du gène de la protéine P25 chez *Bombyx mori*. Analyse comparée de sa séquence nucléotidique avec celle des gènes codant pour la fibroïne et la séricine. Thèse de Doctorat. Université Lyon I.
- COUBLE P., GAREL A., PRUDHOMME J.C. (1981), Complexity and diversity of polyadenylated mRNA in the silk gland of *Bombyx mori* changes related to fibroin production. *Developmental Biol.*, 82, 139.
- COUBLE P., CHEVILLARD M., MOINE A., RAVEL-CHAPUIS P., PRUDHOMME J.C. (1985), Structural organization of the P25 gene of *Bombyx mori* and comparative analysis of its 5'-flanking DNA with that of the fibroin gene. *Nucleic Acids. Res.*, 13, 1801.
- COUBLE P., MICHAILLE J.-J., GAREL A., COUBLE M.L., PRUDHOMME J.C. (1987), Developmental switches of sericin mRNA splicing in individual cells of *Bombyx mori* silk gland. *Developmental Biol.*, 124, 431.
- DREVET J. (1989), Expression concertée des gènes codant pour les protéines de la soie chez *Bombyx mori*. Des facteurs protéiques identiques reconnaissent les régions 5'-flanquantes des gènes de P25 et de la fibroïne. Thèse de Doctorat. Lyon I.
- ECHOLS H. (1986), Multiple DNA protein interactions governing high precision DNA transaction. *Science*, 233, 1050.
- EICKBUSH T.H., KAFATOS F.C. (1982), A walk in the chorion locus of *Bombyx mori*. *Cell*, 29, 633.
- FAYARD J.-M. (1976), Etude biométrique des glandes séricigènes en rapport avec la production de soie chez *Bombyx mori*. Thèse de spécialité, Université Lyon I.
- HEUKESHOVEN J., DERNICK R. (1985), Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*, 6, 103.
- JACKSON S.P., TJIAN R. (1988), O-glycosylation of eukaryotic transcription factors : implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell*, 55, 125.
- LAEMMLI U.K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.
- LEE K.A.W., HASLINGER A., KARIN M., TJIAN R. (1987), Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the metallothionein gene and SV40. *Nature*, 325, 368.
- McKNIGHT S., TJIAN R. (1986), Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cell*, 46, 795.
- MAEKAWA H., SUZUKI Y. (1980), Repeated turn-off and turn-on of fibroin gene transcription during silk gland development of *Bombyx mori*. *Developmental Biol.*, 78, 394.

- MATSUNO K., SUZUKI T., TAKIYA S., SUZUKI Y. (1989), Complex formation with the fibroin gene enhancer through a protein-protein interaction analyzed by a modified DNA-binding assay. *J. Biol. Chem.*, 264, 4599.
- MICHAILLE J.-J. (1987), Clonage de 5 gènes spécifiques du réservoir de la glande séricigène de *Bombyx mori*. Contrôle de leur expression et de l'épissage différentiel des ARN messagers d'un gène de sérécine. Thèse de Doctorat, Lyon I.
- MORISSEY J.H. (1981), Silver stain for proteins in polyacrylamide gels : a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.*, 117, 307.
- PAPANICOLAOU C., GOUY M., NINO J. (1984), An energy model that predicts the correct folding of both tRNA and the 5S RNA molecules. *Nucleic Acids. Res.*, 12, 31.
- SEN R., BALTIMORE D. (1986), Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, 46, 705.
- SUZUKI Y. (1977), Differentiation of the silkgland. A model system for the study of differential gene action. In "Results and problems in cell differentiation", 8, 1. Edited by W. Beermann. Berlin/Heidelberg/New York, Springer-verlag.
- SUZUKI Y., ADACHI S. (1984), Signal sequences associated with fibroin genes expression are identical in fibroin-producer and -non producer tissues. *Dev. Growth and Differ.*, 26, 139.
- SUZUKI T., SUZUKI Y. (1988), Interaction of composite protein complex with the fibroin enhancer sequence. *J. Biol. Chem.*, 263, 5979.
- TAKEI F., KIMURA K., MIZUNO S., YAMAMOTO T., SHIMURA K. (1984), Genetic analysis of the *Nd-s* mutation in the silkworm *Bombyx mori*. *Jpn. J. Genet.*, 59-307.
- TSUDA M., SUZUKI Y. (1983), Transcription modulation *in vitro* of the fibroin gene exerted by a 200-base-pair region upstream from the "TATAA" box. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 7442.
- TSUJIMOTO Y., SUZUKI Y. (1984), Natural fibroin genes purified without cloning procedures from fibroin-producing and non-producing tissues reveal indistinguishable structure and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 1644.
- YAMAMOTO K. (1985), Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Ann. Rev. Genet.*, 19, 209.

SPECIFICITE TISSULAIRE DE L'EXPRESSION DE FACTEURS PROTEIQUES AFFINES DES REGIONS PROMOTRICES DES GENES DES PROTEINES DE LA SOIE CHEZ *BOMBYX MORI*

J. DREVET & P. COUBLE

Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire, CNRS, UMR 106, Bat^{nt} 741, Université Claude Bernard, Lyon I, 43, boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

*L'analyse des interactions ADN-protéines, dans les régions 5'-flanquantes aux gènes de P25 et de la fibroïne, a révélée la présence de facteurs protéiques communs (Drevet, 1989 ; Drevet et Coll., soumis). Dans le but de savoir si ces facteurs peuvent rendre compte de l'étroite coordination et de la restriction de l'expression des gènes de P25 et de la fibroïne dans le territoire du sécréteur de la glande séricigène de *Bombyx mori*, des tests de retardement de migration avec des fractions protéiques issues de cellules médianes de la glande (territoire du réservoir) ont été réalisés, ainsi qu'avec une sonde provenant d'un gène exprimé spécifiquement dans le réservoir (gène de sérécine 1). Des complexes ADN-protéines identiques (sur la base de leur migration électrophorétique et sur la base de tests de compétition) ont ainsi pu être mis en évidence. Ces résultats suggèrent que les interactions ADN-protéines communes aux gènes de P25 et de la fibroïne ne gouvernent pas directement l'expression territorialisée de ces deux gènes et conforte l'idée que ces facteurs protéiques jouent un rôle dans l'intensité de l'expression de ces gènes.*

INTRODUCTION

La glande séricigène du ver à soie *Bombyx mori* est un organe spécialisé dans la production d'un nombre limité de protéines qui constituent le fil de soie. Chaque glande comprend deux parties sécrétrices distinctes morphologiquement et fonctionnellement :

- une région postérieure, ou sécréteur, où sont synthétisées les protéines majeures de la soie, la grande et la petite fibroïne (la protéine P25) ;
- et une région médiane, ou réservoir, où sont élaborées les sérécines.

Dans les cellules du sécréteur, les gènes de P25 et de la fibroïne sont transcrits de façon intense et coordonnée. Cette coordination se manifeste à la fois dans l'intensité de l'accumulation des transcrits (Couble et coll., 1983) ; dans le temps, puisque l'activité de ces gènes est rythmée par le cycle du développement larvaire de l'insecte (les gènes sont exprimés pendant les intermues, silencieux pendant les mues) ; et dans l'espace, puisque l'activité de ces deux gènes est restreinte (Couble et coll., 1987) aux seules cellules du sécréteur.

Un des aspects intéressants de ce système biologique réside dans le fait que les cellules du réservoir, dans lesquelles s'expriment aux moins deux gènes de sérécine, fonctionnent de façon synchrone avec les cellules du sécréteur et subissent au cours du développement les mêmes événements. Ce couplage ne résulte pas d'un contrôle direct de la production des sérécines par l'accumulation de la fibroïne dans le réservoir, puisque l'on a caractérisé des mutants Nd (Suzuki, 1977) et Nd-S (Takei et coll., 1984) qui ne produisent pas de fibroïne mais une quantité normale de sérécines. L'existence de mutants Flc (cocon fragile), qui ne fabriquent que très peu de soie (Suzuki, 1977), rend au contraire probable que la régulation s'exerce directement sur chacun des gènes.

Ces caractéristiques permettent de penser qu'il existe un niveau de coordination de l'expression des gènes dans l'ensemble de l'organe. En effet, en plus de l'étroite concertation qui conduit dans un même tissu (le sécréteur) à la production intense de deux protéines (la protéine P25 et la fibroïne), on peut se poser la question de savoir quels sont les mécanismes régissant le synchronisme de la sécrétion des protéines de la soie entre les parties médianes et postérieures de la glande séricigène.

On a pu montrer précédemment que des facteurs protéiques identiques, présents dans des extraits de cellules postérieures de la glande séricigène, se lient à des motifs de séquence conservés en amont des gènes de P25 et de la fibroïne (Drevet, 1989 ; Drevet et coll., soumis). La présence de ces facteurs dans un domaine de séquence, jouant le rôle d'un "enhancer" pour le gène de la fibroïne, nous a permis de supposer qu'ils déterminent l'intensité de l'expression de ces deux gènes dans le territoire du sécréteur. Nous avons alors cherché à savoir si ces interactions ADN-protéines, seuls complexes intenses mis en évidence dans une région de forte homologie entre les deux gènes, pouvaient aussi rendre compte de la spécificité tissulaire de l'expression des gènes de P25 et de la fibroïne dans le sécréteur.

MATERIELS ET METHODES

Les techniques utilisées pour la préparation des extraits protéiques et l'analyse des interactions ADN-protéine ont été décrites précédemment (Drevet, 1989 ; Drevet et coll., soumis).

Matériel biologique :

Les travaux ont été menés avec des hybrides de première génération des souches européennes 200×300 du ver à soie *Bombyx mori*, maintenues à l'Unité Nationale Séréricole (La Mulatière, Lyon). Les élevages ont été réalisés sur feuilles de mûrier en ambiance contrôlée (22°C, 70 % d'humidité, photopériode de 12 heures). La glande séricigène (sécréteur ou réservoir) est prélevée à 48 heures sur des larves au 5ème stade.

ADN recombinants :

Les fragments P25 P1, P1A et P1B, séricine S1 et fibroïne F1 (voir figure 1) sont issus respectivement des sous-clones pUC18/P25₁₄₅ (Taq I [-162] / Dpn I [-18]), pUC18/Ser1₂₂₆ (Hind III [-280] / Taq I [-54]) et pUC18/Fib1₆₇ (Dra I [-232] / Taq I [-65]). Les sous clones P25, fibroïne et séricine 1 sont issus respectivement des clones génomiques pBmP25,21, pFB29 et Bm SJ 5, isolés à partir de la banque Eco RI (souche japonaise 703) construite par T. Eickbush et F. Kafatos, (1982, Harvard, Cambridge).

Analyse des protéines :

Electrophorèse monodimensionnelle (Laemmli, 1970)

Les protéines sont précipitées à l'acétone ; les culots protéiques sont repris dans un tampon (tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 ; SDS 2,3 % ; DTT 2 % ; glycérol 10 %) et les extraits sont incubés 5' à 100°C. La séparation est réalisée dans un système discontinu avec 4 % d'acrylamide dans le gel d'entassement et 7,5 ou 12 % dans le gel séparateur (dimensions : 200×200×0,75 mm). La migration s'effectue dans une cuve "Biorad : Protean II", réfrigérée à 10°C, dans un tampon (0,025 M Tris-HCl pH 8,3, 0,192 M glycine ; 0,1 % SDS), dans les conditions électriques suivantes (pour deux gels) :

- gel d'entassement : 40 mA (intensité constante), 1 heure.
- gel séparateur : 80 mA (intensité constante), 2,5 heures.

Des dépôts de 3 à 5 µg de protéines par échantillon sont effectués et la pyronine est utilisée comme traceur coloré. Les marqueurs de poids moléculaire (Kit Pharmacia) sont la catalase (232 kDa), la lactate déshydrogénase (140 kDa), la phosphorylase B (94 kDa), la sérum-albumine bovine (67 kDa), l'ovalbumine (43 kDa), l'anhydrase carbonique (30 kDa), l'inhibiteur de la trypsine du soja (20,1 kDa) et la lactalbumine (14,4 kDa). Les protéines séparées sont révélées au nitrate d'argent selon la technique de Morrissey (1981). Le fond est atténué après coloration par l'incubation du gel pendant 20 secondes dans du réducteur de Farmer (Heukeshoven et Dernick, 1985).

Traitement informatique des séquences :

L'analyse informatique des séquences a été réalisée sur l'ordinateur VAX 730 de l'Institut d'Evolution Moléculaire de Lyon, avec l'aide de ses membres et avec les programmes que ceux-ci ont mis au point. La recherche de structures secondaires a été effectuée avec le programme de Papanicolaou et coll., (1984).

RESULTATS

La figure 1 résume les résultats des incubations des sondes P25 P₁, P_{1A} et P_{1B} et fibroïne F₁ dans les extraits protéiques de sécréteurs (Drevet, 1989 ; Drevet et coll., soumis). Il ressort de ces investigations qu'au moins un complexe ADN-protéine(s) identique se forme dans les régions 5'-flanquantes au site d'initiation des gènes de P25 et de la fibroïne avec des facteurs protéiques contenus dans les cellules postérieures de la glande séricigène.

Dans le but de tester si les facteurs protéiques affines des séquences amont des gènes de P25 et de la fibroïne -spécifiques du sécréteur- régissent aussi la spécificité tissulaire d'expression de ces gènes dans ce territoire, nous avons préparé en parallèle des extraits protéiques à partir des cellules médianes et postérieures de la glande séricigène. Après fractionnement, dans les conditions standards sur colonne d'héparine-sépharose, une partie aliquote de chaque fraction a été déposée sur gel d'acrylamide (7,5 et 12 %), dans le but de comparer les profils de bandes obtenus avec les deux types d'extraits (figure 2). On peut remarquer qu'il y a une grande homogénéité entre les fractions protéiques issues des cellules des deux territoires de la glande séricigène. Il n'y a donc pas de variations importantes dans le nombre, l'abondance et la répartition des espèces protéiques contenues dans les cellules de ces deux territoires de l'organe.

Dans une première série d'expériences, les sondes P_{1A} et P_{1B} (voir figure 1) ont été incubées avec des quantités constantes (15 et 30 µg) de protéines des fractions 0,1 M KCl des deux types d'extraits (figure 3). Il ressort de ces expériences que des complexes identiques, sur la base de leur migration électrophorétique, sont obtenus avec les deux sondes dans les deux extraits protéiques fractionnés. Comme pour les extraits protéiques de cellules de sécréteurs, seule la fraction chromatographique 0,1 M KCl d'extrait de cellules médianes de la glande séricigène donne des complexes de fortes intensités. L'intensité de la bande retardée est similaire dans les fractions issues des deux extraits, ce qui suggère que les facteurs protéiques liés sont dans une abondance identique dans les cellules de réservoirs et de sécréteurs (le nombre de cellules par glande et par territoire étant sensiblement voisin, Fayard, 1976). Ainsi, les facteurs protéiques liés *in vitro* au domaine -162 à -18 du gène de P25, exprimés uniquement dans les cellules du sécréteur, semblent également présents dans les cellules du réservoir.

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons cherché tout d'abord à savoir si les séquences 5'-flanquantes d'un gène exprimé sélectivement dans le réservoir (en l'occurrence, le gène de séricine 1) pouvaient donner des complexes ADN-protéines avec des extraits protéiques de cellules postérieures de la glande séricigène et, en deuxième lieu, si les complexes formés pouvaient être spécifiques de ce gène ou non. Pour ce faire, nous avons incubé avec la fraction 0,1 KCl d'un extrait protéique de sécréteur, une sonde séricine S1 s'étendant entre les positions -280 et -54 (voir figure 4). Un complexe retardé a été obtenu dans de telles conditions, la spécificité de ce complexe a été avérée par compétition homologue avec un excès du fragment S1 froid (5 à 10 fois en molarité).

Des tests de compétition croisée pour la formation de ce complexe par des fragments froids correspondants aux sondes P25 P₁ et fibroïne F₁ ont été réalisés (voir figure 4). Ils ont mis en évidence que des quantités faibles de l'un ou l'autre des fragments compétiteurs inhibent la formation du complexe entre une ou des protéines contenues dans la fraction 0,1 M KCl d'un extrait de cellules de sécréteurs et la sonde Ser 1. Le(ou les) facteur(s) se liant au domaine de séquence -280 à -54 du gène séricine 1 est donc commune aux trois gènes.

DISCUSSION

Les facteurs protéiques donnant les complexes A et B avec l'ADN en amont du gène de P25 ne semblent pas spécifiques des cellules sécrétrices de la partie postérieure de la glande séricigène,

puisque l'on peut observer des complexes identiques dans des extraits de cellules de réservoirs et puisque les séquences en amont du gène Ser 1 donnent des complexes qui entrent en compétition avec les promoteurs des gènes de P25 et de la fibroïne dans des extraits protéiques de cellules de sécréteurs. Des observations similaires ont été faites par le groupe de Y. Suzuki. De la même façon, des extraits protéiques élaborés à partir de cellules de réservoir, de sécréteur ou de tissus ovariens ont donné avec l'enhancer du gène de la fibroïne des complexes ayant des migrations électrophorétiques identiques (Suzuki et Suzuki, 1988). Par ailleurs, Tsuda et Suzuki (1983), ont montré que dans un système de transcription *in vitro* préparé à partir de cellules de la partie postérieure de la glande séricigène, aussi bien le gène de la fibroïne que le gène de séricine 1 peuvent être transcrits ; les deux gènes sont également transcrits dans un système préparé à partir de cellules du réservoir. Il y a donc dans les cellules de réservoirs et de sécréteurs tous les facteurs nécessaires à la transcription des deux gènes. Cela permet en première analyse de supposer qu'il n'y a pas de facteurs répresseurs de l'activité de ces gènes dans des cellules où ils ne s'expriment pas normalement. On ne peut cependant pas écarter l'hypothèse qu'un même facteur puisse se comporter comme un activateur dans les cellules du sécréteur et comme un répresseur dans les cellules du réservoir.

Les études de Tsujimoto et Suzuki (1984) et Suzuki et Adachi (1984), sur le gène de la fibroïne provenant de tissus producteurs (sécréteurs) et non producteurs (réservoirs) ne montrent pas de différences de séquence en amont du nucléotide + 1, ni de différence de méthylation des deux ADN, et témoignent que tous deux sont transcrits avec la même efficacité dans un système de transcription homologue. La non-expression du gène de la fibroïne dans les cellules du réservoir n'est donc pas due à des modifications structurales du gène lui-même. D'autre part, Tsuda et Suzuki (1983) ont rapporté que la région en amont du gène de séricine 1 stimule la transcription de son propre promoteur mais aussi de promoteurs hétérologues dans des extraits de glandes séricigènes. Enfin, récemment, Hui et Suzuki (1988 : résultats soumis) ont observé que cette stimulation pouvait être partiellement inhibée par l'addition d'un fragment compétiteur recouvrant l'enhancer du gène de la fibroïne. Ces observations suggèrent que un(ou des) facteur(s) commun(s) peuvent être impliqués dans le contrôle de ces deux gènes.

On peut alors imaginer deux possibilités pour expliquer la spécificité tissulaire stricte d'expression des gènes dans la glande séricigène :

- Première possibilité : il existe deux classes de facteurs dans les cellules de la glande séricigène. Des facteurs spécifiques de chaque territoire de l'organe, et des facteurs communs aux deux régions, voire à d'autres tissus. Ainsi, les protéines donnant les complexes A et B en amont du gène de P25 pourraient être trouvées communes à plusieurs types cellulaires. La spécificité tissulaire d'expression des gènes dans le territoire du sécréteur serait alors assurée par d'autres protéines, probablement à un deuxième niveau, par le biais d'interactions protéines-protéines. Comme il a été suggéré par un certain nombre d'auteurs (Yamamoto, 1985 ; Echols, 1986 ; McKnight et Tjian, 1986), la spécificité d'expression pourrait être générée par la présence, dans un tissu particulier, d'une combinaison unique de facteurs de transcription, même si chaque facteur est présent par ailleurs dans plusieurs tissus.

- Deuxième possibilité : les protéines affines des régions 5'-flanquantes des gènes de P25 et de la fibroïne, bien qu'apparemment ubiquitaires dans les cellules de *Bombyx mori*, sont spécifiquement modifiées dans les cellules postérieures de la glande séricigène afin de jouer un rôle dans la spécificité tissulaire d'expression des gènes de P25 et de la fibroïne. En effet, il a été rapporté dans plusieurs systèmes que les facteurs spécifiques qui régulent la transcription dans une cellule ou un tissu particulier peuvent être activés par des modifications post-traductionnelles (phosphorylations, glycosylations, ...) de précurseurs présents dans beaucoup de types cellulaires différents (Sen et Baltimore, 1986 ; Lee et coll., 1987 ; Angel et coll., 1987 ; Jackson et Tjian, 1988, Krause et coll., 1988).

A ce stade de l'analyse, il est difficile de choisir entre l'une ou l'autre des alternatives. Il est même possible que les deux processus soient mis en oeuvre dans les cellules du sécréteur de *Bombyx mori*. En effet, on a vu (Drevet, 1989 ; Drevet et coll., soumis) que certains complexes retardés étaient bien dûs à des associations protéines-protéines sur les facteurs affines de l'ADN en amont des gènes de la fibroïne et de P25. D'autre part, des résultats récents confirment que des interactions protéines-protéines sont nécessaires pour que des facteurs présents dans des extraits de cellules sécrétrices acquièrent la capacité de se lier à l'enhancer du gène de la fibroïne (Matsuno et coll., 1989).

Enfin, dernièrement, il nous est apparu, au cours de la purification du facteur impliqué dans la formation du complexe B, que ce dernier se présentait dans les cellules du sécréteur sous une forme glycosylée (B. Durand : communication personnelle). Des investigations supplémentaires sont en cours pour tester si les facteurs que nous avons mis en évidence régissent la spécificité tissulaire d'expression des gènes de la soie dans la glande séricigène ou si cette dernière est gouvernée par d'autres facteurs ou(et) d'autres séquences. En effet, les interactions ADN-protéines mises en évidence sur le gène de P25 en amont de la région homologue (Drevet, 1989 ; Drevet et coll., soumis) jouent peut-être un rôle essentiel dans ces phénomènes de territorialisation de l'expression.

D'un autre côté, si les expériences relatées dans cet article tendent à démontrer que les facteurs protéiques -donnant les complexes majeurs sur les régions 5'-flanquantes des gènes de la soie P25, fibroïne et séricine 1- ne gouvernent pas directement la spécificité territoriale d'expression de ces gènes dans la glande séricigène, elles confortent l'idée que nous avons déjà avancé sur le rôle présumé de ces facteurs dans l'intensité de la transcription de ces trois gènes. En effet, au cours du 5ème stade larvaire, Michaille (1987) a montré que l'accumulation des ARN messagers du gène Ser 1 dans le réservoir est de type exponentiel et comparable à celle des messagers des gènes de la fibroïne (Mackawa et Suzuki, 1980) et de P25 (Couble et coll., 1981) dans le sécréteur. Or, il existe en amont du gène Ser 1 un certain nombre d'homologies de séquences avec les domaines déjà trouvés homologues entre les séquences 5'-flanquantes des gènes de P25 et de la fibroïne (voir figure 5a) (Couble et coll., 1985 ; Chevillard, 1986). L'absence d'homologies équivalentes en amont d'un second gène codant pour une séricine Ser 2 (Michaille, 1987), exprimé avec une intensité faible dans le réservoir, de même que l'absence de motifs inversés répétés pouvant potentiellement former des structures secondaires stables en épingle à cheveux -comme il a été montré en amont des trois autres gènes (figure 5b) (Couble et coll., 1985 ; Chevillard, 1986)- suggèrent que ces séquences, via les facteurs protéiques qui les reconnaissent, pourraient contrôler le niveau d'expression de ces trois gènes.

ALTERNATIVE CHEMICALS FOR THE ACID TREATMENT OF BIVOLTINE SILKWORM (*BOMBYX MORI* L.) EGGS¹

M.T. SWAMY*, K.C. DEVARAJ URS & R.V. KRISHNAMOORTHY**

* Sri Venkateswara Agricultural College, Tirupati, 517 502, India.

** University of Agricultural Sciences, Bangalore, India.

One hundred and twenty-three chemicals were surveyed as alternative to HCl-acid treatment. The chemicals were grouped into five, the results were subjected to cluster analysis and read at 10³ Standard Euclidean distance. Thirty-three chemicals in the first group caused 100 % mortality, and in the second group 23 chemicals gave different percentages of mortality and diapause condition. The third and fourth group chemicals (a total of 44) caused 2.89 to 13.2 % hatching. Twenty-three chemicals of the last group displayed a high percentage of hatching (41.18 to 67.65 %). 2 % sodium dodecyl sulphate gave more than 90 % hatchability on a par with HCl.

Keywords : *Bombyx* silkworm, diapause termination, acid, treatment, alternative chemicals.

INTRODUCTION

Artificial hatching of the diapausing silkworm eggs was studied in France, during the 19th century but the technique was put into practice only in the early 20th century in Japan (Yokayama, 1973). HCl-treatment is the usual technique *in vogue* and adopted by many commercial rearers to prevent diapause and allow bivoltine eggs to develop further. The exact mechanism by which the HCl brings forth the breaking of the diapause is not clearly known. It is now known that the diapause hormone, which is a protein secreted by the sub-oesophageal ganglion, is responsible for the diapause condition in the embryo (Hasegawa, 1957; Isobe *et al.*, 1973). It is therefore plausible that HCl-treatment destroys the activity of the hormone *in vivo*; as a result the inhibitory role of the hormone in the egg development is manifested. Alternative treatment beside the HCl-treatment is not familiar.

The reason for the lacuna in the knowledge for alternatives to acid treatment must be sought in the non-availability of information. It is in this direction the present investigation is oriented to undertake the use of certain organic and inorganic chemicals as alternatives to acid treatment of bivoltine silkworm eggs.

MATERIALS AND METHODS

Disease-free layings of pure bivoltine NB4D2 eggs were obtained from "Silkworm Seed Production Centre, National Silkworm Seed Project", Central Silk Board, Bangalore. The eggs were collected at the centre at 7.30 a.m. and completed the treatment with different chemicals before 12 noon. The HCl-acid treatment was followed according to The Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India (Jolly, 1986). Hydrochloric acid of specific gravity 1.072 (at 25°C)

1. Part of a PhD thesis submitted to the University of Agricultural Sciences, Bangalore, India.

was heated to a temperature of 46.1°C and the silkworm eggs were immersed in the acid for 5 minutes. The acid temperature was maintained in a hot waterbath.

One hundred and twenty-three chemicals of both organic and inorganic chemicals were screened for antidiapausing effect. Initial screening was done with IM chemicals, if they are solids and 1 % solution in water if they are liquids at room temperature. The temperature and time factors used were the same as with HCl-acid treatment. The number of eggs hatched, dead, diapaused and yellowed in each laying was recorded. Based on these characters all the chemicals were classified into different groups after the data subjected to cluster analysis. Their similarities and dissimilarities were assessed in the following way :

$$d_{ij} = \sqrt{\sum_{k=1}^P (x_{ki} - x_{kj})^2}$$

Where d_{ij} = Euclidean distance between individuals i and j .

x = variable

P = number of characters used

The standard Euclidean distance is one of the most common measure of dissimilarity. The categories formed on this distance arranged in the form of a dendrogram.

RESULTS

The chemicals were classified broadly into five groups on the basis of the percentage of hatchability as in Table I.

Table I.

Tableau I.

Group / Groupe	Per cent / Pourcentage	
	hatchability / d'éclosion	mortality / de mortalité
1	0	100
2	0	< 100
3	1 to 8 1 à 8	< 70
4	9 to 22 9 à 22	< 60
5	22 to 99 22 à 99	< 45

Table II. Group I chemicals without antidiapausing effects.

Tableau II. Produits chimiques du premier groupe sans effet anti-diapausant.

Sl. No. / N° de série	Chemical name / Dénomination chimique
1	Acetic acid 100 % / Acide acétique 100 %
2	Acetic anhydride 100 % / Anhydride acétique 100 %
3	Ammonia 100 % / Ammoniaque 100 %
4	Arsenic acid 1 M / Acide arsénieux 1 M
5	Benzene 100 % / Benzène 100 %
6	Boric acid 1 M / Acide borique 1 M
7	Calcium hydroxide 1 M / Hydroxyde de calcium 1 M
8	Butanol 100 % / Butanol 100 %
9	Carbolic soap 1 g/100 ml / Savon phénique 1 g/100 ml
10	Copper chloride 1 M / Chlorure de cuivre 1 M
11	Cupric chloride 1 M / Chlorure cuprique 1 M
12	2,4-dinitrophenol 1 M / 2,4-dinitrophénol 1 M
13	Dichloromethane 1 M / Dichlorométhane 1 M
14	Hydrogen peroxide 100 % / Peroxyde d'hydrogène 100 %
15	Hexane 100 % / Hexane 100 %
16	Isobutyl alcohol / Alcool isobutylique
17	Manganese carbonate 1 M / Carbonate de manganèse 1 M
18	2 methoxyethanol 100 % / 2 méthoxyéthanol 100 %
19	Dimethylamine 100 % / Diméthylamine 100 %
20	Nitric acid 4.7 N / Acide nitrique 4.7 N
21	Orthophosphoric acid 100 % / Acide orthophosphorique 100 %
22	Potassium chromate 1 M / Chromate de potassium 1 M
23	Potassium oxalate 1 M / Oxalate de potassium 1 M
24	Potassium permanganate 1 M / Permanganate de potassium 1 M
25	Polytheneglycol 100 % / Polyéthylèneglycol 100 %
26	Propionic acid 100 % / Acide propionique 100 %
27	Detergent soap 1 g/100 ml / Savon détergent 1 g/100 ml
28	Sorbic acid 1 M / Acide sorbique 1 M
29	Tartaric acid 100 % / Acide tartarique 100 %
30	Toluene 100 % / Toluène 100 %
31	Triton x-100 50 % / Triton x-100 50 %
32	Calcium nitrate 1 M / Nitrate de calcium 1 M
33	Ammonia 75 % / Ammoniaque 75 %

The first group consisting of 33 chemicals (Table II) did not show any antidiapausing action. As a result the hatching of eggs could not be detected and the treatments obviously killed the eggs. These chemicals cannot be therefore considered as alternatives.

The second group consisting of 23 chemicals (Fig. 1) did not show hatching but exhibited a varied percentage of other characters like mortality and diapause. The cluster analysis showed that at $\log 10^3$ Euclidean distance three categories would fall out. One category consisting of 5 chemicals, viz. calcium sulphate, potassium nitrate, potassium chloride, sulphuric acid (4.7 N) and potassium chromate, gave an average 57.6 % mortality and 23.34 % diapaused eggs. The second cluster comprised molybdic acid, potassium carbonate, strontium chloride and sodium tungstate, with 44.18 % average mortality and 39.07 % diapaused eggs. The third cluster included 11 chemicals, viz. citric acid, sodium acetate, cupric acetate, sodium oxalate, sodium dihydrogen orthophosphate, disodium hydrogen orthophosphate, sodium citrate, 'Surf' (5 g/100 ml), zinc oxide and disodium-tetra-borate, with an average 10.29 % mortality and 80.13 % diapaused eggs. An independent category of chemicals which are not linked to these categories were oxalic acid, potassium hydrogen tartarate and barium hydroxide.

The third group contained 22 chemicals (Fig. 2). Among these, 16 chemicals formed one cluster with an average yield of 2.89 % hatchability, 4.56 % mortality, 89.41 % diapaused eggs and 3 % yellowing. These were as follows : sulphanilic acid, orthophosphoric acid (25 %), sodium thiosulphate, magnesium sulphate, aluminium potassium sulphate, disodium oxalate, aluminium oxide, ammonium phosphate, ammonium nitrate, sodium carbonate, trisodium citrate, sodium fluoride, ammonium ferrous sulphate, ammonia (50 %) and potassium iodide. The rest of the chemicals, aluminium ammonium sulphate, aluminium chloride, barium chloride, benzamide, ammonium dihydrogen orthophosphate and ammonium oxalate displayed independent actions.

The fourth group consisted of 22 chemicals (Fig. 3). These were clustered into 3 categories with an independent chemical. The first category had 5 chemicals, viz. ethylene diamine tetra-acetic acid, triton X-100 (1 %), sodium cobalt nitrate, salicylic acid and potassium sulphate gave 13.7 % average hatching, 32.18 % mortality, 7.5 % yellowing and 24.42 % diapaused eggs. The second category consisted of 3 chemicals, viz. succinic acid, zinc sulphate and calcium acetate with 13.12 % average hatching, 51.76 % mortality, 7.5 % yellowing and 5.8 % diapaused eggs. The third category was the largest one with a high percentage of diapaused eggs (67.58 %), the same hatchability as in the second category (14.3 %) and a low mortality (8.67 %). The chemicals thus clustered were as follows : potassium hydrogen orthophosphate, adipic acid, thiourea, potassium meta bisulphate, hydrogen peroxide (50 %), copper sulphate, manganese chloride, calcium acetate, picric acid, potassium dihydrogen orthophosphoric acid (10 %). The only member of this group that did not have any link was cuprous chloride.

The last and fifth group (Fig. 4) comprised 23 chemicals which clustered in a similar manner. Fifteen chemicals displayed approximately equal hatchability (41.18 %) and diapaused state (48.64 %) with a negligible mortality. The chemicals were as follows : perchloric acid, ferric chloride, magnesium acetate, strontium chloride, aluminium chloride, magnesium nitrate, ammonia sodium nitrate, barium nitrate, sodium chloride, magnesium chloride, bleaching powder, tricalcium phosphate, perchloric acid 2 % and sodium hydrogen carbonate. Four chemicals, viz. calcium phosphate dibasic, sodium nitrite, hydroquinone and orthophosphoric acid formed one category with 67.35 % and 6.37 % hatchability and diapaused eggs respectively. Sodium dodecylsulphate and 1.075 sp. gr. hydrochloric acid formed with a category 90 % mean hatchability and 8 % diapaused eggs. Ammonium phosphate, ammonium sulphate and lead acetate showed significant independency of other chemicals on the hatchability of eggs.

DISCUSSION

There were few studies earlier on the alternative of HCl-acid treatment to terminate the diapause of silkworm eggs. Injection of uranyl nitrate (Hasegawa, 1947), KCl (Yoshitake, 1954), 2,4-dinitrophenyl together with ATP (Takai and Nagashima, 1970) into females which are destined to produce diapause eggs, turned them to lay non-diapause eggs. Injection of 5-' AMP into

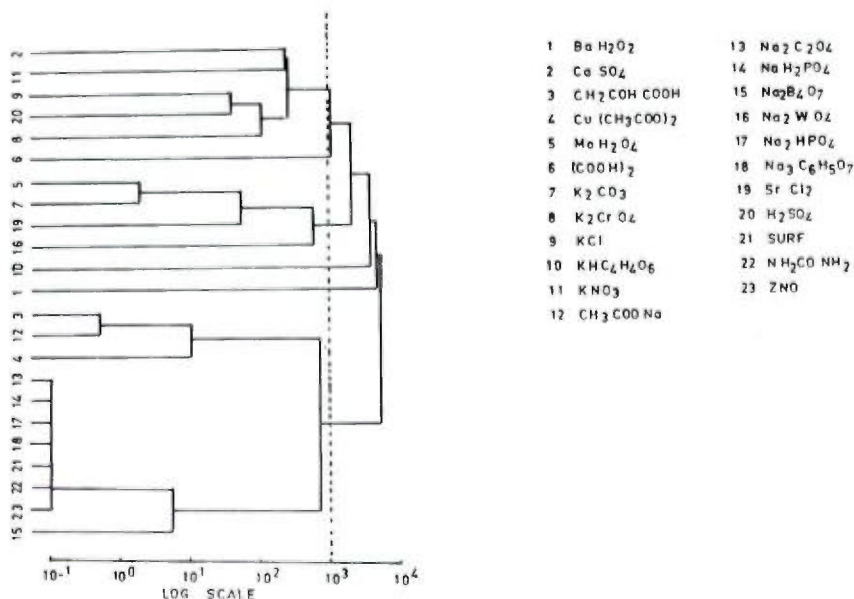


Fig. 1 : Dendrogram : linkages of second group chemicals.

Fig. 1 : Dendrogramme : liaisons entre les substances chimiques du deuxième groupe.

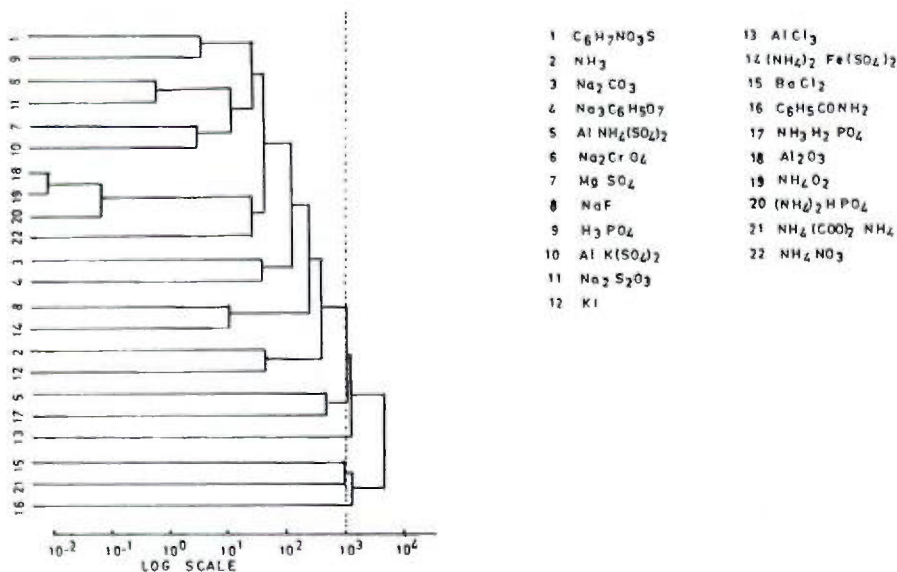


Fig. 2 : Dendrogram : linkages of third group chemicals.

Fig. 2 : Dendrogramme : liaisons entre les substances chimiques du troisième groupe.

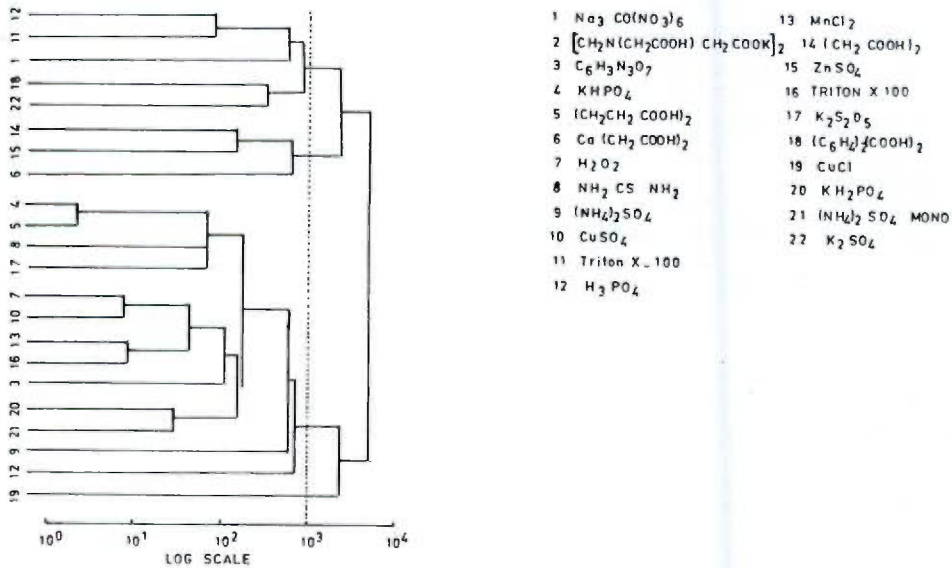


Fig. 3 : Dendrogram : linkages of fourth group chemicals.

Fig. 3 : Dendrogramme : liaisons entre les substances chimiques du quatrième groupe.

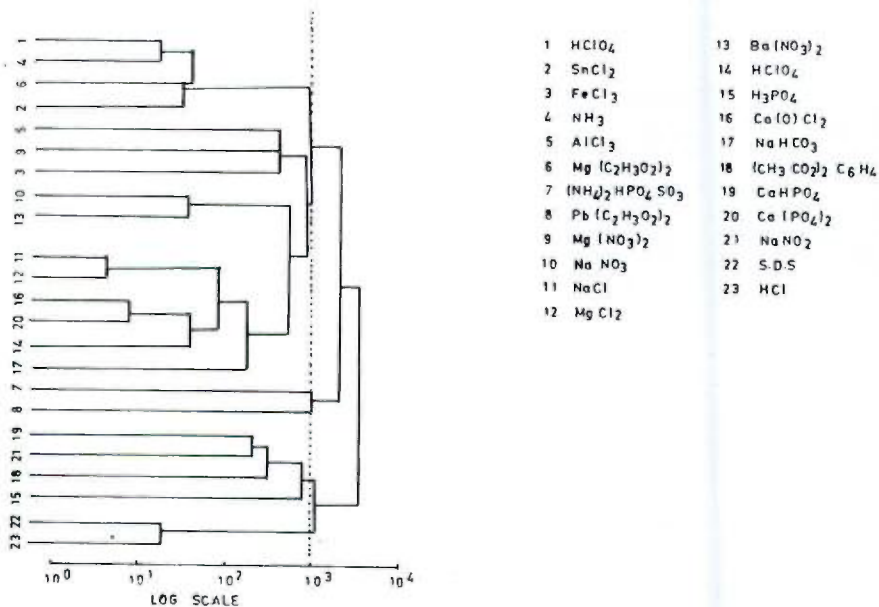


Fig. 4 : Dendrogram : linkages of fifth group chemicals.

Fig. 4 : Dendrogramme : liaisons entre les substances chimiques du cinquième groupe.

non-diapause laying females resulted in the oviposition of diapause eggs (Suzuki *et al.*, 1978). However, the chemical treatments in the present investigation were not reported earlier.

Two noteworthy observations could be drawn out of the results : firstly, they demonstrate that there are at least 5 to 6 potential alternative chemicals to replace the HCl for breaking the diapause of silkworm eggs. The most effective among them is the sodium dodecyl sulphate, the treatment of which gives an equal percentage of hatching as that of HCl. Costwise, at present rates not only the sodium dodecyl sulphate but the other chemicals also work out to be cheaper than the HCl and are also less toxic to the eggs.

Secondly, the results demonstrate that the existing theory of the action of HCl in breaking the diapause is no longer held valid on the basis of the functional role of chloride ion. It is widely believed that the Cl^- during HCl-treatment would diffuse into the egg contents and inactivates the action of the diapause hormone (Park and Yoshitake, 1970). The results indicated that the chemical treatments without the liberation of Cl^- can also break the diapause and lead the egg development to hatching. The Cl theory may be a corollary to one of the mechanisms of breaking diapause but it could always be substituted with any chemical reported in the present study.

It is supposed that any alternative should have the same function as that of HCl especially of the diapause hormone. Miura (1929) suggested that activation and hatching of acid-treated eggs are due to the charge of chloride ion. This explanation was further emphasized by Park and Yoshitake (1970) who suggested that the eggs have the ability to absorb negative ions like chloride ions. The results of the chemicals screened would reveal that the chloride ion in breaking the diapause may not be conceived at all but is probably nature of the chemical that inactivates the action of the diapause hormone.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the Director, Central Silk Board, Bangalore, for providing silkworm eggs.

REFERENCES

- HASEGAWA K. (1947), Studies on the voltinism in the silkworm, *Bombyx mori*. Bull. Seric. Expt. Stn. Jpn., 12, 513-530.
- HASEGAWA K. (1957), The diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. Nature, 179, 1300-1301.
- ISOBE M., HASEGAWA K., GOTE T. (1973), Isolation of the diapause hormone from *Bombyx mori*. J. Insect Physiol., 19, 1221-1239.
- JOLLY M.S. (1986), Organisation of industrial bivoltine grainage for tropics. Central Seric. Res. & Trai. Inst., Mysore, 40.
- MIURA E. (1929), Studies on the artificial hatching of silkworm eggs by hydrochloric acid. Bull. Imp. Kyoto Seric. Coll., 1, 1-44.
- PARK K.F., YOSHITAKE N. (1970), Function of the embryo and the silkworm egg, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol., 16, 2223-2230.
- SUZUKI K. TSUDA S., MIYA K. (1978), Occurrence of non-diapause eggs by injection of adenosine-5'-monophosphate into *Bombyx mori* pupa. Appl. Ent. Zool., 13, 48-50.
- TAKAI R., NAGASHIMA E. (1970), Effect of 2,4-dinitrophenol on the silkworm eggs. J. Seric. Sci. Jpn., 39, 329-333.
- YOKAYAMA T. (1973), The history of sericultural sciences in relation to industry. In History of entomology. Ed. Smith R.F., Mittler T.E. and Smith C.N., Ann. Rev. Ent., 267-284.
- YOSHITAKE N. (1954), Bio-chemical studies on the voltinism due to the injection of a few inorganic salts and other chemical substances. J. Seric. Sci. Jpn., 23, 349-356.

PRODUITS CHIMIQUES DE SUBSTITUTION AU TRAITEMENT A L'ACIDE DES OEUF DE VER A SOIE BIVOLTIN (*BOMBYX MORI* L.)¹

M. T. SWAMY*, K.C. DEVARAJ URS & R.V. KRISHNAMOORTHY**

* Sri Venkateswara Agricultural College, Tirupati, 517 502, Inde.

** University of Agricultural Sciences, Bangalore, Inde.

Cent vingt-trois substances chimiques ont été étudiées afin de déterminer si elles pouvaient être utilisées comme produits de substitution au traitement à l'acide chlorhydrique. Ces produits chimiques sont répartis en cinq groupes ; les résultats sont soumis à l'analyse en blocs et exprimés à la distance euclidienne standard 10^3 . Trente-trois produits chimiques dans le premier groupe donnent une mortalité de 100 % et, dans le second groupe, 23 produits chimiques provoquent des pourcentages de mortalité et des conditions de diapause divers. Les produits chimiques des troisième et quatrième groupes (44 au total) donnent un pourcentage d'éclosion de 2,89 à 13,2. Vingt-trois des substances chimiques du dernier groupe donnent un pourcentage d'éclosion élevé (41,18 à 67,65 %). Le dodecyl sulfate de sodium à 2 % donne un taux d'éclosion de plus de 90 %, à égalité avec l'HCl.

INTRODUCTION

L'éclosion artificielle des oeufs du ver à soie diapausant a été étudiée en France au XIXe siècle mais cette technique n'a été mise en pratique qu'au début du XXe siècle au Japon (Yokayama, 1973). Le traitement HCl est une technique couramment utilisée dans de nombreux élevages commerciaux pour éviter la diapause et permettre aux oeufs bivoltins de se développer. Le mécanisme par lequel l'HCl provoque l'interruption de la diapause est mal connu. On sait maintenant que l'hormone de diapause, protéine sécrétée par le ganglion sub-oesophagien, est responsable de la diapause chez l'embryon (Hasegawa, 1957 ; Isobe et coll., 1973). Il semble donc plausible de supposer que le traitement HCl détruit l'activité de l'hormone *in vivo*, le rôle inhibiteur de l'hormone dans le développement de l'oeuf étant en conséquence manifeste. Les traitements de substitution à l'HCl sont peu étudiés.

La raison de cette lacune réside dans le manque de documentation. La présente étude a donc pour but de déterminer les substances chimiques organiques et inorganiques qui peuvent être utilisées comme alternatives au traitement à l'acide des oeufs du ver à soie bivoltin.

MATERIELS ET METHODES

Des pontes saines du bivoltin pur NB₄D₂ ont été fournies par le "Silkworm Seed Production Centre, National Silkworm Seed Project" (Central Silk Board, Bangalore). Les oeufs ont été recueillis au centre à 7 h 30 ; le traitement, comprenant diverses substances chimiques, s'est terminé avant 12 h 00. Le traitement à l'HCl est celui du Central Sericultural Research and Training Institute

1. Extrait de thèse de doctorat soumise à l'University of Agricultural Sciences, Bangalore, Inde.

-Mysore, Inde- (Jolly, 1986). L'acide chlorhydrique d'une densité de 1,072 (à 25°C) est chauffé à température de 46,1°C, les oeufs sont ensuite immergés dans l'acide pendant 5 minutes. Une baignoire d'eau chaude permet de maintenir la température de l'acide.

Cent vingt-trois substances chimiques organiques et inorganiques sont sélectionnées pour leur effet anti-diapausant. Le tri initial est effectué avec les produits chimiques IM pour les substances solides et dans une solution aqueuse à 1 % à température ambiante pour les substances liquides. Les critères de mesure de la température et de la durée sont les mêmes que pour le traitement à l'HCl. Le nombre d'oeufs éclos, morts, diapausés et jaunés est relevé pour chaque ponte. Les substances chimiques ont été réparties, à partir de ces caractères, en fonction des données obtenues par l'analyse en blocs. Leurs similarités et leurs différences sont évaluées de la façon suivante :

$$d_{ij} = \sqrt{P \sum_{k=1}^P (x_{ki} - x_{kj})^2}$$

où :

d_{ij} = distance euclidienne entre les individus i et j

x = variable

P = nombre de caractères utilisés

La distance euclidienne type est l'une des mesures de différence les plus communes. Les catégories composées à partir de cette distance sont représentées sous la forme d'un dendrogramme.

RESULTATS

Les substances chimiques sont classées en cinq grands groupes suivant le pourcentage d'éclosion, comme le montre le tableau I.

Le premier groupe, composé de 33 substances chimiques (tableau II), n'indique aucune action diapausante. En effet, aucune éclosion d'oeufs n'a pu être détectée, les traitements ayant évidemment tué les oeufs. Ces substances chimiques ne peuvent donc être utilisées comme produit de remplacement.

Le deuxième groupe, qui comprend 23 substances chimiques (Fig. 1), ne donne aucune éclosion mais produit des pourcentages divers pour d'autres caractères tels que la mortalité et la diapause. L'analyse de groupe montre qu'à la distance euclidienne $\log 10^3$ trois catégories apparaissent : la première catégorie est composée de cinq substances chimiques, à savoir le sulfate de calcium, le nitrate de potassium, le chlorure de potassium, l'acide sulfurique (4,7 N) et le chromate de potassium et engendre une mortalité moyenne de 57,6 % et une diapause moyenne de 23,34 %. La deuxième catégorie, qui comprend l'acide molybdique, le carbonate de potassium, le chlorure de strontium et le tungstate de sodium, entraîne une mortalité moyenne de 44,18 % et une diapause moyenne de 39,07 %. La troisième catégorie contient 11 substances chimiques, à savoir l'acide citrique, l'acétate de sodium, l'acétate de cuivre, l'oxalate de sodium, l'orthophosphate dihydrogène de sodium, le citrate de sodium, "Surf" (5 g/100 ml), l'oxyde de zinc et le tétraborate disodique, avec une mortalité moyenne de 10,29 % et une diapause moyenne de 80,13 %. De plus, une catégorie indépendante qui n'a aucun lien avec les catégories précédentes est composée de l'acide oxalique, du tartrate de potassium et d'hydroxyde de barium.

Le troisième groupe contient 22 substances chimiques (Fig. 2). Parmi celles-ci, 16 substances forment un sous-groupe avec des taux moyens de 2,89 % pour l'éclosion, 4,56 % pour la mortalité, 89,41 % pour la diapause et 3 % pour le jaunissement. Ces substances sont les suivantes : acide sulfanilique, acide orthophosphorique (25 %), thiosulfate de sodium, sulfate de magnésium, sulfate d'aluminium potassium, oxalate disodique, oxyde d'aluminium, phosphate d'ammonium, nitrate d'ammonium, carbonate de sodium, citrate trisodique, fluorure de sodium, sulfate ferreux d'ammonium, ammoniac (50 %) et iodure de potassium. Les autres substances chimiques (sulfate d'ammonium d'aluminium, chlorure d'ammonium, chlorure de barium, benzamide, orthophosphate dihydrogène d'ammonium et oxalate d'ammonium) ont des actions indépendantes.

Le quatrième groupe comprend 22 substances chimiques (Fig. 3). Celles-ci sont réparties en trois catégories et une substance chimie reste indépendante. La première catégorie contient 5 substances chimiques, à savoir l'éthylène diamine tétracétique, le triton X-100 (1 %), le nitrate de cobalt sodique, l'acide salicyclique et le sulfate de potassium ; elle produit un taux d'éclosion moyen de 13,7 %, une mortalité de 32,18 %, un jaunissement de 7,5 % et une diapause de 24,42 %. La deuxième catégorie consiste en 3 substances chimiques, à savoir l'acide succinique, le sulfate de zinc et l'acétate de calcium avec un taux d'éclosion moyen de 13,12 %, une mortalité de 51,76 %, un jaunissement de 7,5 % et une diapause de 5,8 %. La troisième catégorie est la plus importante avec un pourcentage élevé de diapause (67,58 %), le même taux d'éclosion que dans la deuxième catégorie (14,3 %) et une faible mortalité (8,67 %). Les substances chimiques ainsi regroupées sont les suivantes : l'orthophosphate hydrogène de potassium, l'acide adéipique, la thio-urée, le métabisulfate de potassium, le peroxyde d'hydrogène (50 %), le sulfate de cuivre, le chlorure de manganèse, l'acétate de calcium, l'acide picrique, l'orthophosphate dihydrogène de potassium (10 %). Le chlorure de cuivre est le seul produit du groupe qui n'a pas de lien avec les autres substances et reste indépendant.

Le cinquième et dernier groupe (Fig. 4) comprend 23 substances chimiques qui se regroupent de façon similaire. Quinze substances produisent des taux d'éclosion (41,18 %) et de diapause (48,64 %) à peu près égaux et un taux de mortalité négligeable. Ces substances chimiques sont les suivantes : acide perchlorique, chlorure ferrique, acétate de magnésium, chlorure de strontium, chlorure d'ammonium, nitrate de magnésium, nitrate de sodium ammoniacal, nitrate de baryum, chlorure de sodium, chlorure de magnésium, de chaux éteinte, phosphate tricalcique, 2 % d'acide perchlorique et carbonate hydrogène de sodium. Quatre substances, soit le phosphate dibasique de calcium, le nitrite de sodium, l'hydroquinone et l'acide orthophosphorique, sont regroupés dans une même catégorie, avec une éclosion moyenne de 90 % et une diapause de 8 %. le phosphate d'ammonium, le sulfate d'ammonium et l'acétate de plomb entraînent un taux d'éclosion nettement différent des autres substances et sont indépendants.

DISCUSSION

Peu d'études ont été faites sur le remplacement du traitement à l'HCl en vue d'écourter la diapause des oeufs de ver à soie. L'injection de nitrate d'uranyle (Hasegawa, 1947), de KCl (Yoshitake, 1954), de 2,4 dinitrophényl et d'ATP (Takai et Nagashima, 1970) chez des femelles destinées à produire des oeufs diapausants a permis d'obtenir des oeufs non-diapausants. L'injection de 5'-AMP chez des femelles qui produisent normalement des oeufs non-diapausants a permis l'oviposition d'oeufs diapausants (Suzuki *et al.*, 1978). Cependant, les traitements chimiques proposés dans cette étude n'ont pas été utilisés précédemment.

Deux remarques intéressantes peuvent être tirées de ces résultats. En premier lieu, nos observations montrent qu'il existe au moins cinq à six substances chimiques qui, potentiellement, permettraient de remplacer l'HCl pour interrompre la diapause des oeufs de vers à soie. La plus efficace d'entre elles est le dodécyl sulfate de sodium, celui-ci permettant d'obtenir un pourcentage d'éclosion égal à celui du traitement à l'HCl. En ce qui concerne le coût, non seulement le dodécyl sulfate de sodium mais aussi les autres substances sont moins chers à l'emploi que l'HCl. Un des autres avantages de l'utilisation des substances chimiques de remplacement réside dans le fait qu'elles sont plus maniables et moins toxiques pour les oeufs que l'HCl.

En second lieu, nos résultats montrent que la théorie actuelle de l'action de l'HCl par le rôle fonctionnel de l'ion chlorure dans l'interruption de la diapause n'est plus valable. Il est généralement admis que le Cl⁻ diffuse, au cours du traitement à l'HCl, et neutralise l'action de l'hormone de diapause (Park et Yoshitake, 1970). Nos résultats montrent que les traitements chimiques sans libération de Cl⁻ peuvent également interrompre la diapause et permettre le développement de l'oeuf jusqu'à l'éclosion. Il se peut que la théorie du Cl⁻ soit corollaire à l'un des mécanismes d'interruption de la diapause, mais il peut être remplacé par n'importe laquelle des substances mentionnées dans cette étude.

On suppose que tout traitement de remplacement doit avoir les mêmes propriétés que l'HCl, particulièrement pour l'hormone de diapause. Miura (1929) a avancé l'hypothèse que le déclenchement et l'éclosion des oeufs traités à l'acide sont provoqués par l'ion chlorure. Cette

explication a été soutenue par Park et Yoshitaka (1970) qui ont suggéré que les oeufs ont la capacité d'absorber des ions négatifs tels que les ions chlorure. Les résultats obtenus avec les substances chimiques sélectionnées semble indiquer que les ions chlorure ne jouent aucun rôle dans l'interruption de la diapause mais que celle-ci est probablement due à la nature de la substance chimique employée qui neutralise l'action de l'hormone de diapause.

ADAPTIVE CHANGES IN THE RESPIRATORY ACTIVITY OF ENDOPARASITIC MAGGOTS OF UZIFLY (*EXORISTA* *SORBILLANS*, WEIDMANN) IN RELATION TO ITS HOST, THE SILKWORM (*BOMBYX MORI* L.)

N.R. PRASAD, Y. SRINIVASA REDDY & N.B. KRISHNAMURTHY

Sericulture Research Project, Department of Studies in Zoology, University of Mysore,
Manasagangotri, Mysore 570 006, India.

The Uzifly maggot is an endoparasite of mulberry as well as non mulberry silkworms. Heavy cocoon crop losses due to its infestation have been encountered. The maggot of Uzifly penetrates and grows inside the silkworm, eating all the tissues, sparing the silk gland and the digestive system, ultimately killing the silkworm at the larval or pupal stage depending on the timing of infection. Oxygen for the respiration of the maggot is obtained from the atmospheric air through an opening on the skin of the silkworm at the point of its penetration. Later, the maggot cuts off its contact with the atmospheric air and freely wanders in the body cavity of the silkworm. The respiratory activity of such a maggot and the adaptive changes in relation to the silkworm were discussed. Two silkworm races, namely Kalimpong-A (a bivoltine) and Hosa Mysore (a multivoltine) infected with Uzifly were studied to know the changes in the respiratory pattern of infection. No change was observed in the dissolved oxygen content of water when the maggots were submerged in water, since the maggots do not have the capacity to breathe dissolved oxygen. But they have a remarkable capacity to survive in the absence of oxygen. Even emergence and pupation were not much affected by underwater submersion for 420 minutes. The ability of the Uzi maggot to live in the absence of oxygen greatly increases its survivability since it provides free access to the fat body present at a distance from the site of infection.

Keywords : Endoparasite, silkworm, maggot, oxygen debt, respiration, survivability, emergence, pupation.

INTRODUCTION

The Uzifly, *Exorista sorbillans* (Diptera : Tachinidae), is parasitic on the mulberry silkworm, *Bombyx mori* (Datta and Mukherjee, 1974) and other non mulberry silkworms, (Mukherjee, 1919 ; Chowdhury, 1970) at maggot stage. The eggs are laid on the body of the silkworm by gravid female flies at the rate of one to two eggs per worm in field conditions. The eggs hatch on the body of the silkworm and the maggot penetrates the skin and is housed in a thin tube formed out of its own secretion. The tube is open to the outside through a pore made by the newly hatched maggot (Jolly, 1981). The maggot will move freely inside the tube which has a higher cubic capacity than itself. In the earlier stages of development, the maggot does not leave the tube and feeds on the fat body in the vicinity of the tube ; after exhausting the fat body around the tube, the maggot comes out of the tube and wanders in the body cavity of the silkworm, feeding on all tissues except the silk gland and the digestive tract (Japan Overseas Co-operation Volunteers, 1975). The early maggot obtains the oxygen necessary for its respiration through the atmospheric air because the so-called respiratory tube is connected to the atmospheric air through an opening on the body wall of the silkworm and a cluster of three spiracles is present at the posterior end of the maggot facing the opening on the skin. It is not

known how oxygen requirements of growing maggots which have left the respiratory tube and are moving inside the body of the silkworm (in the body cavity) are met. In view of the above lacunae in the understanding of the respiratory metabolism of Uzi maggots, the present work is undertaken.

MATERIAL AND METHODS

Two races of silkworms, namely Hosa Mysore (a multivoltine race) and Kalimong-A (a bivoltine race) which vary in their resistance to infections (Krishnaswami *et al.*, 1979; Iyengar *et al.*, 1980; Sapru *et al.*, 1980), were used in the experiment. About four layings (each laying contains 300-500 eggs) were brushed and reared following the improved rearing technique (Krishnaswamy, 1979). As the silkworm entered the first moult, the required number of Uzi maggots were brought from T. Narasipura cocoon market and were allowed to pupate in the laboratory. The emerged flies were maintained on sugar cubes and 10 % glucose solution (Sriharan *et al.*, 1971). Emerged flies mated within a day and the inseminated female flies were ready for oviposition on the following day. The silkworm by this time had undergone the fourth moult and entered the fifth instar. The silkworms were infected with the required number of Uzi eggs under controlled laboratory conditions.

Controlled infection of silkworm Uzifly eggs :

About 50-60 silkworms were infected with Uzifly eggs and divided into four groups as 1, 2, 3 and 4 egg infected silkworms and reared. The methods of infection and rearing are already described (Prasad *et al.*, 1985). The respiration of control and infected silkworms, Uzi maggots and pupae was studied using Warburg constant volume respirometer (Umbreit *et al.*, 1971). Respiratory flasks of 25 to 50 ml capacity were used in deference to the size of the silkworm.

Dissolved oxygen content of water was estimated after submerging 5-10 fully grown Uzi maggots for various durations ranging from 15 to 30 minutes at intervals of 15 minutes, following Winkler's method. The method consists of adding 2 ml each of solutions of manganese sulphate and alkaline potassium iodide to the water sample in a bottle. The iodine equivalent to the amount of dissolved oxygen was liberated by adding 2 ml of conc. sulphuric acid. The iodine liberated was then titrated against standard sodium thiosulphate and the amount of dissolved oxygen in the sample was calculated.

The lactic acid level of Uzi maggots was estimated after underwater submersion of a group of 5 maggots for a known period. The estimations were made at intervals of 10 minutes up to a maximum of 420 minutes following the method of Barker and Summerson (1941) modified by Huckabee (1956) [cf. Oser, 1976].

The revival time of Uzi maggots after submersion in water for different durations was calculated from the time elapsed between their removal out of water and restoration of their body movements.

Per cent pupation and per cent emergence of flies were calculated by allowing the submerged maggots of each group in separate beakers covered with a thin muslin cloth, and observing their pupation and emergence.

RESULTS

The changes in oxygen consumption upon infection in Hosa Mysore and Kalimpong-A are shown in Fig. 1 and 2 respectively. Generally the changes noticed are similar in both races though in extent more pronounced in Hosa Mysore. Oxygen uptake of submerged Uzi maggots from the atmospheric air was practically nil (Fig. 3), but overshoots three times the normal value when measured after submersion. No change in the dissolved oxygen content of water was observed (Fig. 4) when 5 and 10 Uzi maggots were left in water for 15 to 30 minutes.

The lactic acid content of Uzi maggot was estimated after underwater submersion for various intervals up to a maximum period of 420 minutes (Fig. 7). The lactic acid content decreased initially and attained normal value at 150 minutes after which significant change was not observed until 330-360 minutes. Thereafter the lactic acid levels were below normal.

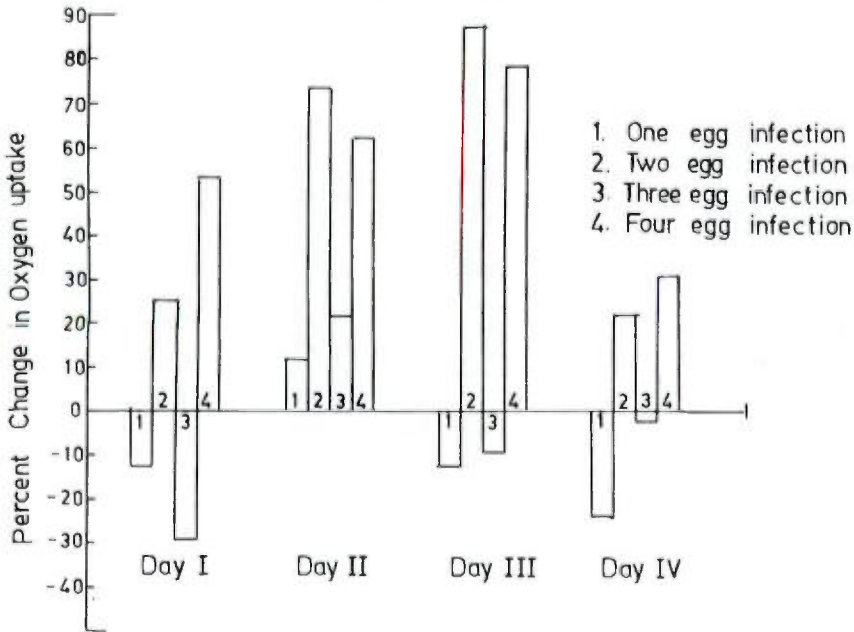


Fig. 1 : Histograms showing per cent changes in oxygen uptake of Uzi infected Hosa Mysore silkworm race.

Fig. 1 : Histogramme montrant le pourcentage de variation de la consommation d'oxygène chez le ver à soie Hosa Mysore infectée par la mouche uzi.

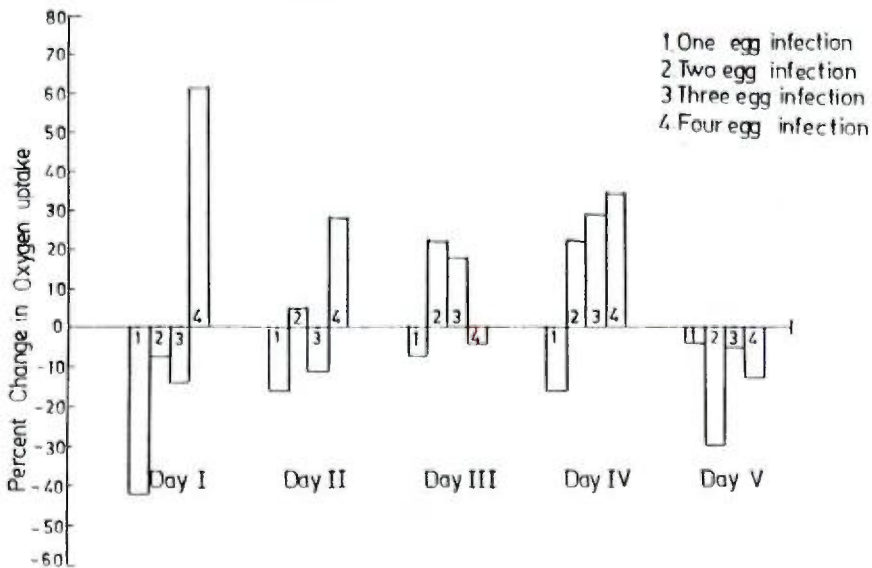


Fig. 2 : Histograms showing per cent changes in oxygen uptake of Uzi infected Kalimpong-A silkworm race.

Fig. 2 : Histogramme montrant le pourcentage de variation de la consommation d'oxygène chez le ver à soie Kalimpong-A infecté par la mouche uzi.

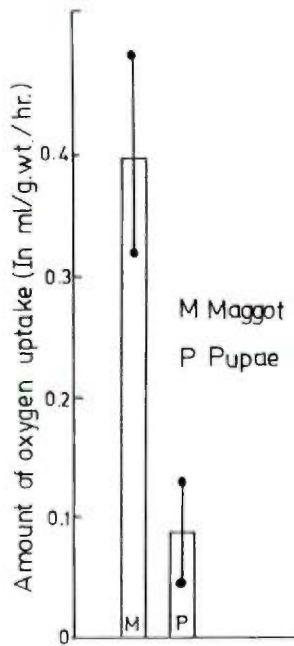


Fig. 3 : Histograms showing amount of oxygen uptake in Uzi maggots and pupae.

Fig. 3 : Histogramme montrant la quantité d'oxygène consommée par les asticots et les pupes uzi.

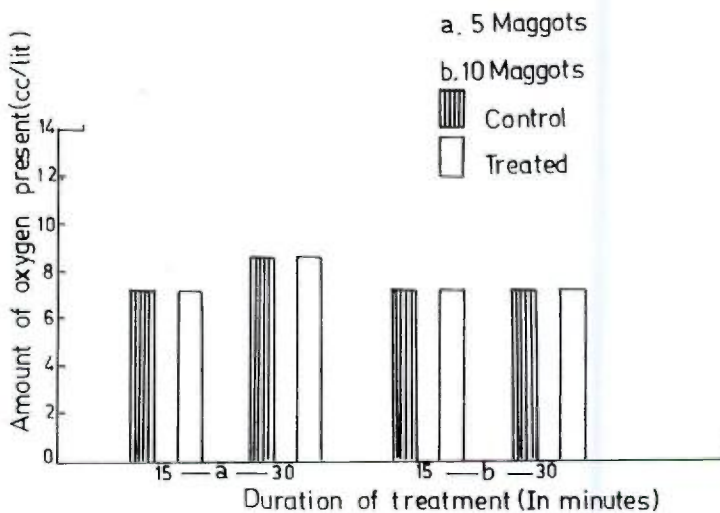


Fig. 4 : Histograms showing amount of dissolved oxygen present in tap water and water containing selected number of Uzi maggots for different durations.

Fig. 4 : Histogramme montrant la quantité d'oxygène dissous présente dans l'eau plate et dans l'eau contenant un nombre déterminé d'asticots uzi pendant différentes durées.

DISCUSSION

The selection of the two races, viz. Hosa Mysore and Kalimpong-A is based on the large difference in the rate of their growth and metabolism (Prasad *et al.*, 1985). The body weight of fully grown larvae would be 2.5-3 g for Hosa mysore, 3.5-4.5 g for Kalimpong-A. The difference in the rates of metabolism is reflected in their unit oxygen consumption - Table I) ; silkworms of Kalimpong-A showed higher rates of unit oxygen consumption in all the growth period studied.

Table I. Unit oxygen consumption of Hosa Mysore (HM) and Kalimpong-A (KA) silkworms at different days of the 5th instar and per cent difference between the two races.

Tableau I. Consommation d'oxygène à l'unité chez les vers à soie Hosa Mysore (HM) et Kalimpong-A à différents jours du cinquième âge et pourcentage de différence entre les deux races.

Day \ Race Jour \ Race	HM HM	KA KA	% difference % de différence
I	0.177 ± 0.022	0.285 ± 0.01	+61
II	0.168 ± 0.047	0.317 ± 0.001	+88
III	0.151 ± 0.044	0.254 ± 0.02	+68
IV	0.170 ± 0.017	0.278 ± 0.07	+63

A drop in oxygen consumption on the first day in one to three egg-infected silkworms (except two-egg-infected Hosa Mysore) can be attributed to behavioural changes consequent upon infection. The silkworms become lethargic and leaf consumption decreases significantly. The fifth instar stage is the most active growth period during which the worms increase in body weight by about 8,000-10,000 times and accounts 86.7 % of total leaf consumed (Shimizu, 1972). Impairment of normal feeding during such an active phase of growth throws the gross metabolism out of gear, which is reflected in the changes of the oxygen consumption observed in the infected silkworms. On 'two-day' infection the reduction in oxygen consumption was much lower in Kalimpong-A whereas in Hosa Mysore the unit oxygen consumption levels were higher than in the control. The vigorous oxygen consumption by the growing Uzi maggots might have influenced the total oxygen uptake by stimulating silkworm metabolism. The changes observed were more significant in Hosa Mysore probably due to low levels of unit oxygen consumption (Table I). The maggot respiration had less impact on Kalimpong-A as it showed a higher rate of unit oxygen consumption. Further, the infected silkworms though feed less, become restless and show more movement. The release of secretions of the maggots may also bring about an activation in the metabolic activity ; these changes causing an increase in the oxygen consumption rate. But on the fourth day the oxygen consumption was higher than in the control in two to four egg infected silkworms because of the loss of body weight suffered due to uninterrupted feeding of fat body by multiple number of Uzi maggots. On the fifth day the oxygen consumption of Kalimpong-A silkworms in all stages of infection was significantly below the normal ; the silkworm by this time is completely incapacitated due to the reasons already mentioned. The maggots would be freely moving about in the body cavity emptied of its fat body as it is consumed by the growing maggots.

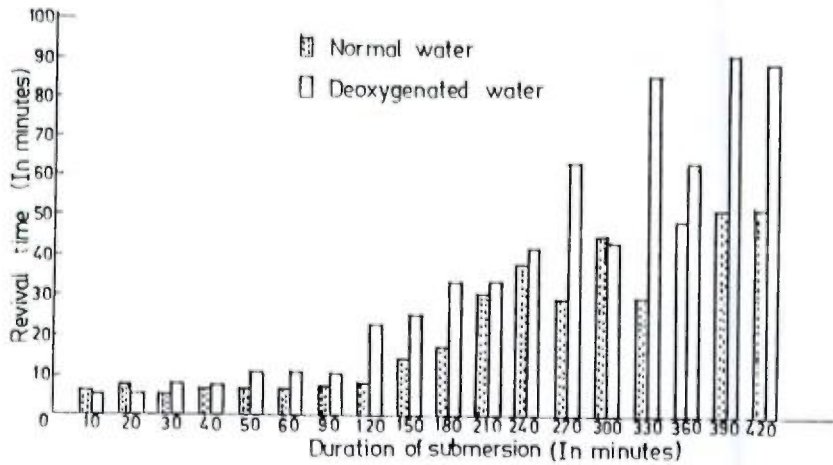


Fig. 5 : Histograms showing revival time of Uzi maggots submerged for different durations in normal and deoxygenated water.

Fig. 5 : Histogramme montrant la durée de réveil des asticots uzi immergés pendant des périodes différentes dans de l'eau normale et désoxygénée.

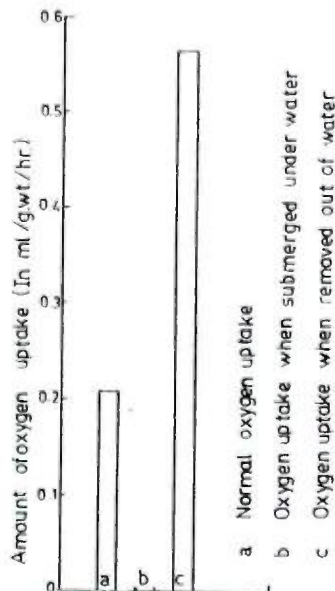


Fig. 6 : Histograms showing amount of oxygen uptake in Uzi maggot.

1. Normal oxygen uptake.
2. Oxygen uptake when submerged underwater.
3. Oxygen uptake when removed out of water.

Fig. 6 : Histogramme montrant la quantité d'oxygène consommée par les asticots uzi.

1. Consommation d'oxygène normale.
2. Consommation d'oxygène au cours de l'immersion.
3. Consommation d'oxygène après retrait hors de l'eau.

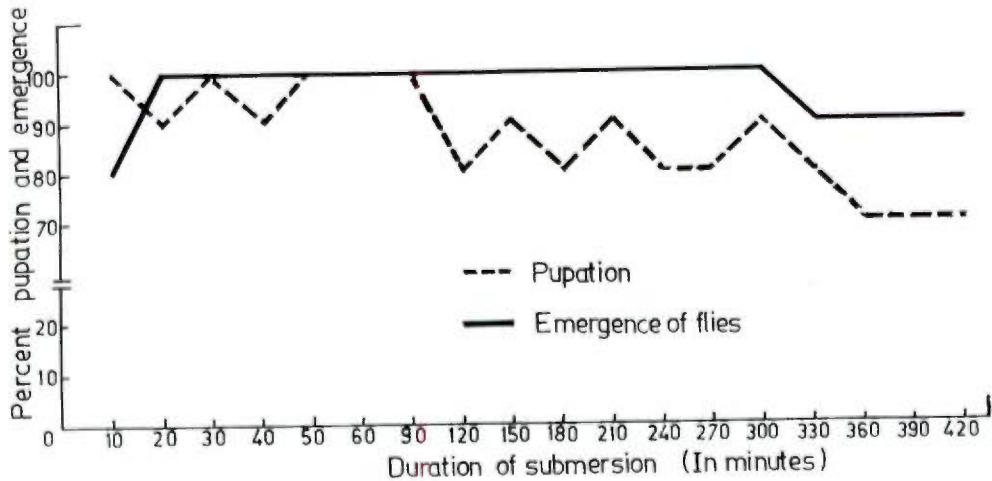


Fig. 7 : Graph showing per cent pupation and per cent emergence of flies from the Uzi maggots submerged in normal water for different durations.

Fig. 7 : Graphique montrant les pourcentages de pupaison et d'émergence des mouches provenant des asticots uzi immergés dans de l'eau normale selon la durée.

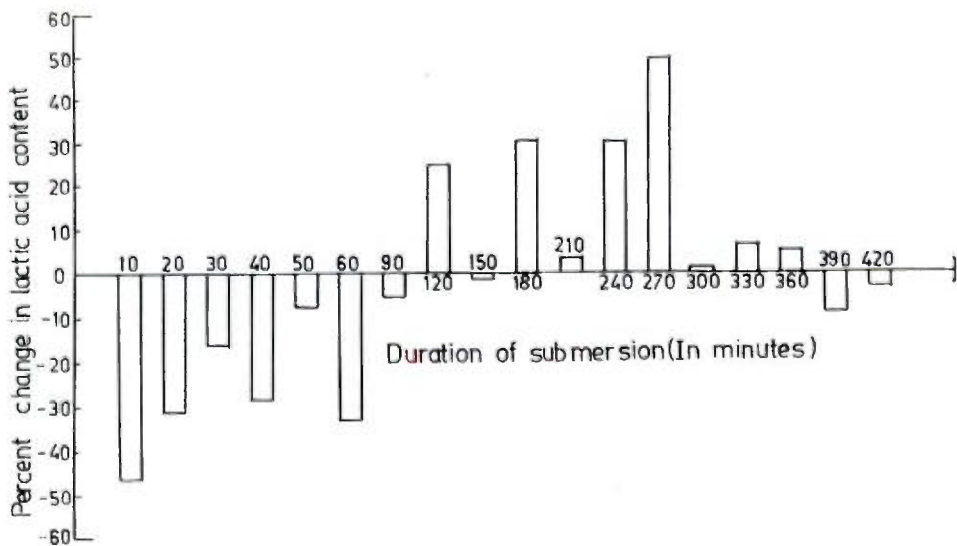


Fig. 8 : Histograms showing per cent difference of lactic acid concentration in Uzi maggot submerged for different durations.

Fig. 8 : Histogramme montrant le pourcentage de différence de concentration en acide lactique chez les asticots uzi immergés selon la durée.

The respiration of Uzi maggots would be of interest in view of its connection with the atmospheric air in the initial stages of infection, and loss of it as the maggots leave the respiratory tube and make excursions in the body cavity in search of the as yet untouched fat body. When oxygen consumption of fully grown maggots was studied in Warburg apparatus a significant level of oxygen uptake was noticed (Fig. 3). Maggot respiration was found to be higher than pupal respiration (Fig. 3). When maggots were submerged underwater and the dissolved oxygen content of water was estimated, no change was observed in the latter, which means that maggots do not have the capacity to breathe dissolved oxygen. The results also suggest that the maggot obtains the oxygen required from the atmospheric air and contribution in this connection by the silkworm is little. It was observed that the maggot strives in the initial stages of growth to retain its connection with the atmosphere. It drills a hole on the egg shell before penetrating the skin to keep up continuity until the empty shell falls off. Also, efforts to block the hole with grease failed since the grease is either expelled or sucked in by a piston-like movement of the maggot body in a close fitting respiratory tube. But they have a remarkable capacity to survive in the absence of oxygen because when maggots were placed in tap water and deoxygenated water they survived for as long as 420 minutes (Fig. 5). Incidentally 420 minutes is the time taken by the maggot after its emergence from the silkworm for pupation. The survival time was directly correlated with the period of submersion and relatively less in deoxygenated water than in normal water. Maggots underwater never pupated but did so immediately if the period of submersion was 6-7 hours. Survival of maggots underwater might then be due to their capacity to generate and tolerate large oxygen debts. When maggots were submerged underwater for 60 minutes and were removed and then oxygen uptake was studied in Warburg apparatus, the amount of oxygen uptake increased by 175 % (Fig. 6).

Underwater submersion did not affect the viability of maggots significantly as 100 % pupation was observed until five hours of submersion, after which the pupation rate was 90 %. Even emergence of flies was not affected until 90 minutes of submersion, after which the percentage of emergence ranged from 70 to 90 % (Fig. 7).

The remarkable ability of the Uzi maggot to live in the absence of oxygen has an adaptive significance as it permits free movements in the body cavity without breathing atmospheric air and thus provides free access to the fat body present at a distance from the site of infection during its sojourns.

Animals which have a better capacity to tolerate oxygen debt usually show Pasteur's effect. Hence lactic acid content of the whole maggot submerged for various periods ranging from 10-420 minutes was estimated to see whether Uzi maggot metabolism is also subject to the above physiological principle. But the lactic acid content of the maggot dropped significantly within 10 minutes of submersion and came to normal levels only after 90 minutes and higher than control levels from 120 to 360 minutes, after which the lactic acid levels were subnormal again. The drop in the lactic acid level in the initial stage of submersion can be attributed to a low metabolic activity consequent to the failure to breathe atmospheric oxygen. Slow reduction in the decrease until the lactic acid level reaches the normal level at 90 minutes of submersion and stepwise increase found thereafter until 270 minutes of submersion may be due to the slow and steady accumulation of lactic acid throughout the period of submersion. The reasons for the decrease of lactic acid in the maggot under submersion for 390-420 minutes cannot be predicted at present. The accumulated lactic acid might have been reutilised in the metabolism or, more likely, is excreted into the ambient water since accumulation of lactic acid beyond a certain level upsets the acid-base balance of the maggot body.

REFERENCES

- CHOWDHURY S.N. (1970), Eri culture. Publication of Sericulture Research Station (Assam), India, 1-68.
 DATTA R.K., MUKHERJEE P.K. (1974), Biology of infestation of silkworm pest, Uzifly (*Tricholyga sorbillans*). Proc. "Seminar on Silk", Bangalore.
 ANONYMOUS (1975), Text Book of Tropical Sericulture. Published by Japan Overseas Co-operation Volunteers, 4-2, 24 Hiroo, Shuya-K, Tokyo, Japan, 253-263.

- JOLLY M.S. (1981), Uzifly, its identification, prevention and control. Bulletin 4, C.S.R. & T.I., Mysore.
- KRISHNASWAMI S., SITARAMA IYENGAR M.N., BASAVARAJ H.K., GIRIDHAR K. (1979), Breeding of harder and higher productive bivoltine races suited to tropical conditions. Ann. Rep., C.S.R. & T.I., Mysore, 43-46.
- MASANORI SHIMIZU D. (1972), Hand book of Silkworm Rearing. Fuji Publication Co. Ltd., Tokyo, Japan, 262-263.
- MUKHERJEE N.G. (1919), Hand book of Sericulture. Publ. Bengal Secretariat Book Depot, Calcutta, India, 296.
- OSER L. B. (1976), Ed. Hawk's physiological chemistry. Tata McGraw-Hill Publ., New Dehli, 1103-1105.
- PRASAD N.R., SRINIVASA REDDY Y., KRISHNAMURTHY N.B. (1985), Studies on the physiological interactions between silkworm (*Bombyx mori*) and its endoparasite, Uzifly (*Exorista sorbillans*). Sericologia, 25(4), 511-523.
- SAPRU M.L., SURYANARAYANA CHETTY, SRINIVASABABU (1980), Studies on the performance of bivoltine hybrids in field and study on the performance of multivoltine hybrids in the field. Ann. Rep., C.S.R. & T.I., Mysore, 112-113.
- SITARAMA IYENGAR M.N., MALAVATHY S.N., MAGADOM S.B. (1980), Germplasm collection. Ann. Rep., C.S.R. & T.I., Mysore, 252.
- SRIHARAN J.P., SAMSON M.V., KRISHNASWAMY S., DATTA R.K. (1971), Laboratory investigation on Uzifly *Tricholyga bombycis* Beck a tachinid parasite of silkworm (*Bombyx mori* L), rearing and reproduction of the parasite. Indian Journal of Sericulture, X (7), 14-22.
- UMBREIT W.W., BURRIS R.H., STAUFFER J.F. (1964), Manometric techniques. Burgess Publishing Company, Minnesota, 1-50.

ADAPTATION DE L'ACTIVITE RESPIRATOIRE DES LARVES DE LA MOUCHE UZI (*EXORISTA SORBILLANS*, WEIDMANN) A SON HOTE, LE VER A SOIE (*BOMBYX MORI* L.)

N.R. PRASAD, Y. SRINIVASA REDDY & N.B. KRISHNAMURTHY

Sericulture Research Project, Department of Studies in Zoology, University of Mysore,
Manasagangotri, Mysore 570 006, Inde.

L'asticot de la mouche uzi est un endoparasite du ver à soie du mûrier et d'autres séricigènes non mûriers. Il cause de lourdes pertes dans les récoltes de cocons. L'asticot de la mouche uzi pénètre dans le ver à soie et s'y développe, mangeant tous les tissus mais épargnant la glande séricigène et le système digestif, tuant enfin le ver à soie au stade larvaire ou nymphal suivant le moment de l'infestation. L'oxygène nécessaire à la respiration de l'asticot provient de l'atmosphère à travers une ouverture dans la peau du ver à soie au point de pénétration du parasite. Plus tard, l'asticot se coupe de son contact avec l'atmosphère et circule librement dans les cavités du corps du ver à soie. L'activité respiratoire de ce type d'asticot et son adaptabilité au ver à soie sont discutées. On a étudié deux races de vers à soie, à savoir Kakimpong-A (bivoltine) et Hosa Mysore (multivoltine), infestés par la mouche uzi afin de déterminer les modifications respiratoires de l'infestation. Aucun changement n'a été observé en ce qui concerne le contenu de l'eau en oxygène dissous quand les asticots sont immergés puisqu'ils ne sont pas capables de respirer de l'oxygène dissous. Ils ont néanmoins la faculté remarquable de pouvoir survivre en l'absence d'oxygène. Même l'émergence et la pupaison sont très peu affectées par l'immersion sous l'eau pendant 420 minutes. La faculté de l'asticot uzi à vivre en l'absence d'oxygène augmente fortement sa capacité de survie car celle-ci lui permet d'accéder librement au corps adipeux du ver à soie, bien qu'il soit éloigné du site de l'infestation.

INTRODUCTION

La mouche uzi *Exorista sorbillans* (Diptera : tachinidae) est un parasite du ver à soie du mûrier *Bombyx mori* (Datta et Mukherjee, 1974) et d'autres séricigènes non mûriers (Mukherjee, 1919 ; Chowdhury, 1970) au stade larvaire. Les oeufs sont pondus sur le corps du ver à soie par les mouches femelles fécondées à raison d'un à deux oeufs par larve dans des conditions naturelles. Les oeufs éclosent sur le corps du ver à soie, l'asticot pénètre dans la peau et se loge dans un tube étroit formé par ses propres sécrétions. Le tube débouche sur l'extérieur par un pore creusé par l'asticot après l'éclosion (Jolly, 1981). Il circule librement à l'intérieur du tube qui a une plus grande capacité cubique que l'asticot lui-même. Dans les premiers stades du développement, l'asticot ne quitte pas le tube et se nourrit du corps adipeux dans le voisinage du tube ; après avoir épuisé le corps adipeux autour du tube, l'asticot en sort puis circule dans la cavité du corps du ver à soie, se nourrissant de tous les tissus sauf de la glande séricigène et du tube digestif (Japan Overseas Co-operation Volunteers, 1975). Le jeune asticot obtient l'oxygène nécessaire à sa respiration par l'air de l'atmosphère car le tube dit respiratoire est relié à l'atmosphère par une ouverture sur la paroi du corps du ver à soie ; un groupe de trois stigmates donnant sur l'ouverture de la peau du ver à soie se trouve à l'extrémité postérieure de l'asticot. On ne sait pas comment sont satisfaits les besoins en oxygène de l'asticot âgé qui a quitté le tube respiratoire et qui circule dans le corps du ver à soie (dans la cavité du corps). Le présent travail

a été entrepris afin de combler les lacunes dans la connaissance du métabolisme respiratoire des asticots uzi.

MATERIELS ET METHODES

Deux races de vers à soie, à savoir Hosa Mysore (race multivoltine) et Kalimpong-A (race bivoltine), qui diffèrent par leur résistance aux infestations (Krishnaswami et coll., 1979 ; lyengar et coll., 1980 ; Sapru et coll., 1980) ont été utilisés dans cette expérience. Environ quatre pontes (chaque ponte comprenant de 300 à 500 oeufs) ont été levées suivant la technique d'élevage améliorée de Krishnaswami (1979). Lorsque le ver à soie entre dans sa première mue, le nombre voulu d'asticots uzi, apportés du marché aux cocons de T. Narasipura, se pupent en laboratoire. Les mouches émergées sont nourries de morceaux de sucre et d'une solution de glucose à 10 % (Sriharan et coll., 1971). Les mouches émergées s'accouplent dans la journée ; les femelles fécondées sont prêtes pour l'oviposition le lendemain. Le ver à soie est, à ce moment, passé par sa quatrième mue et arrive au cinquième âge. Les vers à soie sont infestés par le nombre requis d'oeufs uzi sous contrôle de laboratoire.

Infestation contrôlée du ver à soie par les oeufs uzi :

Environ 50 à 60 vers à soie sont infestés d'oeufs uzi. Ils sont répartis en quatre groupes, à savoir les groupes infestés par 1, 2, 3 et 4 oeufs puis élevés. Les méthodes d'infestation et d'élevage ont déjà été décrites (Prasad et coll., 1985). La respiration des vers à soie témoins et infestés, des asticots et des pupes uzi est étudiée au moyen du respiromètre à volume constant de Warburg (Umbreit et coll., 1971). Des flacons respiratoires d'une capacité de 25 à 50 ml ont été utilisés en fonction de la taille du ver à soie.

Le contenu de l'eau en oxygène dissous est estimé après immersion de 5 à 10 asticots uzi matures pendant 15 à 30 minutes à intervalles de 15 minutes, suivant la méthode de Winkler. Celle-ci consiste à ajouter 2 ml de chacune des solutions de sulfate de manganèse et d'iodure de potassium alcalin à l'échantillon d'eau dans une bouteille. L'équivalent en iodure du total d'oxygène dissous est libéré par addition de 2 ml d'acide sulfurique concentré. L'iodure libéré est ensuite titré avec un standard thiosulfate de sodium et la quantité d'oxygène dissous dans l'échantillon est calculée.

Le niveau d'acide lactique des asticots uzi est estimé après immersion sous l'eau d'un groupe de 5 asticots pendant une période déterminée. Les estimations sont faites toutes les dix minutes jusqu'à un maximum de 420 minutes suivant la méthode de Barker et Summerson (1941) modifiée par Huckabee (1956) [cf. Oser, 1976].

Le moment du réveil des asticots uzi après immersion sous l'eau pendant des laps de temps différents est calculé d'après le temps écoulé entre leur sortie de l'eau et la reprise de leurs mouvements corporels.

Les pourcentages de pupaison et d'émergence des mouches sont calculés en déposant les asticots immergés de chaque groupe dans des bechers séparés recouverts d'un tissu de mousseline fin qui permet l'observation de leur pupaison et de leur émergence.

RESULTATS

Les modifications de consommation d'oxygène qui suivent l'infestation chez Hosa Mysore et Kalimpong-A sont décrits dans les figures 1 et 2 respectivement. D'une façon générale, les changements observés sont similaires chez les deux races bien que d'une étendue plus prononcée chez Hosa Mysore. La consommation d'oxygène de l'air par les asticots uzi est pratiquement nulle (Fig. 3) mais est multipliée par trois par rapport à la valeur normale lorsqu'elle est mesurée après l'immersion. Aucun changement du contenu en oxygène de l'eau n'a été observé (Fig. 4) quand 5 à 10 asticots uzi sont immergés pendant 15 à 30 minutes.

Le contenu en acide lactique de l'asticot uzi est estimé après immersion sous l'eau pendant des laps de temps variés jusqu'à un maximum de 420 minutes (Fig. 7). Le contenu en acide lactique commence par décroître puis atteint une valeur normale 150 minutes plus tard, après quoi aucun changement significatif n'est observé jusqu'à 330 à 360 minutes. Les niveaux en acide lactique sont ensuite en-dessous de la normale.

DISCUSSION

La sélection des deux races, à savoir Hosa Mysore et Kalimpong-A, est basée sur l'importante différence entre leurs taux de croissance et leurs métabolismes (Prasad et coll., 1985). Le poids du corps des larves matures est de 2,5 à 3 grammes chez Hosa Mysore et de 3,5 à 4,5 grammes chez Kalimpong-A. La différence entre les taux de métabolisme se reflète dans leur consommation d'oxygène à l'unité (Table I) : les vers à soie Kalimpong-A montrent des taux de consommation d'oxygène par unité plus élevés pour toutes les périodes de croissance étudiées.

On observe une chute dans la consommation d'oxygène le premier jour chez les vers à soie infestés par un à trois oeufs (sauf pour les vers à soie Hosa Mysore infestés par deux oeufs) ; elle peut être attribuée à des changements de comportement consécutifs à l'infestation. Les vers à soie deviennent léthargiques et leur consommation de feuilles diminue très nettement. Le cinquième âge est la période de croissance la plus active : le poids des larves augmente de 8 000 à 10 000 fois et la consommation de feuilles représente 86,7 % du total des feuilles consommées (Shimizu, 1972). L'altération du nourrissage normal durant une période aussi active compromet le métabolisme brut, ce qui se reflète dans les changements de consommation d'oxygène observés chez les vers à soie infestés. Après deux jours d'infestation, la réduction de consommation d'oxygène est beaucoup moins forte chez Kalimpong-A, tandis que chez Hosa Mysore les niveaux de consommation d'oxygène par unité sont plus élevés que chez le témoin. La forte consommation d'oxygène des asticots uzi en pleine croissance peut avoir influencé la consommation totale d'oxygène en stimulant le métabolisme des vers à soie. Les changements observés sont plus significatifs chez Hosa Mysore probablement en raison des faibles niveaux de consommation d'oxygène (Tableau I). La respiration des asticots a moins d'impact sur Kalimpong-A car elle fait apparaître un taux de consommation d'oxygène plus élevé. De plus, les vers à soie infestés, bien qu'ils se nourrissent moins, donnent des signes d'agitation. Il se peut également que la libération de sécrétions des asticots provoque un accroissement de l'activité métabolique, ces changements induisant une augmentation de la consommation d'oxygène. Néanmoins, au quatrième jour, la consommation d'oxygène est plus élevée chez les vers à soie infestés de deux à quatre oeufs que chez les témoins en raison de la perte de poids subie du fait du nourrissage ininterrompu sur le corps adipeux de nombreux asticots uzi. Au cinquième jour, la consommation d'oxygène des vers à soie Kalimpong-A à tous les stades de l'infestation descend nettement en-dessous de la normale ; le ver à soie est alors complètement paralysé du fait des raisons mentionnées ci-dessus. Les asticots circulent librement dans la cavité du corps vidée de son corps adipeux consommé par les asticots en pleine croissance. La respiration des asticots est intéressante du fait de leur liaison avec l'atmosphère aux premiers stades de l'infestation et de la perte de cette liaison lorsque l'asticot quitte le tube respiratoire pour circuler dans la cavité du corps à la recherche du corps adipeux encore intact. En étudiant la consommation d'oxygène des asticots matures avec l'appareil de Warburg, on note un niveau significatif de consommation d'oxygène (Fig. 3). On observe que la respiration des asticots est plus forte que la respiration des pupes (Fig. 3). Après immersion des asticots dans l'eau, l'analyse ne révèle aucun changement du contenu de l'eau en oxygène dissous, ce qui signifie que les asticots n'ont pas la faculté de respirer l'oxygène dissous. Les résultats suggèrent également que l'oxygène nécessaire à l'asticot provient de l'atmosphère et que l'apport du ver à soie est, à cet égard, très faible. On observe que l'asticot s'efforce de maintenir son contact avec l'atmosphère aux premiers stades de croissance : il perce un trou dans la coque de l'oeuf avant de pénétrer dans la peau pour pouvoir continuer à respirer jusqu'à ce que la coque vide tombe. En outre, nous avons essayé de bloquer le trou avec de la graisse, mais cette tentative a échoué, la graisse étant soit évacuée, soit aspirée par un mouvement de piston du corps de l'asticot dans l'étroit tube respiratoire. Les asticots ont néanmoins une capacité de survie remarquable en l'absence d'oxygène car, quand ils sont placés dans de l'eau plate ou désoxygénée, ils peuvent survivre jusqu'à 420 minutes (Fig. 5), temps nécessaire à l'asticot pour sa pupaison après être sorti du ver à soie. Le temps de survie est directement corrélé avec la durée d'immersion et est relativement plus court dans l'eau désoxygénée que dans l'eau plate. Les asticots immergés n'atteignent jamais le stade puce, sauf si la durée d'immersion est de 6 à 7 heures. La survie des asticots immergés pourrait alors être due à leur capacité à générer et tolérer des manques d'oxygène élevés : lorsqu'on étudie au moyen de l'appareil

Warburg la consommation d'oxygène après sortie de l'eau d'asticots immergés pendant 60 minutes, on observe que celle-ci augmente de 175 % (Fig. 6).

L'immersion sous l'eau n'affecte pas la viabilité des asticots de façon significative car on observe une pupaison de 100 % après cinq heures d'immersion, après lesquelles le taux de pupaison est de 90 %. L'émergence des mouches n'est pas non plus affectée jusqu'à 90 minutes d'immersion, après quoi le pourcentage d'émergence descend à 70-90 % (Fig. 7).

La capacité remarquable de l'asticot uzi à vivre en l'absence d'oxygène montre qu'il est capable de s'adapter car elle lui permet de se déplacer dans le corps du ver à soie sans respirer l'air extérieur, lui donnant ainsi libre accès au corps adipeux qui se situe loin du site d'infestation.

Les animaux qui ont une forte capacité de manque d'oxygène manifestent généralement l'effet Pasteur. Aussi a-t-on évalué le contenu en acide lactique de l'asticot immergé pendant 10 à 420 minutes afin de déterminer si le métabolisme de l'asticot uzi est également soumis au principe physiologique énoncé plus haut. Le contenu en acide lactique de l'asticot chute néanmoins très nettement dans les 10 minutes qui suivent l'immersion puis revient à un niveau normal seulement 90 minutes plus tard, il est plus élevé que chez les témoins entre 120 et 360 minutes puis descend à nouveau en-dessous de la normale. La chute du contenu en acide lactique au début de l'immersion peut être attribuée à une faible activité métabolique consécutive au manque d'oxygène extérieur. La diminution de la perte en acide lactique jusqu'à ce que celui-ci atteigne un niveau normal 90 minutes après l'immersion et l'augmentation progressive observée ensuite jusqu'à 270 minutes d'immersion pourraient être dues à une accumulation lente et régulière d'acide lactique tout au long de la période d'immersion. Les raisons de la diminution du contenu en acide lactique chez l'asticot après 390 à 420 minutes d'immersion sont encore inexplicables. Il se peut que l'acide lactique accumulé ait été réutilisé dans le métabolisme ou, plus probablement, soit évacué dans l'eau environnante, l'accumulation d'acide lactique au-delà d'un certain niveau perturbant l'équilibre acide du corps de l'asticot.

EVALUATION OF LOSS IN ECONOMIC VALUES OF THE TASAR SILKWORM, *ANTHERAEA PAPHIA* (LINNAEUS), COCOONS FOLLOWING THE PARASITIZATION BY THE TASAR UJI FLY, *BLEPHARIPA ZEBINA* (WALKER)

G. M. PATIL & C. J. SAVANURMATH*

Department of Sericulture, University of Agricultural Sciences, GKVK, Bangalore - 560 065, India.

* Department of Zoology, Sericulture Section, Karnatak University, Dharwad - 580 003, India.

*The tasar silkworm, *Antheraea paphia* (Linn.), parasitized by the tasar uji fly, *Blepharipa zebina* (Walk.), in the late fifth instar survived until cocoon formation. This communication deals with the extent of infestation by the parasitoid in the cocoon stage, loss of economic values, and the relative loss of individual cocoon characters due to the parasitization. About 3.6 % cocoons were found infested, and about 76.5 % of the infested cocoons were pierced by the uji maggots. In general, the parasitization reduced the economic characters of the cocoons significantly.*

The superparasitization was very common, and 3-45 parasitoids were observed per cocoon. Further, the superparasitization indicated a highly significant negative correlation with the weight of the cocoon, and the weight of the dead prepupal host. However, the shell weight did not indicate a negative correlation. Possibly, therefore, the silk production was not affected adversely by the superparasitization. Possible causes for the peculiarity are discussed.

Keywords : Tasar silkworm, *Antheraea paphia*, tasar uji fly, *Blepharipa zebina*, superparasitization effect, cocoon characters, uji parasitization, tasar silkworm cocoons, parasitoid density, cocoon economic values, silk synthesis, silk production.

INTRODUCTION

Productionwise, the tasar silk stands second in the world, next only to the mulberry silk. However, the tasar culture suffers 40-45 % depredation by a variety of natural enemies, as the cultivation is done in wild and semidomesticated conditions. The tasar uji fly, *Blepharipa zebina* (Walker) (Diptera : Tachinidae), a major parasitoid of the tasar silkworm, *Antheraea paphia* (Linn.) (Arora and Gupta, 1979), alone causes about 10 % of the damage (Jolly *et al.*, 1974). *B. zebina* is mostly a larval and occasionally a larval-pupal parasite. As a result, the tasar silkworms which are parasitized in early instars (I-IV) are killed by the escaping maggots before the host could spin its cocoon. Interestingly, however, the silkworms which are parasitized during the late fifth instar are killed in the prepupal stage, but after spinning the cocoons. The maggots coming out of the pupae may sometimes pierce the soft cocoons and escape out to pupate in the soil, or they may be trapped inside the cocoons. This leads to the damage of the cocoons. Presently, there is no critical information available about the extent of the damage caused by the parasitoid in the pupal stage, and the loss of economic values through the qualitative and quantitative loss in the individual cocoon characters, consequent upon the parasitization. Moreover, the superparasitization is very common in the tasar silkworm. Cotes (1896) reported, on average, 15 *B. zebina* maggots per tasar worm, whereas our own

earlier studies have revealed the presence of 1-52 parasitoids per host cocoon (Patil and Savanurmah, in press). Thus the knowledge about the impact of superparasitization on cocoon characters also forms an important part of sound tasar culture practices. Therefore, the present studies have been undertaken.

MATERIALS AND METHODS

The present experiments were conducted on cocoons collected from the 1986 September-October *A. paphia* crop, which was brought on *Terminalia* trees at the Basic Tasar Seed Farm, Khanapur, (Karnataka, India). Nearly 2,340 cocoons were observed for the study of nature and extent of uji infestation in the crop. These cocoons were hanged in 17 random groups for moth emergence in the grainage. The uji infested cocoons were sorted out and categorised into 32 groups on the basis of the number of uji puparia they contained. Cocoon characters, such as length, circumference, weight, shell weight (with and without the peduncle), and weight of the dead host were recorded. For comparison, 44 uninfested live cocoons were also examined. The proportional average values of both uninfested and infested cocoons were statistically compared (Z-test; Standard Normal Variable, Larger Sample). Besides, the correlation between the number of uji puparia per host cocoon and the cocoon characters of the respective infested groups was also worked out independently.

RESULTS AND DISCUSSION

The extent of infestation :

Out of the 2,340 cocoons, only 85 cocoons were found infested by *B. zebina*, accounting for 3.63 % of the infestation at the cocoon stage (Table I). Among the infested ones, 76.47 % of the cocoons were pierced by the uji maggots (Figure 1), and the remaining 23.73 % were unpierced. The unpierced cocoons were reelable, and therefore were commercially useful. But from the viewpoint of egg production, all the infested cocoons, pierced or unpierced, were unfit as the host had already died inside the cocoons (Figure 2). Despite the cocoons being pierced, the majority of the maggots had pupated inside the cocoons. On opening the unpierced cocoons, it was observed that the uji flies of normal size without any observable deformity, were found trapped and died inside the cocoons, indicating suicidal reproduction. However, most of the pierced cocoons revealed the presence of only the empty uji puparia suggesting that the adult uji flies had escaped out.

Comparison between the infested and the normal cocoons :

Table II presents the cocoon characters of the 32 categories of the uji infested cocoons, grouped according to the number of uji puparia they contained. The mean values of the parameters were : cocoon length 4.60 ± 0.234 cm, cocoon circumference 8.67 ± 0.500 cm, cocoon weight 2.17372 ± 0.41878 g, shell weight with peduncle 0.76799 ± 0.19818 g, shell weight without peduncle 0.65207 ± 0.12826 g, and the weight of the dead host 1.30289 ± 0.38910 g. The mean values of the parameters for the uninfested normal cocoons have been recorded in Table III. Respectively they are : 4.77 ± 0.47 cm, 9.44 ± 0.61 cm, 9.19 ± 1.46 g, 1.26 ± 0.26 g, 1.13 ± 0.23 g, and 7.64 ± 1.74 g. The statistical comparison of the data indicated that the parasitization of the tasar silkworm significantly reduced the economic values of the tasar cocoons (Table III). Whereas the circumference, cocoon weight, shell weight with or without peduncle, and the host weight demonstrated a highly significant reduction, the length of the cocoon decreased significantly. Since parasitoids use large amounts of conjugated haemolymph proteins from the host (Barras *et al.*, 1972) and interfere usually with normal protein synthesis (Dahlman and Vinson, 1975), it is possible that the cocoon characters and the efficacy of silk production of the parasitized host might have got reduced. Besides, at least some of the host glycogen might have been utilised by the parasitoid for its development (Dahlman and Vinson, 1980), rendering the diseased larvae debile.

Table I. Extent of uji parasitization to the tasar silkworm cocoons (1986 September-October, commercial crop).

Tableau I. Etendue du parasitisme de la mouche uji sur des cocons de vers à soie tasars (Septembre-Octobre 1986, culture commerciale).

No. of cocoons per sample <i>Nb. de cocons par échantillon</i>	No. of infested cocoons per sample <i>Nb. de cocons infestés par échantillon</i>	No. of pierced cocoons <i>Nb. de cocons percés</i>	No. of unpierced cocoons <i>Nb. de cocons intacts</i>
94	5 (9.32)	4 (80.00)	1 (20.00)
99	4 (4.04)	1 (25.00)	3 (74.00)
83	5 (6.02)	4 (80.00)	1 (20.00)
89	2 (2.25)	2 (100.00)	0 (0.00)
78	1 (1.28)	1 (100.00)	0 (0.00)
124	2 (1.61)	1 (50.00)	1 (50.00)
154	4 (2.60)	3 (75.00)	1 (25.00)
184	11 (6.00)	8 (72.73)	3 (2.27)
202	9 (4.46)	8 (88.89)	1 (11.11)
227	6 (2.64)	4 (66.67)	2 (33.33)
170	6 (3.53)	6 (100.00)	0 (0.00)
199	6 (3.01)	6 (100.00)	0 (0.00)
122	2 (1.64)	1 (50.00)	1 (50.00)
135	9 (6.67)	7 (77.78)	2 (22.22)
132	3 (2.27)	2 (66.67)	1 (33.33)
146	2 (1.37)	1 (50.00)	1 (50.00)
102	8 (7.84)	6 (75.00)	2 (25.00)
Total 2340	85 (3.63)	65 (76.47)	20 (23.53)

The figures in parentheses indicate the percentage.

Les chiffres entre parenthèses indiquent le pourcentage.

Effect of the superparasitization :

Superparasitization is very common in *A. paphia* (Figure 3). In the present test material the number of uji puparia per cocoon (Figure 4) found in various groups ranged between 3 and 45. If a host contains two or more parasites, it is said to be superparasitized (Allee *et al.*, 1959). The cocoon characters against the density of parasitoids per host cocoon are presented in Table II. The statistical correlation between the number of uji puparia per host and the economic cocoon characters of the tasar silkworm is depicted in Table IV. It was obvious that the cocoon weight and the dead host weight indicated a highly significant negative correlation with the increasing number of uji puparia per host. Possibly the superparasitization places an additional stress upon the host, and tends to deplete metabolites to a greater extent than the solitary parasitoids do (Dalhman, 1970 ; Brewer *et al.*, 1973). Although the cocoon length and circumference decreased with the increasing density of parasitoids, the correlation was not significant. Quite interestingly, however, the shell weight demonstrated a non significant yet a positive correlation. This would at least mean that the silk production was not affected adversely by the superparasitization. This can happen when considerable silk synthesis by the host

Table II. Groupwise^a characters^b of the uji infested tasar silkworm cocoons (1986 September-October, commercial crop).

Tableau II. Répartition^a des caractères^b des cocons de ver à soie tasar infestés par la mouche uji (septembre-octobre 1986, culture commerciale)

Group	Number of uji puparia per cocoon	Cocoon size		Cocoon weight with peduncle	Shell weight		Dead host weight
		Length	Circumference		with peduncle	without peduncle	
		Taille du cocoon			Poids de la coque		
		Longueur	Circonférence		avec pédoncule	sans pédoncule	
Groupe	Nombre de pupariums uji par cocon			Poids du cocon avec le pédoncule			Poids de l'hôte mort
		(cm)	(cm)	(g)	(g)	(g)	(g)
1	3	4.2	8.0	1.52560	0.44475	0.38736	1.01113
2	4	4.7	8.1	2.53523	0.64509	0.56636	1.84944
3	5	4.6	9.2	2.53974	0.75928	0.68813	1.72942
4	6	4.8	9.0	2.55251	0.87250	0.79002	1.59375
5	7	4.6	8.8	2.43482	0.87255	0.78319	1.49200
6	8	4.7	8.7	2.43830	0.65546	0.52335	1.69099
7	9	4.5	8.1	1.95292	0.64621	0.58374	1.23223
8	10	4.7	9.0	2.93732	2.04570	0.92113	1.84250
9	11	4.5	8.4	2.23635	0.75941	0.68030	1.36473
10	12	5.0	9.7	2.61760	0.79346	0.69600	1.51450
11	13	5.0	8.9	2.64149	0.79903	0.73233	1.72000
12	14	4.5	8.7	2.16910	0.58499	0.49936	1.37724
13	15	4.5	9.3	2.6065	0.71233	0.67117	1.60675
14	16	4.8	8.9	2.46045	0.82558	0.73724	1.48105
15	17	4.6	8.5	2.19292	0.83417	0.71203	1.18052
16	18	4.5	8.3	2.11680	0.70381	0.64603	1.18213

Continued / Suite page suivante

Table II. Continued / *Tableau II. Suite*

Group	Number of uji puparia per cocoon	Cocoon size		Cocoon weight with peduncle	Shell weight		Dead host weight
Groupe	Nombre de pupariums uji par cocon	Length	Circumference	Poids du cocon avec le pédoncule	with peduncle	without peduncle	Poids de l'hôte mort
		Taille du cocon			Poids de la coque		
		Longueur	Circonférence		avec pédoncule	sans pédoncule	
		(cm)	(cm)	(g)	(g)	(g)	(g)
17	19	4.6	8.6	2.40858	0.93300	0.77349	1.29769
18	20	4.5	8.0	1.49703	1.57958	0.51301	0.93645
19	21	4.6	8.6	2.15514	0.85311	0.76467	1.13705
20	22	4.2	8.1	1.43900	0.65100	0.40713	0.88301
21	23	5.3	10.2	3.15853	0.43918	0.42493	2.57770
22	24	4.6	9.2	1.94910	0.74239	0.64655	1.08025
23	25	4.7	8.7	2.02335	0.65867	0.58220	1.23199
24	27	4.2	8.3	2.16320	0.93722	0.82016	1.09355
25	28	4.6	8.6	2.17550	0.85958	0.82010	1.16600
26	29	4.6	8.5	1.81105	0.75330	0.60000	0.92340
27	30	4.8	9.0	1.97106	0.73554	0.68615	1.67703
28	32	4.7	8.3	1.59450	0.56922	0.54042	0.88240
29	33	4.7	8.6	1.8535	0.66045	0.61715	1.03978
30	35	4.6	8.6	1.68515	0.65400	0.61520	0.88970
31	37	4.6	8.0	1.83280	0.87955	0.79000	0.83560
32	45	4.3	8.9	1.88400	0.75700	0.64743	0.87268
Mean / Moyenne	19.312	4.60	8.67	2.17372	0.76799	0.65207	1.30289
SD / Ecart type	10.73	0.234	0.500	0.41878	0.19818	0.12826	0.38910

a. Categorised according to the number of uji puparia they contained / *En fonction du nombre de pupariums uji présents.*

b. Proportional average values / *Valeurs moyennes proportionnelles.*

Table III. Comparison of cocoon characters of normal (uninfested) and uji infested tasar cocoons (1986 September-October, commercial crop).

Tableau III. Comparaison entre les caractères des cocons tasars sains (non infestés) et infestés par la mouche uji (septembre-octobre 1986, culture commerciale).

	Cocoon size		Cocoon weight (with peduncle) <i>Poids du cocon (avec pédoncule)</i>	Shell weight		Host weight <i>Poids de l'hôte</i>
	Length	Circumference		with peduncle	without peduncle	
	<i>Taille du cocon</i>			<i>Poids de la coque</i>		
	<i>Longueur</i>	<i>Circonférence</i>		<i>avec pédoncule</i>	<i>sans pédoncule</i>	
	(cm)	(cm)	(g)	(g)	(g)	(g)
Normal cocoons / <i>Cocons sains</i> (n ₁ = 44)						
Mean	4.77	9.44	9.19	1.26	1.13	7.64
<i>Moyenne</i>	(4.1-5.5)	(8.1-10.7)	(6.02-11.83)	(0.82-1.66)	(0.73-1.73)	(5.11-9.98)
S.D. / <i>Ecart type</i>	0.47	0.61	1.46	0.26	0.23	1.74
C.V. %	9.79	6.45	15.92	20.06	19.93	22.71
Infested cocoons / <i>Cocons infestés</i> (n ₂ = 32)						
Mean	4.61	8.68	2.17	0.77	0.65	1.30
<i>Moyenne</i>	(4.2-5.3)	(8.0-10.2)	(1.44-3.16)	(0.44-1.58)	(0.39-0.82)	(0.84-2.58)
S.D. / <i>Ecart type</i>	0.23	0.50	0.42	0.20	0.13	0.39
C.V. %	5.09	5.76	19.27	25.81	19.67	29.86
Z value ⁺ / <i>Valeur Z⁺</i>	2.03*	5.98**	30.16**	9.76**	11.75**	23.43**

+ Z test (Standard Normal Variable - Larger sample) / *Test Z (Variable normale type - Echantillon le plus grand)*.

Z value > 1.96 - significant at 5 % level / *Valeur Z > 1,96 - significatif au seuil de 5 %*.

> 2.58 - significant at 1 % level / *> 2,58 - significatif au seuil de 1 %*.

* Significant at 5 % level / *Significatif au seuil de 5 %*.

** Significant at 1 % level / *Significatif au seuil de 1 %*.

Table IV. Correlation between the parasitoid density and the economic cocoon characters of uji infested tasar cocoons (based on the data from Table II).

Tableau IV. Corrélation entre la densité du parasitoïde et les caractères économiques des cocons tasars infestés par la mouche uji (établie à partir des données du tableau II).

	Cocoon size		Cocoon weight (with peduncle) <i>Poids du cocon (avec pédoncule)</i>	Shell weight		Host weight <i>Poids de l'hôte</i>
	Length	Circumference		with peduncle	without peduncle	
	<i>Taille du cocon</i>			<i>Poids de la coque</i>		
	<i>Longueur</i>	<i>Circonférence</i>		<i>avec pédoncule</i>	<i>sans pédoncule</i>	
	(cm)	(cm)	(g)	(g)	(g)	(g)
Correlation coefficient <i>Coefficient de corrélation</i>	-0.1254	-0.0575	-0.4679**	+0.0223	+0.0273	-0.5657**

** Significant at 1 % level / *Significatif au seuil de 1 %.*

Fig. 1 : Uji pierced tasar cocoons showing the emergence holes of uji maggots..

Fig. 1 : Cocons tasars percés par la mouche uji laissant apparaître les orifices de sortie des asticots.

Fig. 2 : Dead tasar prepupa with uji emergence holes.

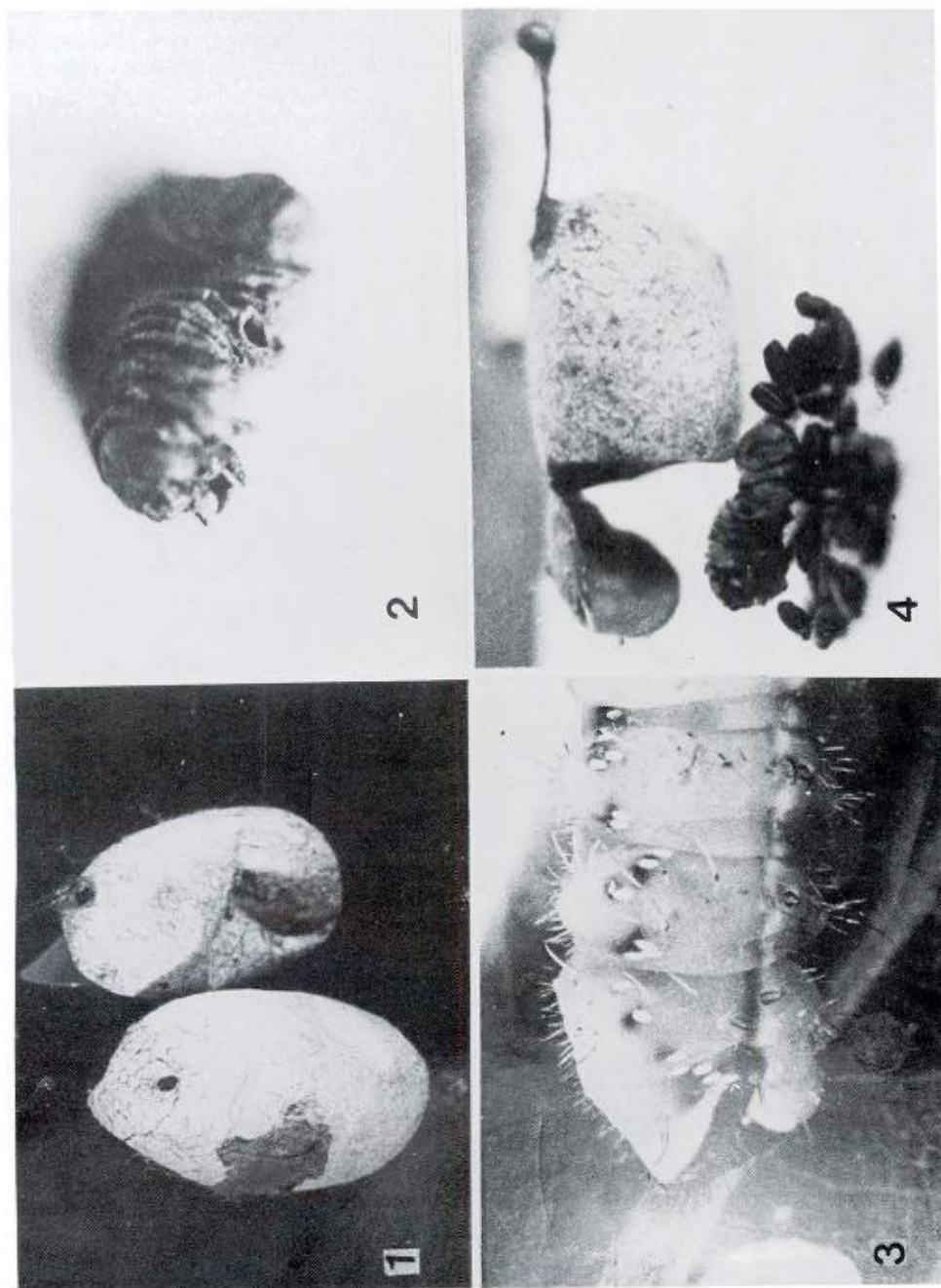
Fig. 2 : Prépupe tasar morte montrant des orifices de sortie de la mouche uji.

Fig. 3 : Uji superparasitized fifth instar tasar silkworm showing uji eggs on the body.

Fig. 3 : Larve tasar du cinquième âge superparasitée sur laquelle on peut voir les oeufs uji.

Fig. 4 : Cut open tasar cocoon showing trapped uji puparia and the dead host.

Fig. 4 : Cocon tasar ouvert laissant apparaître les pupariums uji piégés et l'hôte mort.



has been completed before the additional stress is exerted on the host and the silk gland and silk-spinning apparatus of the host are not affected by the superparasitization. Moreover, our unpublished observations indicate that the gravid mother uji fly selects a relatively larger, healthier and more vigorous host to deposit a larger number of eggs. Possibly, therefore, no additional loss was incurred in silk production, owing to the superparasitization. Since the cocoon weight consisted of both the shell weight and the weight of the host, the significant decrease in cocoon weight due to superparasitization could have resulted from the significant decrease in the host weight. Thus in the tasar silkworm, *A. paphia*, the peculiar biological and behavioural relationships between the parasitoid and the host might have protected the silk production from further damage due to the superparasitization.

On the whole, the data at hand enable us to conclude as follows. In the nature about 3.6 % of the tasar cocoons may be infested by the tasar uji fly. Although all of these infested cocoons are useless from the grainage point of view, nearly 23.7 % of them are useful, as they are unpierced and hence reelable. Qualitatively, the infested cocoons are small, light, and relatively poor in silk content. Interestingly, however, the silk content may not decrease further, depending on the density of the parasitoids per host cocoon.

REFERENCES

- ALLEE W.C., PARK O., EMERSON A.E., PARK T., SCHMIDT K.P. (1959), Population factors and selected population problems. In Principles of Animal Ecology, 331-391, W.B. Saunders Company, Philadelphia and London.
- ARORA G.S., GUPTA I.J. (1979), Taxonomic studies on some of the Indian non-mulberry silk moths (Lepidoptera : Saturniidae : Saturniinae). Ed. The Director, Zoological Survey of India, Vol. 16 (part 1), 63.
- BARRAS D.J., KISNER R.L., LEWIS W.J., JONES R.L. (1972), Effects of the parasitoid, *Microplitis croceipes* on the haemolymph proteins of the corn earworm, *Heliothis zea*. Comp. Biochem. Physiol., 43B, 941-947.
- BREWER F.D., GLICK B., VINSON S.B. (1973), A comparative study of selected tissues from the parasitoid, *Cardiochiles nigriceps*, its susceptible host *Heliothis virescens* and a resistant host *Heliothis zea* by polyacrylamide gel electrophoresis. Comp. Biochem. Physiol., 46B, 567-574.
- COTES E.C. (1896), Miscellaneous notes. Indian Museum Notes, 3(1), 16-33.
- DAHLMAN D.L. (1970), Trehalose levels in parasitized and non-parasitized tobacco hornworm, *Manduca sexta* larvae. Ann. Ent. Soc. Am., 63, 615-617.
- DAHLMAN D.L., VINSON S.B. (1975), Trehalose and glucose levels in the haemolymph of *Heliothis virescens* parasitized by *Microplitis croceipes* or *Cardiochiles nigriceps*. Comp. Biochem. Physiol., 52B, 465-468.
- DAHLMAN D.L., VINSON S.B. (1980), Glycogen content in *Heliothis virescens* parasitized by *Microplitis croceipes*. Comp. Biochem. Physiol., 66A, 625-630.
- JOLLY M.S., SEN S.K., MAQBOOL A.M. (1974), Tasar Culture. Ambica Publishers, Bombay, India.

EVALUATION DE LA PERTE DES VALEURS ECONOMIQUES DES COCONS DU VER A SOIE TASAR *ANTHRAEA PAPHIA* APRES PARASITISME PAR LA MOUCHE UJI TASAR *BLEPHARIPA ZEBINA* (WALKER)

G. M. PATIL & C. J. SAVANURMATH*

Department of Sericulture, University of Agricultural Sciences, GKVK, Bangalore, 560 065, Inde.

* Department of Zoology, Sericulture Section, Kamatak University, Dharwad 580 003, Inde.

*Le ver à soie tassar *Antheraea paphia* (Linn.), infesté par la mouche uji tassar *Blepharipa zebina* (Walk.) au cours du dernier stade larvaire survit jusqu'à la formation du cocon. Cette étude traite de l'étendue de l'infestation de ce parasite au cours des différents stades de la formation du cocon, la perte des valeurs économiques et la perte relative des caractères individuels du cocon du fait de ce parasitisme. Environ 3,6 % des cocons étaient infestés et près de 76,5 % de ces cocons étaient percés par des asticots uji. En général, le parasitisme réduit considérablement les caractères économiques des cocons.*

Le parasitisme est très courant et l'on constate 3-45 parasites par cocon. De plus ce parasitisme donne une corrélation négative hautement significative avec le poids du cocon et le poids des pré-nymphes hôtes mortes ; il n'y a pas de corrélation négative avec le poids de la coque. De ce fait, la production de soie n'est pas affectée par ce parasitisme. Les causes possibles de cette particularité sont discutées dans cette étude.

INTRODUCTION

La soie tassar occupe la deuxième place de la production mondiale juste derrière la soie mûrier. Néanmoins l'élevage tassar enregistre une perte de 40 à 45 % liée à la présence d'une variété d'ennemis naturels puisque l'élevage est réalisé dans des conditions sauvages et semi-domestiquées. La mouche uji tassar *Blepharipa zebina* (Walker) (Diptera : Tachinidae), principal parasite du ver à soie tassar *Antheraea paphia* (Linn.) (Aurora et Gupta, 1979) cause à lui seul 10 % des dommages (Jolly et coll., 1974). *B. zebina* est généralement un parasite larvaire et parfois un parasite larvo-nymphal. Les vers à soie tassar infestés lors des premiers âges (I-IV) sont tués par les asticots qui s'échappent avant même que l'hôte ne file son cocon. Il est intéressant de noter que les vers infestés au dernier stade sont tués lorsqu'ils atteignent le stade pré-chrysalide mais après avoir filé leur cocon. Les asticots sortant de la chrysalide percent parfois le cocon mou pour puper sur le sol ou peuvent être piégés dans le cocon. Ceci endommage les cocons. Actuellement, il n'existe aucune information critique sur l'étendue des dommages provoqués par ce parasite au cours du stade nymphal, ni sur la perte des valeurs économiques résultant de la perte qualitative et quantitative dans les caractères des cocons à la suite de l'infection. De plus, ce parasitisme est très courant chez le ver à soie tassar. Cotes (1986) signale qu'il y a en moyenne 15 asticots *B. zebina* par ver tassar, alors que nos précédentes études ont constaté la présence de 1-52 parasites par cocon hôte (Patil et Savanurmah, sous presse). La connaissance de l'impact de ce parasitisme sur les caractères du cocon constitue une part importante pour la pratique de l'élevage tassar. C'est pour cela que nous avons réalisé cette étude.

MATERIELS ET METHODES

Ces expériences ont été effectuées sur des cocons provenant de la récolte de septembre-octobre 1986 de *A. paphia*, élevés sur *Terminalia* au Basic Tasar Seed Farm (Khanapur, Karnataka, Inde). Près de 2 340 cocons ont été observés pour étudier la nature et l'étendue de l'infestation uji sur la récolte. Ces cocons ont été pris au hasard dans 17 groupes en attente d'émergence pour le grainage. Les cocons infestés ont été prélevés et classés dans 32 groupes en fonction du nombre de pupes uji. Les caractères des cocons tels que la longueur, la circonférence, le poids, le poids de la coque (avec et sans pédoncule) et le poids des hôtes morts ont été mesurés. Pour permettre la comparaison, 44 cocons vivants non infestés ont également été examinés. Les valeurs moyennes proportionnelles des cocons infestés ou non ont été statistiquement comparées (test Z ; Variable normale standard, échantillon le plus grand). De plus, la corrélation entre le nombre de pupes uji par cocon hôte et les caractères du cocon des divers groupes infestés ont également été calculés.

RESULTATS ET DISCUSSION

Ampleur de l'infestation :

Sur les 2 340 cocons, seulement 85 sont infestés par *B. zebina*, l'infestation au cours de la formation du cocon représentant 3,63 % (Table I). Parmi ces cocons infestés, 76,47 % d'entre eux sont percés par la larve uji (figure 1), et 23,73 % sont intacts. Ces derniers peuvent être dévidés et donc utilisés à des fins commerciales. Mais en ce qui concerne la production d'oeufs, les cocons infestés, percés ou non, sont impropres puisque l'hôte est déjà mort à l'intérieur du cocon (Figure 2). Bien que les cocons aient été percés, la majorité des larves se sont transformées en chrysalides à l'intérieur du cocon. En ouvrant un cocon non percé, on constate que les mouches uji de taille normale n'ayant aucune malformation, sont prises au piège et sont mortes dans les cocons. Néanmoins, dans la majorité des cocons percés, on ne trouve que la chrysalide vide, la mouche uji adulte s'étant échappée.

Comparaison entre les cocons infestés et les cocons normaux :

Le tableau II donne les caractères des cocons des 32 catégories de cocons infestés par les larves uji, groupés en fonction du nombre de chrysalides uji. Les valeurs moyennes des paramètres sont la longueur du cocon $4,60 \pm 0,234$ cm, la circonférence du cocon $8,67 \pm 0,500$ cm, le poids du cocon $2,17372 \pm 0,41878$ g, le poids de la coque avec le pédoncule $0,76799 \pm 0,19818$ g, le poids de la coque sans pédoncule $0,65207 \pm 0,12826$ g et le poids des hôtes morts $1,302889 \pm 0,38910$ g. Les valeurs moyennes des paramètres pour les cocons normaux non infestés sont données dans le tableau III. Les résultats sont les suivants : $4,77 \pm 0,47$ cm, $9,44 \pm 0,61$ cm, $9,19 \pm 1,46$ g, $1,26 \pm 0,26$ g, $1,13 \pm 0,23$ g, et $7,64 \pm 1,74$ g. Les comparaisons statistiques des données montrent que le parasitisme du ver à soie tasar réduit de façon significative les valeurs économiques des cocons tasar (tableau III). Alors que la circonférence, le poids du cocon, le poids de la coque avec ou sans pédoncule et le poids de l'hôte laissent apparaître une réduction très élevée, la longueur du cocon décroît de manière significative. Puisque les parasites utilisent des quantités importantes de protéines de l'hémolymphe provenant de l'hôte (Barras et coll., 1972) et s'interposent dans la synthèse normale des protéines (Dahlman et Vinson, 1975), il est possible que les caractères du cocon et l'efficacité de la production de soie des hôtes infestés se trouvent réduites. De plus, quelques glycogènes de l'hôte ont été utilisés par le parasitoïde pour son développement (Dahlman et Vinson, 1980), affaiblissant les larves malades.

Effet du super-parasitisme :

Le super-parasitisme est très courant chez *A. paphia* (Figure 3). Dans le matériel-test utilisé, le nombre de pupes uji par cocon (Fig. 4) prélevés dans divers groupes varie de 3 à 45. Si un hôte contient 2 parasites ou plus, il est considéré comme super-infesté (Allee et coll., 1959). Les caractères du cocon par rapport à la densité des parasites par cocon hôte sont donnés dans le tableau II. La corrélation statistique entre le nombre de pupes uji par hôte et les caractères économiques du cocon du ver à soie tasar est présentée dans le tableau IV. Il est évident que le poids du cocon et le poids des hôtes morts

traduisent une corrélation négative élevée due au nombre croissant d'uji par hôte. Il est possible que ce super-parasitisme provoque un stress supplémentaire sur l'hôte et tend à réduire sur une plus grande étendue la disponibilité des métabolites plus que ne le ferait un parasite solitaire (Dalhman, 1970 ; Brewer et coll., 1973). Bien que la longueur du cocon et sa circonférence diminuent avec l'augmentation du nombre de parasites, la corrélation n'est pas significative. Mais il est intéressant de constater que le poids de la coque montre une corrélation positive bien que non significative. Ceci signifie que la production de soie n'est pas affectée de façon défavorable par le super-parasitisme. Ceci survient lorsque la synthèse de la soie a lieu avant le stress supplémentaire de l'hôte, la glande séricigène et l'appareil de filage de l'hôte n'étant pas affectés par le super parasitisme. De plus, nos observations, non publiées, indiquent que la mouche uji mère gravide choisit l'hôte le plus grand, le plus sain et le plus vigoureux pour déposer un nombre plus important d'oeufs. Il se peut donc qu'il n'y ait pas de risque de perte dans la production de soie par parasitisme ; si le poids du cocon correspond au poids de la coque et au poids de l'hôte, la baisse significative du poids du cocon due au parasitisme résulte de la baisse significative du poids de l'hôte. De ce fait, chez le ver à soie tassar *A. paphia*, une relation biologique et comportementale particulière entre le parasitoïde et l'hôte protège la production de soie contre les dommages provoqués par le super-parasitisme.

Ces données nous permettent d'établir les résultats suivants : à l'état sauvage, environ 3,6 % des cocons tassar sont infestés par la mouche uji. Bien que ces cocons infestés soient impropres pour le grainage, environ 23,7 % sont utilisables puisqu'ils ne sont pas percés et sont donc dévidables. D'un point de vue qualitatif, les cocons infestés sont petits, légers et relativement pauvres en soie. Néanmoins, la production de soie ne diminue pas davantage en fonction de la densité des parasites par cocon hôte.

RELATIVE CONTACT TOXICITY OF SOME INSECTICIDES TO THE WINGLESS GRASSHOPPER, *NEORTHACRIS* *ACUTICEPS NILGIRIENSIS* (ORTHOPTERA : ACRIDIDAE) AND THEIR PERSISTANCE TOXICITY AGAINST LARVAE OF SILKWORM ON MULBERRY

P.P. SHARMA*

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

The relative toxicity of some insecticides, viz. Nuvan, Dimecron, Rogor, in comparison with BHC was evaluated in laboratory against wingless grasshoppers (Neorthacris acuticeps nilgiriensis Uvarov). These insecticides were tested at different concentrations in glass beakers and mortality data collected were subjected to probit analysis to observe the LC 50 values. On the basis of the LC 50 values, the relative toxicity of these insecticides was calculated. The result shows that Nuvan is 12.20 times as toxic as BHC to wingless grasshoppers. The order of toxicity is Nuvan > BHC > Dimecron > Rogor.

Nuvan-sprayed mulberry leaves can be used for silkworm rearing after 3 days while in the case of other insecticides, leaves can be utilized after 10 days of the spray.

Keywords : Insecticide, toxicity, grasshopper, silkworm, dimethyl dichlorovinyl phosphate, dimethoate, benzene hexachloride, phosphamidon.

INTRODUCTION

Short horn wingless grasshoppers are known to cause appreciable damage to millet, sorghum, rice and cotton in rainfed areas of Karnataka and Maharashtra in India (Nayar *et al.*, 1976). *Neorthacris acuticeps nilgiriensis* Uvarov, a wingless grasshopper has been reported as a serious pest of mulberry in rainfed areas of Karnataka (Kariappa and Narasimhanna, 1981). Sericulture is an agro-based industry and mulberry is the only food material for rearing of silkworm, *Bombyx mori* L. Therefore, damage caused by insect pests resulting in the loss of both quality and quantity of mulberry leaves and finally it leads to a heavy loss to silk industry.

The use of insecticides has become an indispensable and permanent tool for modern strategy of crop protection. But there are no such insecticides which may only kill the insect pests and at the same time are safe to silkworms. However, some insecticides i.e. BHC, Rogor, Nuvan (DDVP), Dimecron are in practice to control the various insect pests of mulberry. Therefore, the relative contact toxicity of the above said insecticides against wingless grasshoppers, *Neorthacris acuticeps nilgiriensis* and their persistence toxicity to the larvae of the silkworm, *Bombyx mori*, were studied.

* Present address : Scientific Officer-I, Karnataka State Sericulture Development Institute, Sub-Station, Kadaganchi, Gulbarga, India.

MATERIALS AND METHODS

Adults of *Neorthacris acuticeps nilgiriensis* were collected from the infested mulberry gardens of Mugur taluka of Mysore district. Different concentrations of selected insecticides, i.e. Nuvan (dimethyl dichlorovinyl phosphate 76 % W/W), BHC (benzene hexachloride 50 % wettable powder), Dimecron (phosphamidon 85 % M/M) and Rogor (dimethoate 30 % W/W) were considered for experimentation. All the insecticides were tested in the form of contact. The concentrations of insecticides were prepared on the basis of active ingredients in water. 250 ml capacity glass beakers (6.5 cm diameter) were used for the treatment. 0.3 ml of desired concentration of insecticides was sprayed on the filter paper and ten insects were released on the filter paper of each beaker. To prevent the escape of insects, the beakers were covered with muslin cloth held in position by rubber bands.

Five replications, each of ten insects were considered for all the concentrations and a similar set of control was maintained without any treatment. Mortality counts were recorded 24 and 48 hours after the transfer of insects in the beakers. Moribund insects were counted as dead and mortality data are presented in table I. The data thus obtained were subjected to probit analysis according to Finney (1952). The relative toxicity was compared by the toxicity index method used by Sun (1950) assuming toxicity of BHC as one.

For the assessment of the residual toxicity of insecticides to the silkworms, median lethal concentration (LC 50) of each insecticide was sprayed on mulberry plants at the rate of 500 litre solution per acre in the demarcated plots having mulberry plantation of 3 to 4 feet height. Mulberry leaves of equal size were picked up at random from the sprayed as well as unsprayed (control) mulberry plants and brought to the rearing house at specified intervals of 1, 3, 5, 7 and 10 days of spray. To carry out a bioassay test (Kuwana *et al.*, 1961 ; Alves *et al.*, 1965), 3 replications each of 200 silkworms were considered and the leaves treated were provided for one day (4 successive feedings) to I, III and V stage larvae of silkworms followed by normal feedings. Mortality was recorded after 24 hours of treated feeding. A control feeding (unsprayed leaves) set was also maintained to compare the mortality data with the treated batches. To ensure the availability of the required stage larvae of silkworm, two disease-free layings were brushed daily and accordingly spray of insecticides was done in the mulberry fields.

RESULTS AND DISCUSSION

Insecticides tested for control of the *Neorthacris acuticeps nilgiriensis* in this experiment were found to be significantly effective over the control (Table I). Nuvan (0.0007 %) and BHC (0.05 %) proved more toxic and gave 82 and 78 % mortality respectively as compared to 0 % mortality in the control. The order of toxicity is Nuvan > BHC > Dimecron > Rogor. The toxic effect of BHC lasted up to 48 hours of treatment and mortality per cent increased up to 82 while in the case of Nuvan mortality remained unchanged.

The regression equation, LC 50 values, fiducial limits and relative toxicity were calculated and are given in table II. It is evident from this table that, on the basis of the toxicity index and LC 50 values, the most effective insecticide was Nuvan followed by BHC, Dimecron and Rogor. The relative toxicity of Nuvan is 12.20 times as high as BHC while Dimecron and Rogor are relatively less toxic as compared to BHC.

The persistence toxicity of these insecticides on the mulberry leaves was recorded by bioassay test (table III). The data reveal that young worms are more susceptible as compared to late instar worms. The toxicity of Nuvan remains only one day and leaves can be utilized for silkworm rearing from the 3rd day of the spray. While in the case of BHC, Dimecron and Rogor, toxicity remains on the leaves more than 7 days, therefore such leaves can be fed to silkworms after 10 days of spray. Hence, Nuvan stands comparatively better than the other 3 insecticides and is also safer, because of the short safe period, for silkworm rearing.

Table I. Contact toxicity of insecticides to the wingless grasshoppers.

Tableau I. Toxicité par contact de certains insecticides sur les sauterelles aptères.

Insecticides used	Concentration (%)	Average mortality per cent in	
		24 hrs	48 hrs
<i>Insecticides utilisés</i>	<i>Concentration (%)</i>	<i>Pourcentage de mortalité moyenne en</i>	
		<i>24 heures</i>	<i>48 heures</i>
BHC	0.01	40	48
	0.025	52	60
	0.05	78	82
Nuvan	0.0003	44	44
	0.0005	66	68
	0.0007	82	82
Dimecron	0.25	10	32
	0.50	46	56
	1.00	64	72
Rogor	0.5	18	40
	0.7	20	40
	0.9	44	46
Control / Témoin	-	0	0

Table II. Relative toxicity of different insecticides to wingless grasshoppers.

Tableau II. Toxicité relative des différents insecticides sur les sauterelles aptères.

Insecticide	Heterogeny <i>Hétérogénie</i>	Regression equation <i>Equation de régression</i>	LC 50 <i>LC 50</i>	Fiducial limit <i>Limite de confiance</i>	Relative toxicity <i>Toxicité relative</i>
BHC	X2(1) = 3.10	Y = 3.24 + 1.42 X	0.0275	0.0155 0.0455	1.00
Nuvan	X2(1) = 3.75	Y = 2.87 + 0.62 X	0.0006	0.0001 0.00067	12.20
Dimecron	X2(1) = 3.16	Y = 2.73 + 0.02 X	0.3126	0.2315 0.5067	0.89
Rogor	X2(1) = 3.10	Y = 2.88 + 0.91 X	0.7103	0.5413 0.8856	0.84

Table III. Effect of insecticides (LC 50) on silkworm larvae by feeding of mulberry leaves of different duration of spray.

Tableau III. Effet des insecticides (LC 50) sur les larves de ver à soie par ingestion après différentes durées de vaporisation.

Insecticide used	Larval stage of silkworms used	Per cent mortality of silkworm larvae in 24 hours by feeding on following days of insecticide-sprayed mulberry leaves (days)				
<i>Insecticide utilisé</i>	<i>Age larvaire</i>	<i>Pourcentage de mortalité des larves en 24 heures par nourrissage en fonction des jours suivant la vaporisation d'insecticide sur les feuilles (en jours)</i>				
		1	3	5	7	10
BHC	I	66	58	20	9	0
	III	42	36	16	5	0
	V	32	22	11	2	0
Nuvan	I	12	0	0	0	0
	III	6	0	0	0	0
	V	2	0	0	0	0
Dimecron	I	46	21	12	5	0
	III	32	15	5	3	0
	V	26	9	3	0	0
Rogor	I	34	21	8	3	0
	III	25	15	6	1	0
	V	17	9	0	0	0
Control <i>Témoin</i>	I	0	0	0	0	0
	III	0	0	0	0	0
	V	0	0	0	0	0

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks are due to Mrs. Kshama Giridhar, S.R.O., Statistics Section, C.S.R & T.I., Mysore, for statistical analysis of the data.

REFERENCES

- ALVES, BONILHA N., CARDIM A.O., DIAS N.N., ABRAMIDES E. (1965), Residual toxic effect of pesticides applied to mulberry leaves intended as food for silkworms. *Biologica*, 13, 290-293.
- FINNEY D.J. (1952), *Probit Analysis*. Cambridge, 318 pp.
- KARIAPPA B.K., NARASIMHANNA M.N. (1981), Efficacy of insecticides against wingless grasshopper, *Neorthacris acuticeps nilgiriensis* U., infesting mulberry and the effect of feeding BHC sprayed leaves on silkworm, *Bombyx mori* L. *Ind. J. Seri.*, 20, 31-34.
- KUWANA Z., GOROI., TAKASI E., Yukio T. (1968), Effect of insecticides on the silkworm larvae by means of body spraying and feeding with sprayed leaves. *Bull. Sericul. Exp. Sta., Suginami-Ku, Tokyo*, 22, 500-514.
- NAYAR K.K., ANATHA KRISHNAN T.N., DAVID D.V. (1976), *General and applied entomology*. Tata McGraw-Hill Pub. Co. Ltd., New Delhi, India, 146 pp.
- SUN Y.P. (1950), Toxicity index - an improvement method of comparing the relative toxicity of insecticides. *J. Econ. Ent.*, 43, 45-53.

TOXICITE RELATIVE DE CONTACT DE CERTAINS INSECTICIDES POUR LA SAUTERELLE APTERE, *NEORTHACRIS ACUTICEPS NILGIRIENSIS* (ORTHOPTERA : ACRIDIDAE) ET SA PERSISTANCE POUR LES LARVES DU VER A SOIE DU MURIER

P.P. SHARMA*

Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, Inde.

*La toxicité relative de certains insecticides tels que le Nuvan, le Dimecron, le Rogor a été comparée en laboratoire avec celle du BHC, sur la sauterelle aptère (*Neorthacris acuticeps nilgiriensis* Uvarov). Ces insecticides ont été testés à différentes concentrations dans des bechers en verre et les données de mortalité recueillies ont été analysées pour déterminer les valeurs de la LC 50. La toxicité relative de ces insecticides a été calculée en fonction des valeurs de la LC 50. Les résultats démontrent que le Nuvan est 12,20 fois plus toxique que le BHC pour la sauterelle aptère. L'ordre décroissant de toxicité est Nuvan > BHC > Dimecron > Rogor.*

Les feuilles de mûrier vaporisées au Nuvan peuvent être utilisées pour les élevages de vers à soie après 3 jours, tandis que la vaporisation avec d'autres insecticides ne permet l'utilisation des feuilles qu'après 10 jours.

INTRODUCTION

On sait que la sauterelle aptère à corne courte est la cause de dommages importants sur le millet, le sorgho, le riz et le coton, dans les régions non irriguées du Karnataka et du Maharashtra en Inde (Nayar et coll., 1976). On a observé que *Neorthacris acuticeps nilgiriensis* Uvarov, une sauterelle aptère, est un insecte nuisible important du mûrier dans les régions non irriguées du Karnataka (Kariappa et Narasimhanna, 1981). La sériciculture est une industrie agricole et le mûrier est la seule source de nourriture du ver à soie, *Bombyx mori* L.

Les dommages causés par les insectes nuisibles ont donc pour conséquence une perte en qualité et en quantité de feuilles de mûrier et conduisent en dernier lieu à une perte importante pour l'industrie de la soie.

Les insecticides sont devenus un outil permanent et indispensable à une politique moderne de protection des récoltes. Mais il n'existe pas d'insecticides qui soient efficaces pour lutter contre les insectes nuisibles et qui préservent également le ver à soie. Cependant, certains insecticides tels que le BHC, le Rogor, le Nuvan (DDVP), le Dimecron permettent, dans la pratique, de lutter efficacement contre les divers insectes nuisibles du mûrier. La toxicité relative de contact de ces insecticides sur la sauterelle aptère, *Neorthacris acuticeps nilgiriensis* et la persistance de leur toxicité sur les larves du ver à soie, *Bombyx mori* L. ont donc été étudiées.

*Adresse actuelle : Scientific Officer-I, K.S.S.D.I. Sub-Station, Kadaganchi, Gulbarga, Inde.

MATERIELS ET METHODES

Des populations adultes de *Neorthacris acuticeps nilgiriensis* sont prélevées dans les mûraies infestées de Mugur taluka de la région de Mysore. Différentes concentrations des insecticides sélectionnés, à savoir le Nuvan (diméthyl dichlorovinyl phosphate 76 % P/P), le BHC (hexachlorure de benzène 50 % en poudre), le Dimecron (phosphamidon 85 % M/M) et le Rogor (diméthoate 30 % P/P) sont retenus pour cette expérimentation. Tous ces insecticides sont testés par contact. Les concentrations sont préparées à partir d'éléments actifs dans l'eau. Pour cette expérience, on utilise des bechers en verre ayant une capacité de 250 ml (6,5 cm de diamètre). 0,3 ml de la concentration voulue d'insecticide sont vaporisées sur un filtre en papier et 10 insectes sont déposés sur le filtre en papier de chaque becher. Les bechers sont recouverts de mousseline fixée par des élastiques pour retenir les insectes.

On a étudié les effets de toutes les concentrations sur cinq réplicats contenant chacun 10 insectes ; un témoin est mis en place dans des conditions similaires sans aucun traitement. Les taux de mortalité sont relevés 24 et 48 heures après le transfert des insectes dans les bechers, les insectes moribonds étant considérés comme morts. Les taux de mortalité sont présentés dans le tableau I. Les données ainsi obtenues sont traitées selon la méthode de Finney (1952). La toxicité relative est comparée avec l'indice de toxicité de Sun (1950) en admettant la toxicité du BHC comme toxicité de référence 1.

Pour l'évaluation de l'effet de la toxicité résiduelle des insecticides sur les vers à soie, la concentration létale médiane (LC 50) de chaque insecticide est vaporisée sur des plants de mûriers à raison de 500 litres de solution par demi-hectare, dans des carrés délimités composés de mûriers atteignant 3 et 4 pieds de hauteur. Des feuilles de mûrier de tailles équivalentes sont cueillies au hasard sur des plants traités ou non (témoins) et déposés sur les litières à intervalles précis de 1, 3, 7 et 10 jours après vaporisation. Afin d'effectuer un test biologique (Kuwana et coll., 1961 ; Alves et coll., 1965), 3 réplicats, contenant 200 vers chacun, sont examinées ; des larves des 1er, 3ème et 5ème âge sont nourries avec des feuilles traitées pendant un jour (4 nourrissements successifs), puis alimentées de façon habituelle. Le taux de mortalité est enregistré après 24 heures de ce traitement. On établit par ailleurs un nourrissement témoin (feuilles non vaporisées) afin de comparer les données concernant la mortalité avec les lots traités. Deux pontes saines sont levées quotidiennement pour pouvoir disposer de larves à l'âge nécessaire à l'expérimentation et l'on vaporise les insecticides sur les champs de mûriers en conséquence.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les insecticides testés pour la lutte contre *Neorthacris acuticeps nilgiriensis* donnent des résultats tout à fait significatifs par rapport aux témoins (tableau I). Le Nuvan (0,0007 %) et le BHC (0,5 %) se révèlent plus toxiques et ont pour résultats respectifs 82 % et 78 % de mortalité, comparé à 0 % de mortalité chez les témoins. L'ordre de toxicité est Nuvan BHC Dimecron Rogor. La durée de l'effet toxique du BHC est de 48 heures après le traitement et le taux de mortalité augmente jusqu'à 82 % tandis qu'avec le Nuvan, le taux de mortalité reste inchangé.

L'équation de régression, les valeurs de la LC 50, les intervalles de confiance et la toxicité relative ont été calculées et sont présentées dans le tableau II. Ce dernier met en évidence que, d'après l'indice de toxicité et les valeurs de la LC 50, l'insecticide le plus efficace est le Nuvan suivi du BHC, du Dimecron et du Rogor. La toxicité relative du Nuvan est 12,20 fois supérieure à celle du BHC, tandis que celles du Dimecron et du Rogor sont relativement plus faibles que celle du BHC.

La persistance de la toxicité de ces insecticides sur les feuilles du mûrier a été enregistrée par l'intermédiaire de tests biologiques (tableau III). Les données révèlent que les jeunes larves sont plus sensibles que les sujets de stade larvaire plus avancé. La toxicité du Nuvan demeure un jour seulement, les feuilles pouvant être utilisées pour l'élevage 3 jours après vaporisation. Tandis que la toxicité du BHC, du Dimecron et du Rogor demeure dans les feuilles pendant plus de 7 jours ; ces feuilles ne peuvent donc être utilisées qu'après 10 jours de vaporisation. Par conséquent, le Nuvan est mieux supporté comparativement aux trois autres insecticides et est également plus sûr pour l'élevage de vers à soie, compte tenu d'une courte période d'attente pour son utilisation après vaporisation.

INCIDENCE OF FUNGAL DISEASES OF MULBERRY UNDER DIFFERENT AGRONOMICAL PRACTICES

GOVINDAIAH, D.D. SHARMA, P.C. CHOUDHURY, B. MALLIKARJUNA & Y.R. MADHAVA RAO

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

*The incidence of three major fungal diseases viz., leaf spot, powdery mildew and leaf rust under natural condition was studied during 1985-86 at Central Sericultural Research and Training Institute (Mysore, Karanataka State, India) with Kanva-2 variety of mulberry (*Morus alba* L.) under different agronomical practices like spacing, crown height and harvesting methods. The disease incidence and intensity were found significantly higher in closer spacing (60 cm × 30 cm) compared to wider spacing (120 cm × 75 cm) in all the diseases studied. There was no significant effect of different crown heights and methods of harvesting on disease incidence. However, the disease incidence was comparatively lower in higher crown height (40 cm above the ground level).*

Keywords : Agronomical practices, leaf spot, powdery mildew, leaf rust, incidence, spacing, crown height, harvest method.

INTRODUCTION

Mulberry (*Morus alba* L.) is affected by several diseases caused by fungi, bacteria, viruses and nematodes. Three major diseases like leaf spot (*Cercospora moricola* Cooke), powdery mildew (*Phyllactinia corylea* (Pers) Kars) and leaf rust (*Cerotelium fici* (Cast) Arth) cause considerable crop losses in mulberry. The incidence of these diseases depends upon many factors like season, temperature, humidity and mulberry varieties (Krishna Prasad and Siddaramaiah, 1979 ; Sikdar and Krishnaswamy, 1980 ; Sukumar and Ramalingam, 1986). Some agronomical practices like plant spacing, nitrogen application, irrigation, etc. were reported to influence the occurrence of the diseases in other crops like rice and uradbean (Seshagiri Rao and Devadath, 1978 ; Sud and Singh, 1984 ; Singh and Sengupta, 1985 ; Devadath *et al.*, 1987). The present paper deals with the incidence of leaf spot, powdery mildew and leaf rust diseases in mulberry under different agronomical practices like spacings, crown heights and harvesting methods.

MATERIALS AND METHODS

A field experiment was conducted during 1985-86 at Central Sericultural Research and Training Institute (Mysore, Karnataka State, India) with Kanva-2 variety of mulberry (*Morus alba* L.) in asymmetrical design. The experimental plantation was taken up with three-month-old mulberry saplings. The effect of five spacings viz., S₁ = 60 cm × 30 cm ; S₂ = 60 cm × 60 cm ; S₃ = 90 cm × 60 cm ; S₄ = 120 cm × 60 cm and S₅ = 120 cm × 75 cm and three crown heights namely, C₁ = 15 cm ; C₂ = 30 cm and C₃ = 40 cm above the ground along with two methods of shoot harvest like H₁ = whole shoot harvest i.e., plants pruned repeatedly at a particular crown height (either at 15 cm, 30 cm or 40 cm) and H₂ = step down shoot harvest i.e., shoots were pruned step by step downwards at the height of 50-60 cm, 40-50 cm, 30-40 cm, 20-30 cm and 10 cm above the ground

(retaining 10-12, 8-10, 6-8, 4-6 and 2-3 buds) above the plant crown for the 1st, 2nd, 3rd, 4th and 5th crops respectively (Fig. 1 and 2) were studied on the incidence of different diseases like leaf spot, powdery mildew and leaf rust. The total number of treatments were replicated twice. The total number of plants in each treatment varied depending on the spacing. The number of plants in each treatment were 134, 96, 48 and 40 in S₁, S₂, S₃, S₄ and S₅ spacings respectively. The other agronomical practices like digging, irrigation and fertilizer application were followed as per the recommended package of practices in all the treatments. The disease incidence was recorded under natural conditions after 40-45 days of pruning once in winter (Oct.-Feb.), summer (March-June) and rainy (July-September) seasons by randomly selecting five plants in each replication. In each plant the total number of diseased and healthy leaves were recorded in three branches to calculate the percentage of disease incidence following the formula adopted by Mc kinney (1923) in the following five different grades.

I = 1-10 per cent lamina covered by spots/patches

II = 11-25 — Do —

III = 26-50 — Do —

IV = 51-75 — Do —

V = 76-100 — Do —

$$\text{Percentage of disease incidence} = \frac{\text{Sum of numerical values} \times 100}{\text{Total number of leaves observed} \times \text{Maximum grading (5)}}$$

RESULTS AND DISCUSSION

In the present study it was found that the incidence of leaf spot was significantly higher in rainy season (10.87 %) followed by winter (07.49 %) and summer (01.88 %) seasons. Powdery mildew was observed maximum during winter (25.70 %) followed by rainy (11.63 %) and summer (07.96 %) seasons. Leaf rust was not observed in rainy season while maximum incidence was observed in winter (26.29 %) followed by summer (21.64 %) season (Table I). These results are in conformity with the findings of Siddaramaiah *et al.* (1978), Krishna Prasada and Siddaramaiah (1979) and Anonymous (1986-87).

Table I. Percentage of disease incidence in different seasons.

Tableau I. Pourcentage d'incidence des maladies à différentes saisons.

Season Saison	Leaf spot (%) Maladie de la tache (%)	Powdery mildew (%) Oïdium (%)	Leaf rust (%) Rouille des feuilles (%)
Rainy / Saison pluvieuse	10.87	11.63	Nil / Néant
Winter / Hiver	7.49	25.70	26.29
Summer / Été	1.88	7.96	21.64
SE	0.093	0.816	1.31
CD at 5 %	2.71	2.36	3.97

SE = Standard error / Ecart type.

CD = Critical difference.

Table II. Percentage of disease incidence under different spacings.

Tableau II. Pourcentage d'incidence des maladies en fonction des différents espacements.

Spacing (cm) <i>Espacement (cm)</i>	Leaf spot (%) <i>Maladie de la tache (%)</i>	Powdery mildew (%) <i>Oidium (%)</i>	Leaf rust (%) <i>Rouille des feuilles (%)</i>
S ₁ (60 × 30)	13.05	23.46	33.14
S ₂ (60 × 60)	10.02	17.18	25.84
S ₃ (90 × 60)	5.58	13.55	21.91
S ₄ (120 × 60)	3.58	11.16	20.05
S ₅ (120 × 75)	1.50	10.13	18.88
SE	1.21	1.05	1.30
CD at 5 %	3.50	3.04	3.97

SE = Standard error / *Ecart type*.

CD = Critical difference.

S = Spacing / *Espacement*.

Table III. Percentage of disease incidence under different crown heights.

Tableau III. Pourcentage d'incidence des maladies suivant différentes hauteurs de couronne des branches.

Crown height <i>Hauteur de la couronne (cm)</i>	Leaf spot (%) <i>Maladie de la tache (%)</i>	Powdery mildew (%) <i>Oidium (%)</i>	Leaf rust (%) <i>Rouille des feuilles (%)</i>
C ₁ (15 cm)	7.64	16.37	25.22
C ₂ (30 cm)	6.90	15.03	23.63
C ₃ (40 cm)	5.70	13.88	23.05
(Above the ground) <i>(Au-dessus du sol)</i>			
'F' test / <i>Test "F"</i>	NS	NS	NS
SE	1.32	1.15	1.43

'F' test : variance ratio / *Test "F" : taux de variance*.

C : Crown height / *Hauteur de la couronne*.

SE : Standard error / *Ecart type*.

NS : Non significant / *Non significatif*.

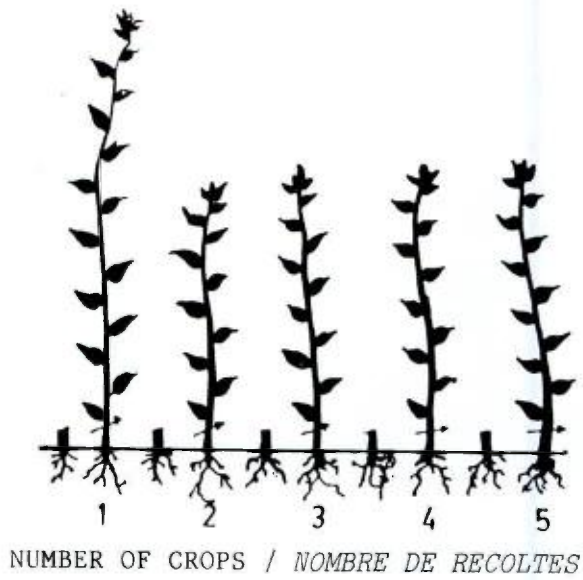


Fig. 1 : Showing whole-shoot harvest (H_1).

Fig. 1 : Récolte de la tige entière (H_1).

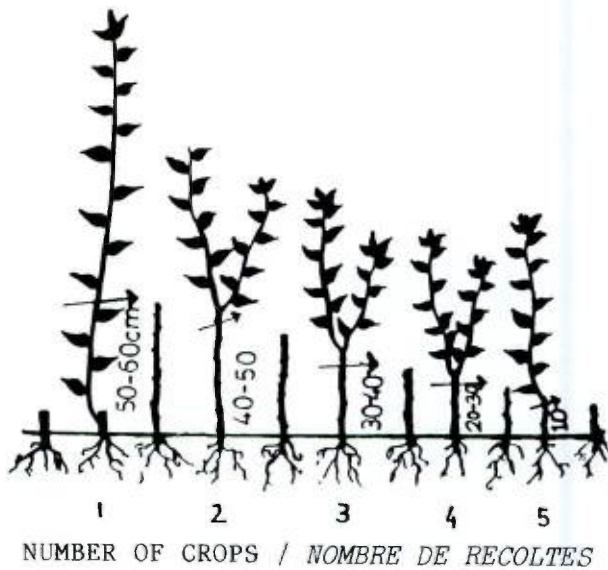


Fig. 2 : Showing stepdown-shoot harvest (H_2).

Fig. 2 : Récolte des pousses secondaires (H_2).

(a) Effect of spacing :

There was a significant difference in the incidence of three diseases under the different spacings studied. Disease incidence was found higher in closer spacing (60 cm × 30 cm) compared to wider spacing (120 cm × 75 cm). While no significant difference was observed in the incidence of leaf spot and powdery mildew between S₃ and S₄ and S₄ and S₅ spacings, the incidence of leaf rust was statistically not significant between S₂ and S₃ and S₃ and S₅ spacings (Table II). The higher incidence of diseases under close spacing may be attributed to a favourable microclimate available for multiplication and spread of infection. Berger (1965) and Sud & Singh (1984) also observed that the disease intensity and incidence were higher in closer spacing compared to wider spacing.

Table IV. Percentage of disease incidence under different harvesting methods.

Tableau IV. Pourcentage d'incidence des maladies suivant différentes méthodes de récolte.

Harvesting method <i>Méthode de récolte</i>	Leaf spot (%) <i>Maladie de la tache (%)</i>	Powdery mildew (%) <i>Oidium (%)</i>	Leaf rust (%) <i>Rouille des feuilles (%)</i>
H ₁ = Whole shoot harvest <i>H₁ = Récolte de la tige entière</i>	6.85	15.30	23.82
H ₂ = Step-down shoot harvest <i>H₂ = Récolte des pousses secondaires</i>	6.64	14.89	24.11
'F' test / Test "F"	NS	NS	NS
SE	0.21	0.66	0.42

'F' test : Variance ratio / *Taux de variance.*

SE : Standard error / *Ecart type.*

H : Harvesting method / *Méthode de récolte.*
significatif.

NS : Non significant / *Non*

(b) Effect of crown height and shoot harvest :

There was no significant difference in the disease incidence between the different crown heights of the plants (Table III). This may be due to the fact that all the three diseases studied are mostly air-borne in nature and spread by wind currents and rain splashes. Hence the height of the bush from the ground level has no effect on the disease incidence. Further, statistically there is no significant difference in the disease incidence due to methods of shoot harvest (Table IV).

It can be concluded that the incidence of fungal diseases were found higher under closer spacing. There was no significant difference in the incidence of diseases due to different crown heights and harvesting methods. Data show a tendency to a lower incidence of disease due to higher crown height.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are thankful to Dr. K. Sengupta, Director – Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India – for his kind encouragement.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1986-87), Annual report. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, 101-103.
- BERGER R.D. (1975), Disease incidence and infection rates of *Cercospora apii* in plant spacing plots. *Phytopathology*, 65, 485-487.
- DEVADATH S., PREMALATHA A., JAIN R.K. (1987), Effect of shade, nitrogen fertilizer, water-logging and inoculum concentration on the incidence of bacterial blight of rice. *Indian Phytopath.*, 40(4), 529-530.
- KRISHNAPRASAD K.S., SIDDARAMAIAH A.L. (1979), Studies on the development of powdery mildew. *Indian J. Seric.*, 28, 9-13.
- MC KINNEY H.H. (1923), Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *J. Agric. Res.*, 26, 195-210.
- SIDDARAMAIAH A.L., KRISHNAPRASAD K.S., HEGDE H.K. (1978), Epidemiological studies of mulberry leaf spot caused by *Cercospora moricola*. *Indian J. Seric.*, 17, 44-47.
- SUD V.K., SINGH B.M. (1984), Effect of sowing date and row spacing on the development of leaf spot (*Cercospora canescens*) in urdbean. *Indian Phytopath.*, 37, 288-293.
- SESHAGIRI RAO C., DEVADATH S. (1978), Effect of time and rate of nitrogen application on bacterial leaf streak incidence on rice. *Indian Phytopath.*, 31, 371-372.
- SUKUMAR J., RAMALINGAM A. (1986), Epidemiology of *Cercospora* leaf spot disease of mulberry. I. Stage of infection spots and conidial production. *Sericologia*, 26, 549-553.
- SIKDAR A.K., KRISHNASWAMI S. (1980), Assessment of leaf yield loss of the two mulberry varieties due leaf spot. *Indian J. Seric.*, 19, 9-12.
- SINGH S.A., SEN GUPTA P.K. (1985), Influence of some host factors and agronomic conditions on leaf scald disease of rice. *Indian Phytopath.*, 38, 642-647.

INCIDENCE DES MALADIES FONGIQUES DU MURIER EN FONCTION DE DIFFERENTES PRATIQUES AGRONOMIQUES

GOVINDAIAH, D.D. SHARMA, P.C. CHOUDHURY, B. MALLIKARJUNA & Y.R. MADHAVA RAO

Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, Inde.

*L'incidence de trois maladies fongiques majeures, à savoir la maladie de la tache, l'oïdium et la rouille des feuilles dans des conditions naturelles a été étudiée au cours des années 1985-86 au Central Sericultural Research and Training Institute (Mysore, Etat du Karnataka, Inde) avec la variété Kanva-2 du mûrier (*Morus alba* L.) cultivé selon différentes méthodes culturales faisant varier l'espacement, la hauteur de couronne et les méthodes de récolte. L'incidence et l'intensité des maladies se sont révélées nettement plus fortes pour les espacements rapprochés (60 cm × 30 cm) que pour les espacements larges (120 cm × 75 cm) pour toutes les maladies étudiées. Les variations des hauteurs de couronne et des méthodes de récolte n'ont pas d'effet significatif sur l'incidence des maladies. Cependant, celle-ci est comparativement plus faible pour les couronnes hautes (40 cm au-dessus du sol).*

INTRODUCTION

Le mûrier (*Morus alba* L.) est affecté par diverses maladies provoquées par des champignons, bactéries, virus et nématodes. Trois maladies, la maladie de la tache (*Cercospora moricola* Cooke), l'oïdium (*Phyllactinia corylea* (Pers) Kars) et la rouille des feuilles (*Cerotelium fici* (Cast) Arth), sont les principales responsables des pertes de récolte chez le mûrier. L'incidence de ces maladies dépend de nombreux facteurs tels que la saison, la température, l'humidité et la variété du mûrier (Krishna Prasad et Siddaramaiah, 1979 ; Sikdar et Krishnaswamy, 1980 ; Sukumar et Ramalingam, 1986). Il a été démontré que certaines méthodes agronomiques comme l'espacement entre les plants, l'application d'azote, l'irrigation, etc., influent sur les maladies pour d'autres types de culture, par exemple : le riz, le haricot urad (Seshagiri Rao et Devadath, 1978 ; Sud et Singh, 1984 ; Singh et Sengupta, 1985 ; Devadath et coll., 1987). La présente étude porte sur l'incidence de la maladie de la tache, de l'oïdium et de la rouille des feuilles chez le mûrier en fonction de différentes techniques agronomiques telles que l'espacement, la hauteur de couronne et les méthodes de récolte.

MATERIELS ET METHODES

Une expérience sur le terrain a été réalisée au cours des années 1985-86 au Central Sericultural Research and Training Institute (Mysore, Etat du Karnataka, Inde) sur la variété Kanva-2 du mûrier (*Morus alba* L.) plantée suivant une configuration asymétrique. La plantation expérimentale est effectuée avec des plants âgés de trois mois. L'incidence de différentes maladies telles que la maladie de la tache, l'oïdium et la rouille des feuilles est étudiée en fonction de cinq espacements, à savoir $S_1 = 60 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$; $S_2 = 60 \text{ cm} \times 60 \text{ cm}$; $S_3 = 90 \text{ cm} \times 60 \text{ cm}$; $S_4 = 120 \text{ cm} \times 60 \text{ cm}$ et $S_5 = 120 \text{ cm} \times 75 \text{ cm}$, de trois hauteurs de couronne, soit $C_1 = 15 \text{ cm}$, $C_2 = 30 \text{ cm}$ et $C_3 = 40 \text{ cm}$ au-dessus du sol, et de deux méthodes de récolte des pousses : $H_1 =$ récolte de la tige entière - dans ce cas, les plants sont taillés régulièrement à une hauteur de couronne donnée (soit à 15 cm, 30 cm

ou 40 cm) et H₂ = récolte des pousses secondaires - dans ce cas, les tiges sont taillées par échelons successifs vers le bas à des hauteurs de 50-60 cm, 40-50 cm, 30-40 cm, 20-30 cm et 10 cm au-dessus du sol (comprenant 10-12, 8-10, 6-8, 4-6 et 2-3 bourgeons) au-dessus de la couronne du plant pour les 1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} récoltes respectivement (Fig. 1 et 2). Les traitements sont répétés deux fois. Le nombre total de plants dans chaque traitement varie en fonction de l'espacement : 134, 96, 48 et 40 respectivement pour les espacements S₁, S₂, S₃, S₄ et S₅. Les autres techniques agricoles telles que le bêchage, l'irrigation et l'application d'engrais sont conformes à l'ensemble des techniques recommandées pour tous les traitements. L'incidence des maladies est relevée dans des conditions naturelles 40 à 45 jours après la taille une fois par saison en hiver (octobre-février), en été (mars-juin) et pendant la saison des pluies (juillet-septembre) en prélevant cinq plants au hasard par réplicat. Dans chaque plant, le nombre total de feuilles malades et saines pour trois branches est noté afin de déterminer le pourcentage d'incidence des maladies d'après la formule adoptée par Mickinney (1923) pour les cinq degrés suivants :

I = 1-10 % de la lamina couverts de taches ou de plaques

II = 11-25 % —D^o—

III = 26-50 % —D^o—

IV = 51-75 % —D^o—

V = 76-100 % —D^o—

$$\text{Pourcentage d'incidence de la maladie} = \frac{\text{Somme des valeurs numériques} \times 100}{\text{Nombre total de feuilles observées} \times \text{degré maximum (5)}}$$

RESULTATS ET DISCUSSION

La présente étude met en évidence le fait que l'incidence de la maladie de la tache est significativement plus élevée au cours de la saison des pluies (10,87 %) qu'en hiver (7,49 %) et en été (1,88 %). On observe que l'incidence de l'oïdium est maximale en hiver (25,70 %) puis durant la saison des pluies (11,63 %) et en été (7,96 %). La rouille des feuilles est absente au cours de la saison des pluies tandis qu'une incidence maximale est observée en hiver (26,29 %) suivi de l'été (21,64 %) (tableau I).

Ces résultats confirment ceux de Siddaramaiah et coll. (1978), Krishnaprasad et Siddaramaiah (1979) et Anonyme (1986-87).

(A) Effet de l'espacement :

Une différence significative de l'incidence des trois maladies apparaît suivant les espacements étudiés. L'incidence des maladies est plus élevée pour l'espacement le plus rapproché (60 cm × 30 cm) que pour l'espacement le plus large (120 cm × 75 cm). Aucune différence significative n'est observée quant à l'incidence de la maladie de la tache et l'oïdium entre les espacements S₃ et S₄ et S₄ et S₅. L'incidence de la rouille des feuilles n'est pas significativement différente entre les espacements S₂ et S₃ et S₃ et S₅ (Tableau II). Le fait que l'incidence des maladies soit plus élevée pour les espacements rapprochés peut être attribué à un micro-climat propice à la multiplication et à la propagation de l'infestation. Berger (1975) et Sud et Singh (1984) ont également observé que l'intensité et l'incidence des maladies étaient plus élevées pour les espacements faibles que pour les espacements larges.

(b) Effets de la hauteur de couronne et de la récolte de la tige :

Aucune différence significative dans l'incidence des maladies n'apparaît entre les différentes hauteurs de couronne des plants (Tableau III). Ceci peut être dû au fait que les trois maladies étudiées sont principalement transportées par l'air et se propagent par les courants d'air et les gouttes de pluies. La hauteur de l'arbuste n'a donc aucun effet sur l'incidence des maladies. De plus, il n'y a aucune différence significative dans l'incidence des maladies entre les différentes méthodes de récolte (Tableau IV).

On peut en conclure que l'incidence des maladies fongiques est plus élevée pour les espacements rapprochés. Il n'y a pas de différence significative entre les différentes hauteurs de couronne et les méthodes de récoltes. Nos données révèlent cependant une tendance à une incidence moins forte des maladies pour les hauteurs de couronnes élevées.

NEW RECORD OF A BACTERIAL PATHOGEN, *STREPTOCOCCUS FAECALIS* ANDREWES AND HORDER, ON MULBERRY SILKWORM, *BOMBYX MORI* L., FROM INDIA

C.S. PATIL

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

Keywords : *Streptococcus faecalis*, new record from India, *Bombyx mori*, distribution.

Although bacterial flacherie of silkworms has been prevalent for a long time in India (Mukerji, 1899), the studies on the causative organisms are scarce. Chitra *et al.* (1973) have isolated 10 strains of bacteria, 3 from the haemolymph belonging to *Aerobacter* and *Achromobacter* genera and 7 species from the gut region belonging to *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Escherichia* and *Staphylococcus* genera from flacherie-diseased silkworms. Recently, selective media have been widely used for the detection and isolation of a single type of micro-organism (Difco manual, 1977). In this, a bacterial pathogen from a flacherie-diseased silkworm has been isolated, cultured on a selective medium and its distribution in the silkworm rearing environment has been studied.

The gut of the flacherie-diseased silkworm was triturated in sterilised water and filtered through a nylon bolting cloth. Then 0.5 ml of filtrate was inoculated into EF (*Enterococcus faecalis*) agar medium (Nissui Co., Japan). The medium was prepared by dissolving 5.5 g of EF agar in 100 ml of distilled water and melted for 5 minutes at 70-80°C. After cooling, it was supplemented with 1 ml of 1.5 % 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) and mixed thoroughly. To each Petri plate 20 ml of medium was poured and the pathogen suspension was inoculated following the method of Thomas (1974). The culture plates were incubated at 37°C for 3 days.

To study the distribution of the bacterium in the silkworm rearing environment, 125 samples of dust and faecal materials from the rearing room floors and trays were collected from 10 villages in Karnataka. One gram of the sample was dissolved in sterilised water and filtered through a nylon bolting cloth. Then 0.5 ml of filtrate was inoculated into the EF agar medium and cultured.

Barnes and Ingram (1955) studied the reducing properties of *S. faecalis* and *Streptococcus faecium* and are of the opinion that the former has a high reduction capacity while the latter has no (very little) reducing property. Triphenyl tetrazolium chloride (TTC) is colourless in the oxidised form and will be reduced to insoluble red-coloured triphenyl formazan in the presence of a suitable reducing substance/system and the reduction reaction of TTC in agar medium differentiates *S. faecalis* from *S. faecium* by producing the red-coloured colonies (Barnes, 1956). Further, he said that this method is found most valuable for distinguishing the two species. According to Prof. Mastsumoto (personal discussion), the bacterial colonies showing the red colour on an EF agar medium supplemented with TTC are due to a high reduction caused by *S. faecalis* and the yellow-coloured colonies are due to less reducing species like *S. faecium*. In the present study, only the red-coloured bacterial colonies appeared and thus confirming the presence of *S. faecalis*.

Further, the species identification was confirmed following the description given by Breeds *et al.* (1957). The bacteria under microscope are oval in shape, occur singly or in pairs. The culture

colonies on an EF agar medium are small, round and flat. Bacteria are gram + ve. Occurrence of *S. faecalis* on silkworm is a first report from India.

Of the 125 samples of faecal materials and dusts screened showed that *S. faecalis* was detected at the rate of 87.2 % and hence it is ubiquitous in the silkworm rearing environment. Similarly, the wide distribution of *S. faecalis* in the sericultural provinces of Japan has been reported by Kawakita *et al.* (1967). Though it is widely distributed in both temperate and tropical environments, the crop loss due to bacterial diseases is higher in tropical regions than in temperate ones. This may be because of the tropical climatic conditions (especially high temperature) which appear to be favourable for faster multiplication of *S. faecalis* and thereby creating congenial conditions for other bacteria to invade silkworms. According to Faust (1974), *S. faecalis* does not cause mortality at normal temperature and humidity but under the conditions of stress (high temperature, humidity and woundings, etc.) it causes mortality in several insects. Kodama and Nakasuji (1969b) showed that *S. faecalis* is one of the primary bacteria invading the silkworm, causing a chronic intestinal disease and creating the congenial conditions in the gut (lowering of pH) for the secondary invading bacterium, *Serratia piscatorum* which will multiply in the haemocoel and produce a lethal septicaemia. However, further studies on the manifestation of disease under tropical conditions are required.

ACKNOWLEDGEMENTS

I am indebted to Dr. Tsugao Matsumoto, Associate Professor, Department of Insect Pathology and Microbiology, Kyoto Institute of Technology (Kyoto, Japan), for supplying the EF agar and valuable suggestions..

REFERENCES

- BARNES E.M. (1956), J. Gen. Microbiol., 14, 57.
 BARNES E.M., INGRAM M. (1955), Ann. Inst. Pasteur, 7, 115.
 BREED R.S., MURRAY E.G.B., SMITH N.R. (1957), In Bergey's manual of determinative bacteriology. The Williams and Wilkins Co., New York.
 CHITRA C., BHANDARKAR A., KARANTH N.G.K., VASANTHARAJAN V.N. (1973), Curr. Sci., 42, 373-376.
 DIFCO (1977), Manual of dehydrated culture medium and reagents for microbiological and clinical laboratory procedure. 9th Ed., Difco Lab., Detroit, Michigan.
 FAUST R.M. (1974), Bacterial diseases. In Insect diseases, vol. 1, ed. by G.E. Cantwell, Marcel Dekker Inc., New York.
 KAWAKITA T., WATANABE T., HAYASHI K. (1967), J. Sericult. Sci. Japan, 36(1), 31-38.
 KODAMA R., NAKASUJI Y. (1969b), J. Sericult. Sci. Japan, 38(5), 406-412.
 MUKERJI N.G. (1899), Hand book of sericulture. Govt. printing, Calcutta, India.
 THOMUS G.M. (1974), Diagnostic techniques. In Insect diseases. Ed. by G.E. Cantwell, Marcel Dekker Inc., New York.

PREMIERE OBSERVATION DE *STREPTOCOCCUS FAECALIS* ANDREWES ET HORDER COMME AGENT PATHOGENE BACTERIEN DU VER A SOIE DU MURIER *BOMBYX MORI* EN INDE

C.S. PATIL

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

Bien que la flacherie bactérienne du ver à soie soit répandue depuis longtemps en Inde (Mukerji, 1899), peu d'études ont été effectuées sur les vecteurs de cette maladie. Chitra et coll. (1973) ont isolé 10 souches de bactéries d'un ver à soie atteint de flacherie, 3 à partir de l'hémolymph, appartenant aux genres *Aerobacter* et *Achromobacter* et 7 espèces, à partir de la région intestinale, appartenant aux genres *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, et *Staphylococcus*. Depuis quelques années, on utilise couramment des milieux sélectifs bactériens pour détecter et isoler un type unique de microorganismes (Difco manual, 1977). Un agent pathogène bactérien a été isolé à partir de vers à soie atteints de flacherie, puis cultivé sur un milieu sélectif ; on a ensuite étudié sa distribution dans un élevage.

Les intestins de vers à soie atteints de flacherie sont traités dans de l'eau stérilisée et filtrés à travers un tamis en nylon. On inocule ensuite 0,5 ml de ce filtrat dans le milieu agar EF (*Enterococcus faecalis*) (Nissui co., Japan). Le milieu sélectif est préparé en dissolvant 5,5 g de EF agar dans 100 ml d'eau distillée et en fondant le mélange à 70-80°C. Après réfrigération, on ajoute 1 ml de chlorure de 2,3,5-triphényl tétrazolium à 1,5 % (TTC) que l'on mélange soigneusement. 20 ml du milieu sont versés sur chaque boîte de Pétri et la suspension pathogène est inoculée selon la méthode de Thomus (1974). Les plaques de culture sont incubées à 37°C pendant 3 jours.

Pour étudier la distribution de la bactérie dans l'environnement de l'élevage du ver à soie, 125 échantillons de matières fécale et poussiéreuse provenant des planchers et des litières des pièces d'élevage ont été prélevés dans 10 villages du Karnataka. 1 gramme d'échantillon est dissout dans de l'eau stérilisée et filtré à travers un tamis en nylon ; 0,5 ml de ce filtrat est cultivé sur le milieu agar EF.

Barnes et Ingram (1955) ont étudié les propriétés réductrices de *S. faecalis* et *Streptococcus faecium* et en ont déduit que le premier a une haute capacité de réduction tandis que le second n'en a aucune ou très peu. Le chlorure de Triphényl tétrazolium (TTC) est incolore sous sa forme oxydée et est réduit en triphényl formazan insoluble de couleur rouge en présence d'une substance réductrice adaptée. La réaction de réduction de TTC dans le milieu agar permet de différencier *S. faecalis* de *S. faecium* en produisant des colonies rouges (Barnes, 1956). Selon cet auteur, cette méthode permet de distinguer beaucoup plus sûrement les deux espèces. Selon le Professeur Mastsumoto (communication personnelle), les colonies bactériennes de couleur rouge dans le milieu EF agar additionné de TTC, sont dues à une forte réduction par *S. faecalis* et les colonies bactériennes de couleur jaune sont soumises à une réduction moindre en présence de *S. faecium*. Dans la présente étude, seules des colonies bactériennes de couleur rouge sont apparues, ce qui confirme la présence de *S. faecalis*.

De plus, l'identification des espèces a été confirmée selon la description de Breeds et coll. (1957). Au microscope, les bactéries sont de forme ovale et se présentent seules ou en paires. Les colonies obtenues sur le milieu EF agar sont petites, rondes et plates. Les bactéries sont gram + ve. C'est la première fois que l'on observe la présence de *S. faecalis* chez le ver à soie en Inde.

Les 125 échantillons de matière fécale et poussiéreuse sélectionnés montrent que *S. faecalis* est détecté au taux de 87,2 % et est donc omniprésent parmi les élevages de vers à soie. De même, une large distribution de *S. faecalis* dans les provinces séricicoles japonnaises a été rapportée par Kawakita et coll. (1967). Bien que cette bactérie soit largement répandue dans les zones tempérées et tropicales, la perte de récolte - due aux maladies bactériennes - est plus importante dans les zones tropicales que sous les climats tempérés. Ceci peut être dû aux particularités du climat tropical (essentiellement à une température élevée) qui semble être favorable à une multiplication plus rapide de *S. faecalis* et, de ce fait, créer des conditions propices à la diffusion d'autres bactéries dans les élevages de vers à soie. Selon Faust (1974), *S. faecalis* n'est pas un facteur de mortalité à des taux de température et d'humidité normaux, mais il le devient chez plusieurs insectes dans des conditions stressantes (température élevée, humidité et maladies). Kodama et Nakasuji (1969) démontrent que *S. faecalis* - une des bactéries primaires se propageant dans les élevages de vers à soie - est la cause d'une maladie intestinale chronique et crée ainsi des conditions favorables dans l'estomac (baisse du pH) à la propagation de la bactérie secondaire *Serratia piscatorum* qui se multiplie dans l'hémocoel et provoque une septicémie mortelle. Cependant, il serait nécessaire d'effectuer des études plus approfondies concernant la manifestation de cette maladie dans des conditions tropicales.

STUDIES ON FORTIFICATION OF CULTURE MEDIA WITH LARVAL AND PUPAL EXTRACT ON THE GROWTH OF *BEAUVERIA BASSIANA*

M.V. SAMSON, B. NATARAJU & M. BAIG

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

To formulate suitable media for the culture of Beauveria bassiana through enrichment of popular media for the culture of fungi, four media were tried by enriching the media with larval extract and pupal extract of 5 % and 10 % respectively. Results indicate that the incorporation of larval and pupal extracts in medium I improved mycelial growth by 161.36 % to 368.18 %. In medium II enrichment through incorporation of the extracts had little impact on the growth of mycelia. In media III and IV the extract improves the growth of mycelia.

Keywords : *Beauveria bassiana*, media, extract, mycelia, growth.

INTRODUCTION

Culture media form a most vital tool for the laboratory study of micro-organisms and their large-scale production. Some common cultural media such as potato glucose agar malt extract, yeast extract, glucose yeast extract or corn meal agar furnish all the nutrients essential to the growth of most fungi. However even these natural substances may need to be supplemented for good growth and sporulation of some fungi (Stevens, 1974).

Beauveria bassiana (Bals) Vuillemin the entomogenous fungus is gaining considerable importance as a microbial agent for the control of insect pests. The blastospores of *Beauveria bassiana* is mass-produced as Boverin and Biotrol to control colorado beetle, *Leptinotarsa ecemlineata*, and Codling moth *Laspeyresia Pomonella* (Norris, 1971, Ferron, 1978). Several types of investigations have been made to improve the mass production of *Beauveria bassiana* (Samsinokova, 1966, Goral, 1971, Mummigatti and Samson, 1980).

In the present study, further attempts are made to improve the production by incorporation of silkmoth larval and pupal extract to the well-known media for the growth of *Beauveria bassiana*.

MATERIALS AND METHODS

Four selected media were prepared in bi-distilled water using standard ingredients. The pH of the media was adjusted to 4.5.

Medium I : Peptone glucose yeast extract broth.

Medium II : Samsinokova's modified cornsteep liquor.

Medium III : Peptone yeast extract, tryptone, beef extract glucose broth.

Medium IV : Sabourauds maltose agar with 1 % yeast extract.

5 % and 10 % concentration of larval or pupal extract are incorporated in all the media for their enrichment. For each medium separate controls without any incorporation were maintained for mycelial growth comparison.

The required concentrations of larval, pupal extract were incorporated in the known volume of media and boiled for 10 minutes. The media were filtered and autoclaved at 121°C for 15 minutes. The inoculum of *Beauveria bassiana* with conidial count of 10^6 /ml was prepared in distilled water; and one ml of inoculum was incorporated into the media under aseptic conditions in flasks containing 50 ml of media. The media were incubated at room temperature for 8 days.

The growth of *Beauveria bassiana* in the media was assessed on the 8th day by actual weighing under dry condition. The mycelial mat were dried at 60°C for 2 hours in hot air oven before weighing.

RESULTS AND DISCUSSION

The incorporation of larval or pupal extract is observed to enrich medium I, more than the other media studied. (Table I.). An increased growth of 368.18 % of mycelia was recorded with incorporation of 10 % larval extract, 367.86 % with 10 % pupal extract, 217.86 % with 5 % pupal extract, and 161.36 % with 5 % larval extract was recorded in this medium.

Medium II appears to be the least enriched for the growth of *Beauveria bassiana* by the incorporation. Significant improved growth of 22.19 % was obtained with 10 % larval extract incorporation. 5 % pupal extract has a negative effect on the growth of *Beauveria bassiana*.

Table I. Effect of incorporation of larval and pupal extracts in media on the growth of *Beauveria bassiana*.

Tableau I. Effet de l'incorporation d'extraits de larves et de chrysalides dans des milieux sur la croissance chez Beauveria bassiana.

	Control <i>Témoin</i>	Larval extract <i>Extrait de larves</i>		Control <i>Témoin</i>	Pupal extract <i>Extrait de chrysalides</i>	
		5 %	10 %		5 %	10 %
Medium I <i>Milieu I</i>	0.044 ± 0.005	0.115 ± 0.008 (+161.36 %) **	0.206 ± 0.022 (+368.18 %) **	0.028 ± 0.009	0.089 ± 0.019 (+217.86 %) **	0.131 ± 0.021 (+367.86 %) **
Medium II <i>Milieu II</i>	0.933 ± 0.126	0.993 ± 0.039 (+6.32 %) NS	1.140 ± 0.083 (+22.19 %) *	1.189 ± 0.115	1.070 ± 0.118 (-10.00 %) NS	1.239 ± 0.087 (+4.21 %) NS
Medium III <i>Milieu III</i>	0.313 ± 0.046	0.553 ± 0.043 (+76.68 %) **	0.671 ± 0.062 (+114.38 %) **	0.158 ± 0.024	0.222 ± 0.041 (+40.51 %) *	0.273 ± 0.040 (+72.78 %) **
Medium IV <i>Milieu IV</i>	0.685 ± 0.044	1.008 ± 0.139 (+47.15 %) **	1.184 ± 0.053 (+72.85 %) **	0.835 ± 0.198	1.012 ± 0.129 (+21.98 %) NS	1.233 ± 0.062 (+47.67 %) **

Incorporation of 10 % larval extract to medium III has improved the growth by 114.38 % . Significant increased growth of 76.68 % with 5 % larval extract, 72.78 % with 10 % pupal extract and 40.51 % with 5 % pupal extract was also recorded.

Incorporation of 10 % larval extract to medium IV has improved growth by 72.85 %. Significant growth of 47.67 % with 10 % pupal extract and 47.15 % with 5 % larval extract was also recorded.

REFERENCES

- FERRON P. (1978), Biological control of insect pests by entomogenous fungi. Annual Review of Entomology. 23, 409-443.
- GORAL V.M.(1971), A method for obtaining conidia from fungus, *Beauveria bassania*. U.S.S.R., patent no. 301142.
- MUMMIGATTI S.G., SAMSON M.V. (1980), A note on the growth of *Beauveria bassania* (Bals) Vuillemin in different media. Indian Journal of Microbiology, 20, 324-325.
- NORRIS J. R. (1971), Microbes as biological control agents. Microbes and biological productivity. Published by society for general Microbiology, 197-229.
- SAMSINOKOVA A. (1966), Growth and sporulation of submerged cultures of the fungus, *Beauveria bassiana* in various media. J. Invert. Pathol., 8, 385-400.
- STEVENS R. B. (1974), Micology guide book . Published by University of Washington press, Seattle and London. 15.

EFFET DE L'ENRICHISSEMENT DE MILIEUX DE CULTURE PAR DES EXTRAITS DE LARVES ET DE CHRYSALIDES SUR LA CROISSANCE DE *BEAUVERIA BASSIANA*.

M.V. SAMSON, B. NATARAJU & M. BAIG

Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore-8, India.

Pour formuler un milieu adéquat pour la culture de Beauveria bassiana par l'enrichissement de milieux couramment utilisés pour la culture de champignons, 4 milieux ont été examinés, enrichis avec 5% d'extraits de larves et 10 % d'extraits de chrysalides. Les résultats indiquent que l'incorporation d'extraits de larves et de chrysalides dans le milieu I augmente la croissance mycélienne de 161.36 % à 368.18 %. Dans le milieu II, l'enrichissement par l'incorporation de ces extraits n'a eu que peu d'impact sur la croissance des mycéliums. L'addition d'extraits dans les milieux III et IV, augmente la croissance des mycéliums.

INTRODUCTION

Les milieux de culture sont un outil indispensable pour l'étude en laboratoire de microorganismes et de leur production à grande échelle. Certains milieux communs de culture, tels que l'extrait malté d'agar et glucose de pomme de terre, l'extrait de levure, l'extrait de levure glucosé ou l'agar et farine de maïs, fournissent tous les éléments nutritifs essentiels pour la croissance des champignons. Cependant, même ces substances naturelles peuvent avoir besoin d'être complétées pour une croissance et une sporulation satisfaisantes de certains champignons (Stevens, 1974).

Beauveria bassiana (Bals.) Vuillemin, champignon entomogène, devient d'une importance considérable en tant qu'agent microbien dans la lutte contre les insectes nuisibles. Les blastospores de *Beauveria bassiana* produits en masse sous le nom de Boverin et Biotrol pour lutter contre le doryphore *Leptinotarsa decemlineata*, et le papillon Codling *Laspeyresia pomonella* (Norris, 1971 ; Rerron, 1978). Plusieurs types d'études ont été suivis pour augmenter la production en série de *Beauveria bassiana* (Samsinokova, 1966 ; Goral, 1971 ; Mummigatti et Samson, 1980).

Dans la présente étude, des essais supplémentaires ont été faits pour augmenter la production de *Beauveria Bassiana*, par l'incorporation d'extraits de larves et de chrysalides dans le milieu couramment utilisé pour sa croissance.

MATERIELS ET METHODES

4 milieux sélectionnés ont été préparés avec de l'eau bi-distillée en utilisant des ingrédients types. Le pH de ces milieux a été ajusté à 4,5.

Milieu I : bouillon d'extrait glucosé de Peptone de levure.

Milieu II : liqueur de blé modifié Samsinokova.

Milieu III : extrait de levure Peptone, Tryptone, bouillon glucosé d'extrait de boeuf.

Milieu IV : agar maltose Sabourauds contenant 1 % d'extrait de levure.

Une concentration à 5 % et 10 % d'extraits de larves et chrysalides a été incorporée dans chaque milieu pour les enrichir. Pour chaque milieu, des témoins, dans lesquels aucune incorporation n'a été faite, ont été prévus afin de comparer leur croissance mycélienne à celle des cultures sur milieux sélectionnés.

Les concentrations voulues d'extraits de larves et de chrysalides ont été incorporées dans le volume connu des milieux et le tout a été porté à ébullition pendant 10 minutes. Les milieux ont été filtrés et mis en autoclave à 121°C pendant 15 minutes. L'inoculum de *Beauveria bassiana* a été préparé avec de l'eau distillée contenant 10^6 conidies par ml ; 1 ml d'inoculum a été incorporé dans des bouteilles stériles contenant 50 ml des différents milieux. Les milieux ont été mis en incubation à température ambiante pendant 8 jours.

La croissance de *Beauveria bassiana* dans ces milieux a été évaluée le 8ème jour par pesage réel à sec. La couche mycélienne a été séchée à 60°C pendant 12 heures dans un four à chaleur tournante avant le pesage.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'incorporation d'extraits de larves et de chrysalides enrichit beaucoup plus le milieu I que les autres milieux (Tableau I). Avec une incorporation de 10 % d'extraits de larves, une augmentation de croissance de 368,18 % de mycéliums a été enregistrée ; avec une incorporation de 10 % d'extraits de chrysalides, la croissance a été augmentée de 367,86 % ; elle a été accrue de 217,86 % avec 5 % d'extraits de chrysalides et de 161,36 % avec 5 % d'extraits de larves.

Le milieu II semble être le moins enrichi par l'incorporation vis à vis de la croissance de *Beauveria bassiana*. Une augmentation significative de croissance de 22,19 % a été obtenue avec 10 % d'extraits de larves. Les 5 % d'extraits de chrysalides ont eu un effet négatif sur la croissance de *Beauveria bassiana*.

Dans le milieu III, l'incorporation de 10 % d'extraits de larves a augmenté la croissance de 114,38 %. Des augmentations significatives de croissance ont été enregistrées de 76,68 % avec 5 % d'extraits de larves, de 72,78 % avec 10 % d'extraits de chrysalides et de 40,51 % avec 5 % d'extraits de chrysalides.

Dans le milieu IV, l'incorporation de 10 % d'extraits de larves a augmenté la croissance de 72,85 %. Une augmentation de croissance significative de 47,67 % a été enregistrée avec 10 % d'extraits de chrysalides et de 47,15 % avec 5 % d'extraits de larves.

INCIDENCE OF LEAF SPOT DISEASE IN RELATION TO EPIDERMAL AND CUTICLE THICKNESS IN SOME INDIGENOUS VARIETIES OF MULBERRY

GOVINDAIAH, T. PHILIP, K. SENGUPTA, K. GIRIDHAR & N. SURYANARAYANA

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

*Leaf spot caused by *Cercospora moricola* is one of the major foliar diseases of mulberry. The incidence of the disease depends on various factors including the nature of the leaf epidermal cells. In the present paper the thickness of cuticle and epidermis in 25 indigenous varieties of mulberry has been studied in relation to the incidence of leaf spot. The varieties with thick epidermis or cuticle are found to be more resistant to the disease.*

Keywords : Leaf spot, *Cercospora moricola*, disease incidence, thickness of cuticle and epidermis.

INTRODUCTION

Mulberry is affected by different diseases caused by fungi, bacteria, viruses and nematodes. Among them the leaf spot disease caused by *Cercospora moricola* Cooke is a major one which causes about 10-12 % leaf yield loss in rainy seasons (Sikdar and Krishnaswamy, 1980). The disease incidence depends on many factors like season, temperature, humidity, mulberry variety, cultural practices and anatomical structures of the leaf. Anatomical characters like thickness of cuticle and epidermis, stomatal frequency and hairiness play an important role on the incidence and intensity of the disease. Correlation between anatomical characters and disease incidence have been reported by many workers in various crops (Kumar Raj *et al.*, 1983 ; Mohanty and Gangopadhyay, 1983 ; Leisle, 1979 ; Hilu *et al.*, 1980 ; Philip and Devadath, 1980). In mulberry, anatomical studies in relation to disease incidence have not been made so far. Hence, correlation studies between incidence of leaf spot and thickness of epidermis and cuticle in 25 indigenous varieties of cultivated mulberry were made and the observations are reported here.

MATERIALS AND METHODS

Twenty-five indigenous varieties of mulberry growing in the germ plasm at CSR & TI - Mysore - were selected for the study. For leaf anatomical study, the 5th and 6th leaves (30 days old) from the bud region from different plants were collected and hand sections were taken from the middle portion of the lamina excluding the midrib. The sections were stained in aqueous safranin and mounted in 20 % glycerine. Average of all characters were taken from a minimum of 25 readings from different sections.

The disease incidence was recorded at regular intervals after the full expression of the disease by randomly selecting five plants in each variety. In each plant, the total number of diseased and

Table I. Percentage of disease incidence in mulberry varieties in relation to thickness of leaf epidermis and cuticle.

Tableau I. Pourcentage d'incidence de la maladie chez les variétés de mûriers en fonction de l'épaisseur de l'épiderme et de la cuticule.

Varieties	Thickness of		% of disease incidence
Variétés	epidermis (μm) <i>Epaisseur de</i>	cuticle (μm) <i>la cuticule (μm)</i>	% d'incidence de la maladie
Resistant / Résistantes			
Kaliakutahi	30.49	4.66	0
Bilidevalaya	31.93	3.84	0
MRI	32.44	4.23	0.55
Jodhpur	27.67	4.31	0.55
Br-C 799	20.39	4.71	0.68
MR 2	27.77	4.04	0.85
MS 7	22.94	4.10	1.18
MS 5	28.83	4.81	1.63
ACC 153	26.62	4.47	2.42
OPH 3	26.64	4.23	2.46
MS 8	35.20	4.59	2.46
Assamabola	26.07	4.91	2.54
Moulai	35.44	5.93	2.96
MS 2	24.98	4.20	3.84
K 2	30.00	2.85	4.46
S 54	25.51	3.07	4.51
Mean / Moyenne	28.3075	4.3093	1.9431
Standard deviation / Intervalle de confiance	4.017	0.692	1.449
Moderately resistant / Résistance moyenne			
S 741	27.24	4.76	5.39
S 41	25.44	2.87	6.18
Cuckpilla	29.34	4.05	6.29
MS 6	22.98	3.59	6.30
Jatinuni	26.10	3.36	9.08
Local	26.52	3.26	9.52
S 30	22.79	3.47	14.93
Sujanpur	23.76	3.52	16.41
Br-C 763	20.89	3.68	16.90
Mean / Moyenne	25.0066	3.6177	10.1111
Standard deviation / Intervalle de confiance	2.471	0.503	4.438

healthy leaves were recorded in three selected branches to calculate the percentage of disease incidence as per the FAO methods of plant disease assessment in different grades (Mckinney, 1923).

$$\% \text{ of disease incidence} = \frac{\text{sum of numerical values} \times 100}{\text{Total no. of leaves observed} \times \text{maximum grading (5)}}$$

1. 0 % leaf area infected : completely resistant
2. 0-5 % leaf area infected : resistant
3. 5-20 % leaf area infected : moderately resistant
4. 20-50 % leaf area infected : moderately susceptible
5. 50-100 % leaf area infected : highly susceptible

RESULTS AND DISCUSSION

Kaliakutahi and Bilidevalaya were found to be completely resistant to leaf spot. Varieties like MR 1, Jodhpur, C 799, MR 2, MS 7, MS 5, ACC 153, OPH 3, MS 8, Assamabola, Moulai, MS 2, K 2 and S 54 were found to be resistant and S 741, S 41, Cuckpilla, MS 6, Jatinuni, Local, S 30, Sujanpur and C 763, moderately resistant.

Thickness of epidermis and cuticle was studied in relation to disease incidence (Table I). Completely resistant varieties like Kaliakutahi and Bilidevalaya had a thick epidermis and a comparatively thin cuticle. In all the resistant varieties except S 54 either the cuticle or the epidermis or both were found to be thick. Similarly, except Cuckpilla and S 741, all other moderately resistant varieties had comparatively thinner epidermis or cuticle or both.

Thus, a correlation exists between the intensity of leaf spot disease and the thickness of leaf surface layers in most of the varieties studied. However, it is difficult to say which layer is more important in resistance/susceptibility. In varieties like C 763, S 30 and Sujanpur, where both layers are thinner the disease incidence was maximum. This possibility suggests that both epidermal and cuticle thickness equally play an important role in the expression of the disease.

It may be possible that thick cuticle/epidermis had delayed the germination of *Cercospora moricola* spore or penetration of the infection hyphae thereby reducing the rate of disease development.

Such a correlation between epidermal and cuticle thickness and disease incidence and intensity has been reported earlier also in other crops (Melander and Craigie, 1927 ; Ashok *et al.*, 1987). Yang (1972) has also reported that the cuticle plays a determining role in the formation of mature appressoria in *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. This may lead to a slow development of the fungus. However, less susceptibility may also be due to reduced ability of infection in inoculum production, as the inoculum potential is known to be correlated with the intensity of the disease (Suzuki and Fujita, 1977). The thickness of the cuticle and epidermis may in turn affect these factors which result in slow growth of the pathogen. In the present study also it has been observed that the intensity of leaf spot caused by *Cercospora moricola* in mulberry varies according to the thickness of the epidermis and cuticle. Varieties having a thick epidermis/cuticle are generally more resistant to the disease than those with a thin epidermis/cuticle. In the light of similar findings reported earlier in other crops, it may be inferred that resistance to leaf spot disease in mulberry cultivars is mostly governed by thickness of cuticle and epidermis.

REFERENCES

- ASHOK KRISHNA S., MISHRA P., HAKIM SINGH (1987), Thickness of cuticle and epidermis in relation to slow powdery mildewing in pea. *Indian Phytopath.*, 40(2), 218-221.
 HILU G.F., STELLWAAY-KITTLER, SCHIOSSER E. (1980), Substrate surface and appressoria formation by *Botrytis cinerea*. *Phytopath. Z.*, 99, 186-196.
 KUMAR RAJ, JAIN V.B., PANDEY J.C. (1983), Morphological nature of disease resistance in winged bean cultivars to *Phoma sorghina*. *Int. J. Trop. Plant Dis.*, 3(1), 57-62.

- LEISLE D. (1974), Genetics of leaf pubescence in drum wheat. *Crop Sci.*, 14(2), 173-174.
- MELANDER L.W., CRAIGE J.H. (1927), Nature of resistance in *Berberis* sp to *Puccinia graminis*. *Phytopath.*, 17, 95-114.
- McKINNEY H.H. (1923), Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *J. Agr. Res.*, 26, 195-210.
- MOHANTY C.R., GANGOPADHYA (1983), Association of anatomical characters in the neck region with resistance for neck blast. *Indian Phytopath.*, 36(3), 496-502.
- PHILIP R., DEVADATH S. (1980), Relation between some leaf characters and the occurrence of bacterial blight of rice. *Riso.*, 29, 317-322.
- SIKDAR A.K., KRISHNASWAMY S. (1980), Assessment of leaf yield loss of the two mulberry varieties due to leaf spot. *Indian J. Seric.*, 19, 9-12.
- SUZUKI H., FUJITA Y. (1977), The effect of number of *Pyricularia oryzae* spores on the action for penetration and the lesion development. *Trans. Mycol. Soc. Japan*, 18, 385-390.
- YANG S.L. (1972), Cuticle layer as a determining factor for the formation of mature appressoria of *Erysiphe graminis* on wheat and barley. *Phytopath.*, 62, 708-714.

INCIDENCE DE LA MALADIE DE LA TACHE EN FONCTION DE L'ÉPAISSEUR DE L'ÉPIDERME ET DE LA CUTICULE CHEZ CERTAINES VARIÉTÉS LOCALES DE MURIERS

GOVINDAIAH, T. PHILIP, K. SENGUPTA, K. GIRIDHAR & N. SURYANARAYANA

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

*La maladie de la tache causée par *Cercospora moricola* est l'une des plus importantes maladies foliaires du mûrier. L'incidence de cette maladie dépend de divers facteurs dont la nature des cellules épidermiques de la feuille. Cet article présente l'étude de l'incidence de la maladie de la tache chez 25 variétés locales du mûrier en fonction de l'épaisseur de la cuticule et de l'épiderme. Ces variétés, ayant une cuticule ou un épiderme épais, se sont révélés plus résistantes à la maladie.*

INTRODUCTION

Le mûrier est affecté par différentes maladies causées par des champignons, des bactéries, des virus et des nématodes. Parmi ces maladies, la maladie de la tache causée par *Cercospora moricola* Cooke est une des plus importantes, provoquant la perte de 10 à 12 % de la production de feuilles durant la saison des pluies (Sikdar et Krishnaswamy, 1980). L'incidence de la maladie dépend de nombreux facteurs tels que les saisons, la température, l'humidité, la variété de mûrier, les pratiques culturales et les caractéristiques anatomiques de la feuille. Les caractères anatomiques tels que l'épaisseur de la cuticule et de l'épiderme, la fréquence stomatique et la pubescence jouent un rôle important sur l'incidence et l'intensité de la maladie. La corrélation entre les caractères anatomiques et l'incidence de la maladie a été remarquée par de nombreux auteurs sur diverses récoltes (Kumar Raj et coll., 1983 ; Mohanty et Gangopadhya, 1983 ; Leisle, 1979 ; Hilu et coll., 1980 ; Philip et Devadath, 1980). Chez le mûrier, l'étude de l'incidence de la maladie en fonction de ses caractères anatomiques n'a pas été faite jusqu'à présent. C'est pourquoi la corrélation entre l'épaisseur de l'épiderme et de la cuticule - chez 25 variétés locales de mûrier cultivé - et l'incidence de la maladie de la tache fait l'objet de cette étude. Les observations sont rapportées ici.

MATERIELS ET METHODES

25 variétés locales du mûrier cultivé dans une collection au CSR & TI de Mysore ont été sélectionnées pour cette étude. Pour l'étude anatomique de la feuille, les 5^{ème} et 6^{ème} feuilles (agées de 30 jours) à partir du bourgeon ont été prélevées parmi différents plants ; des coupes ont été effectuées à la main à partir du milieu de la lamina, à l'exclusion de la nervure centrale. Les coupes ont été colorées avec de la safranine aqueuse et montées dans 20 % de glycérine. La moyenne de tous ces caractères a été calculée à partir d'un minimum de 25 observations sur différentes coupes.

L'incidence de la maladie a été enregistrée à intervalles réguliers, après son plus haut degré de développement, en sélectionnant au hasard 5 plants dans chaque variété. Le nombre total de feuilles malades et saines a été relevé pour chaque plant sur 3 branches sélectionnées, ceci afin de déterminer

le pourcentage d'incidence de la maladie, selon la méthode FAO d'évaluation de la maladie des plantes à différents degrés (Mickinney, 1923).

$$\% \text{ incidence de la maladie} = \frac{\text{somme des valeurs numériques} \times 100}{\text{nombre total de feuilles observées} \times \text{degré maximum (5)}}$$

Les valeurs numériques sont obtenues en multipliant le nombre de feuilles par leurs degrés respectifs comme indiqué ci-dessous :

1. 0% de surface foliaire infectée : totalement résistant
2. 0-5% de surface foliaire infectée : résistant
3. 5-20 % de surface foliaire infectée : moyennement résistant
4. 20-50 % de surface foliaire infectée : moyennement sensible
5. 50-100% de surface foliaire infectée : hautement sensible

RESULTATS ET DISCUSSION

Les variétés Kaliakutthai et Bilidevalaya se sont révélées totalement résistantes à la maladie de la tache. Les variétés telles que MR 1, Jodhpur, Br-C 799, MR 2, MS 7, MS 5, ACC 153, OPH 3, MS 8, Assamabola, Moulai, MS 2, K 2 et S 54 se sont révélées résistantes ; S 741, S 41, Cuckpilla, MS 6, Jatinuni, Local, S 30, Sujapur et Br-C 763 moyennement résistantes.

L'incidence de la maladie a été étudiée en fonction de l'épaisseur de l'épiderme et de la cuticule (tableau I). Les variétés totalement résistantes comme Kakiakutthai et Bilidevalaya ont des épidermes épais et, comparativement, des cuticules minces. Toutes les variétés résistantes, à l'exception de S 54, ont soit la cuticule ou l'épiderme épais, soit les deux. De même, à l'exception de Cuckpilla et S 741, toutes les autres variétés moyennement résistantes ont, comparativement, soit la cuticule ou l'épiderme plus mince, soit les deux.

Une corrélation existe donc - et ceci chez la plupart des variétés étudiées - entre l'intensité de la maladie de la tache et l'épaisseur de la couche de la surface foliaire. Cependant, il est difficile de déterminer la couche offrant le plus de résistance ou de sensibilité. Chez les variétés telles que Br-C 763, S 30 et Sujapur - chez lesquelles les deux couches sont plus minces - l'incidence de la maladie est maximum. Ceci semble indiquer que l'épaisseur des deux couches - épiderme et cuticule - joue un rôle également important pour le développement de la maladie.

Il est probable qu'une cuticule ou un épiderme épais retarde la germination des spores de *Cercospora moricola* ou la pénétration des hyphes infectieux, réduisant ainsi le taux de développement de la maladie.

Une telle corrélation entre l'incidence de la maladie et l'épaisseur de l'épiderme et de la cuticule a été relevée pour d'autres cultures (Melander et Craigie, 1927 ; Ashok et coll., 1897). Yang (1972) a également remarqué que la cuticule joue un rôle déterminant pour la formation d'appressoriums matures chez *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*, ce qui pourrait ralentir le développement du champignon. Cependant, il se peut qu'une sensibilité moindre soit due à la capacité d'infection et à la production d'inoculum réduites, car l'on sait que le potentiel d'inoculum est en corrélation avec l'intensité de la maladie (Suzuki et Fujita, 1977). L'épaisseur de la cuticule et de l'épiderme peut affecter tour à tour ces facteurs et amener à une croissance lente de l'agent pathogène. Il a également été observé dans cette étude que l'intensité de la maladie de la tache causée par *Cercospora moricola* varie en fonction de l'épaisseur de l'épiderme et de la cuticule. Les variétés ayant une cuticule ou un épiderme épais sont généralement plus résistantes à la maladie que celles ayant une cuticule ou un épiderme mince. A la lumière de résultats identiques obtenus antérieurement sur d'autres cultures, on peut conclure que la résistance des mûriers cultivés est principalement due à l'épaisseur de la cuticule et de l'épiderme.

CHANGES IN TOTAL PHENOLICS OF TUKRA-AFFECTED MULBERRY PLANTS

MUTHE GOWDA*, M. SANTA KUMARI, N.N. UMESH KUMAR & G. BORAIAH

Department of Sericulture, Bangalore University, P.K. Block, Bangalore - 560009, India.

Changes in total phenolics in tukra-affected and healthy leaves of mulberry variety C15 (Conoor series) were studied. The pattern of phenol accumulation varied. There was an initial increase followed by a sudden decrease from the leaf of the 2nd order to the 10th order. The tukra-affected leaves had more phenolics as a result of insect bite.

Keywords : Mulberry, tukra, phenolics, silkworm disease.

INTRODUCTION

Mulberry leaves form the basic food for silkworms. Like all other economic crops mulberry is also attacked by various insect pests. The damage caused by them varies. Due to the pest menace the quality of the leaf deteriorates and becomes unfit for silkworm rearing. Also, leaf yield per unit reduces considerably.

In recent years the leaf curling of the growing shoot tips of mulberry plant is the most common and widespread method in India and elsewhere. In recent days, this has been noticed in Karnataka State which produces 80 % of the total mulberry silk in India (Anonymous, 1987). This disease is popularly called "tukra". It is characterized by severe curling and crinkling of the leaves of the apical shoots, swelling and twisting of apical internodes. The leaf area decreases and becomes dark green resulting in stunted growth of the plant. The causal organism is an insect, *Maconellicoccus hirsutus* (commonly called mealy bug), belonging to the class Pseudococcidae which sucks the sap of the young stem, leaves and petiole. Due to this the metabolism of the host gets altered (Tanganami and Vivekanandan, 1983).

The disease causes considerable damage to the mulberry crops from November to March. After one or two showers the plants affected resume normal growth (Anonymous, 1986). This is due to the disappearance of mealy bugs.

In phytophagous insects, besides cellular and humoral immunity, other chemical factors present in the food also play an important role in determining their resistance to infection. Iizuka (1983) has demonstrated that dehydroxyphenols of mulberry leaves such as chlorogenic acid could be the precursor of caffeic acid, a predominant antibacterial substance present in the digestive juice of silkworm larvae. So the quality and quantity of phenolics in mulberry leaves play an important role in impounding resistance and susceptibility in silkworms. The present study was undertaken to find out the possible changes in total phenolics in tukra-affected mulberry leaves.

* Lecturer, Department of Botany, V.V. Pura College of Science, K.R. Road, Bangalore - 560 004, India.

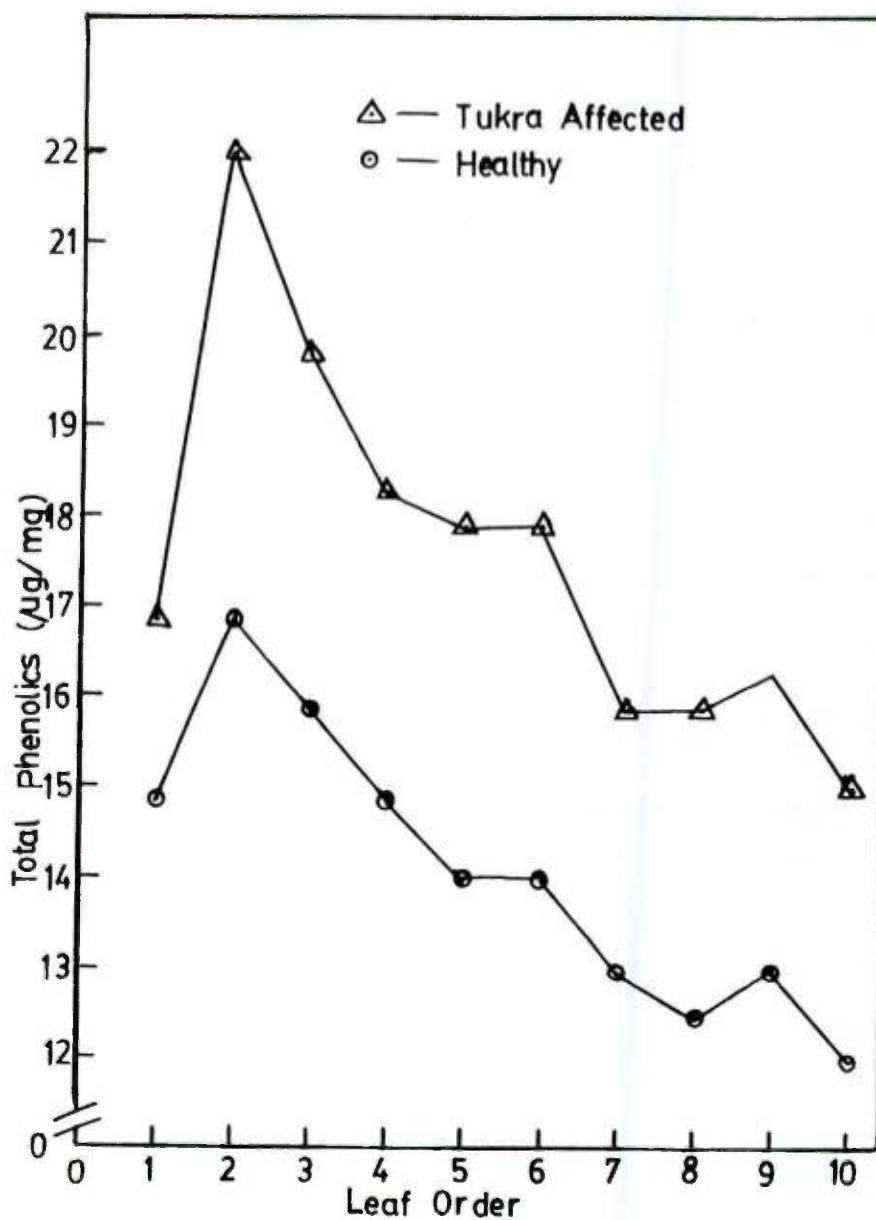


Fig. 1 : Changes in total phenolics of tukra-affected mulberry leaves.

Fig. 1 : Variations du taux de phénols chez les feuilles de mûrier contaminées par la tukra.

MATERIALS AND METHODS

The mulberry germ plasm bank which was recently pruned and had started sprouting at Jnanabharathi Campus (Bangalore) was selected for the present study. Healthy and tukra-affected twigs of mulberry variety C15 (Conoor series) having ten leaves each were selected. In the tukra-affected twig 4th, 5th and 9th order leaves were normal while the remaining ones were tukra-affected. Leaves samples were oven-dried and powdered. The plant material was extracted in methanol and total phenolics was estimated (Swain and Hills, 1959). The data were reported as $\mu\text{g}/\text{mg}$ equivalent to caffeic acid per mg dry weight.

RESULTS AND DISCUSSION

The amount of total phenolic increase and decrease in healthy and tukra-affected mulberry twigs are given in Figure 1. The pattern of increase and decrease is almost identical in healthy and tukra-affected twigs. The results clearly showed an initial increase in total phenolics in the leaves of the 2nd order and a sudden decrease from the 2nd to the 5th order in healthy and tukra-affected twigs. Further, no change in total phenolics was noticed in the 5th and 6th order leaves and there was a sudden decrease from the 9th to 10th order leaves in healthy and tukra-affected twigs. The pattern of phenolic content in normal leaves (4th, 5th and 9th order leaves) of tukra-affected twigs resemble the leaves of healthy twigs. Figure 1 clearly shows that there was an accumulation of total phenolics in the tukra-affected leaves as compared to the healthy ones.

The changes in phenolics compounds were reported as a result of almost every infection and are implicated as a resistant factor in a number of host pathogen combinations (Kosuge, 1969 ; Purushotham, 1975). It thus appears that they may be playing some important role in the host pathogen defence mechanism (Uritani, 1961). The foregoing observations from figure 1 revealed that the total phenolics differed in leaves of healthy and tukra-affected twigs. The leaves affected had more phenolics as a result of insect bite. This clearly shows that these mealy bugs certainly altered the phenolic metabolism in the host leading to so many bio-chemical changes. The accumulation of phenolics in the host may inactivate the enzymes which thus inhibit the further advance of the pathogenic organism by limiting its sources of nutrients (Uritani, 1961). The most important phenolic compounds implicated in the defence of plants against pathogens are coumaric acid, phloretin, umbelliferons, caffeic acid, chlorogenic acid and ferulic acid (Agrios, 1969). When such substances are ingested by the phytophagous insect along with food, the insect gets access to the natural defence mechanism.

Tukra-affected mulberry leaves were analysed chemically in our laboratory and elsewhere (Tangamani and Vivekanandan, 1983) increase in the total chlorophyll, soluble proteins and total phenolics and decrease in total soluble sugars were noticed. So tukra-affected mulberry leaves can be profitably utilized in silkworm rearing instead of discarding them.

ACKNOWLEDGEMENTS

The senior author is grateful to University Grants Commission, New Delhi, and Bangalore University, Bangalore, for the award of Teacher Fellowship under F.I.P.

REFERENCES

- AGRIOS G.M. (1969), Plant defence against pathogen. Biochemical defence. *In* Plant pathology. Ed. G.N. Agrios, Academy Press. New York.
- ANONYMOUS (1986), Annual report. C.S.R. & T.I., Mysore.
- ANONYMOUS (1987), Silkmans companion. Central Silk Board, Bangalore.
- IIZUKA T. (1983), Studies on the bacterial flora in the midgut and on the antibacterial activity in the digestive juice of larvae of silkworm, *Bombyx mori* L. *Sericologia*, 23(4), 227-244.
- KOSUGE T. (1969), The role of phenolics in host response to infection. *Ann. Rev. Phytopath.*, 7, 195-222.

- PURUSHOTHAM D. (1975), Changes in phenolic compounds in rice varieties as influenced by *Xanthomonas oryzae* infection. II Riso., 25, 55-89.
- SWAIN T., HILLS W.O. (1959), The phenolic constituents in *Prunus domestica*. The quantitative estimation of phenolic constituents. J. Sci. Food & Agric., 10, 63-65.
- URITANI I. (1961), The role of plant phenolics in disease resistance and immunity. In G. Janson & T.A. Geissman (Eds.) Sym. Plant phenolic substances. Colorado State University, Ford, Colling, 98-124.
- THANGAMANIR., VIVEKANANDAN M. (1983), Effective utilization of tukra diseased mulberry leaves as silkworm, *Bombyx mori* L. feeding. Sericologia, 23(4), 211-223.

VARIATIONS DES TAUX DE PHÉNOLS CHEZ LES PLANTS DE MURIERS ATTEINTS DE TUKRA

MUTHE GOWDA*, M. SANTA KUMARI, N.N. UMESH KUMAR & G. BORAIAH

Department of Sericulture, Bangalore University, P.K. Block, Bangalore - 560009, Inde.

Les variations des taux de phénols dans les feuilles de mûriers contaminées et saines de la variété C15 (série de Conoor) ont été étudiées. Le mode d'accumulation des phénols varie. On constate une augmentation initiale puis une baisse soudaine chez les feuilles du deuxième au dixième ordre. Les feuilles atteintes de Tukra ont plus de phénols conséquemment à l'attaque par des insectes.

INTRODUCTION

Les feuilles de mûriers constituent la nourriture de base des vers à soie. Comme toutes les autres cultures, les mûriers sont également affectés par divers parasites. Les dommages causés par ces derniers varient. La présence de ces parasites entraîne une détérioration de la qualité de la feuille et celle-ci devient impropre pour le nourrissage des vers à soie. De plus, le rendement de feuilles par unité est aussi considérablement réduit.

Au cours de ces dernières années le recroquevillement des scions des plants de mûriers est très répandu en Inde et dans les autres pays. Ceci a été constaté dans l'état du Karnataka qui produit 80 % de la soie mûrier en Inde (Ann. 1987). Cette maladie est appelée "Tukra". Elle se caractérise par un recroquevillement et une torsion des feuilles des bourgeons apicaux. La surface de la feuille diminue, devient vert foncé et aboutit à un arrêt de la croissance de la plante. Le responsable est un insecte, *Maconellicoccus hirsutus* (appelé communément cochenille des serres), appartenant à la classe des pseudococcidés, qui sucent la sève des jeunes tiges, des feuilles et des pétioles. Cela entraîne une modification du métabolisme de l'hôte (Tanganami et Vivekanandan, 1983).

Cette maladie provoque des dommages considérables sur la récolte de mûriers de novembre à mars. Après une ou deux averses, la plante contaminée retrouve une croissance normale (Anonyme, 1986). Ceci s'explique par la disparition des insectes.

Chez les insectes phytophages, outre l'immunité humorale et cellulaire, d'autres facteurs chimiques présents dans l'alimentation jouent un rôle dans la détermination de la résistance à une infection. Iizuka (1983) a démontré que les déhydroxyphénols contenus dans les feuilles de mûriers tels que l'acide chlorogénique, peuvent être les précurseurs du suc caféique, une substance antibactérienne prédominante présente dans le suc digestif des larves de vers à soie. Ainsi, la qualité et la quantité de phénols dans les feuilles de mûriers jouent un rôle important sur la résistance et la sensibilité du ver à soie. Cette étude a pour but de démontrer les variations possibles du taux de phénols dans les feuilles de mûriers atteintes de Tukra.

* Professeur, Department of Botany, V.V. Pura College of Science, K.R. Road, Bangalore 560 004, Inde.

MATERIELS ET METHODES

Des mûriers provenant de la collection de Jnanabharathi (Bangalore) ont été sélectionnés pour cette étude. Des pousses saines et infectées de Tukra des variétés de mûriers C15 (série de Conoor) ayant chacune dix feuilles ont été sélectionnées. Chez les pousses infectées de Tukra, les 4ème, 5ème et 9ème feuilles étaient normales alors que les autres étaient infectées. Les échantillons de feuilles ont été séchés au four et pulvérisés. Ce matériel a été extrait dans du méthanol et le phénol total a été mesuré (Swain et Hills, 1959).

Les données sont présentées en $\mu\text{g}/\text{mg}$, correspondant à l'équivalent en acide caféique par mg de poids sec.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'augmentation et la diminution du taux de phénol total dans les pousses infectées de Tukra sont représentées dans la figure 1. La courbe d'augmentation et de diminution est quasi identique chez les pousses saines et infectées. Les résultats montrent clairement une augmentation initiale de phénol total chez les 2èmes feuilles et une baisse des 2ème au 5ème pour les feuilles saines et malades. On ne constate pas de changement en phénol total dans les 5ème et 6ème feuilles mais on note une baisse soudaine dans les 9ème et 10ème feuilles aussi bien chez les feuilles saines que malades. La courbe du contenu en phénol dans les feuilles normales (4ème, 5ème et 9ème feuilles) des pousses malades ressemble à celui des feuilles des pousses saines. La figure 1 montre clairement qu'il y a une accumulation de phénol total chez les feuilles infectées de Tukra par rapport aux feuilles saines.

Une modification dans les composés en phénol apparaît chez toutes les feuilles infectées et intervient comme facteur de résistance dans un grand nombre de combinaisons hôte-parasite (Kosuge, 1969 ; Purushotham, 1975). Il semble donc qu'ils jouent un rôle important dans le mécanisme de défense hôte-parasite (Uritani, 1961). Les observations faites sur la figure 1 montrent que le phénol total est différent dans les pousses saines et dans les pousses infectées. Les feuilles infectées présentent un taux plus élevé de phénol dû aux morsures des insectes. Ceci montre clairement que les cochenilles altèrent le métabolisme phénolique chez l'hôte provoquant de nombreux changements bio-chimiques. L'accumulation de phénol chez l'hôte neutralise les enzymes qui, ainsi, inhibe le développement des organismes parasites en limitant ses sources nutritionnelles (Uritani, 1961). Les composés phénoliques les plus importants défendant les plantes contre les agents parasites sont l'acide coumarique, la phlorétine, l'umbelliféron, l'acide caféique, chlorogénique et férulique (Agrios, 1969). Lorsque ces substances sont ingérées par l'insecte phytophage en même temps que la nourriture, l'insecte a accès au mécanisme de défense naturel.

Les feuilles de mûrier infectées de Tukra ont été analysées chimiquement dans nos laboratoires et en extérieur (Tangamani et Vivekanandan, 1983) ; on a pu constater une augmentation de la chlorophylle totale, des protéines solubles et des phénols totaux et une diminution des sucres solubles. Les feuilles de mûriers atteintes de Tukra peuvent donc être utilisées pour l'élevage des vers à soie.

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 : 2^{ème} trimestre 1990