

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)
COUBLE P. (France)
DATTA R.K. (Inde / India)
DOIRA H. (Japon / Japan)
FOURCHE J. (France)
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. (Japon / Japan)
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)
XIA J-G. (Chine / China)

SOMMAIRE - CONTENTS

Hommage à André SCHENK	i-xi
Tribute to André SCHENK	

Informations	603
Announcement	604

Revues / Reviews

Sericulture research and its impact in India	605
La recherche en sériciculture et ses répercussions en Inde	617
R.K. DATTA, S.N. CHATTERJEE	

Research on polyploidy and polyploid breeding of mulberry in China	625
Recherches sur la polyplodie et la sélection de polyplodes chez le mûrier en Chine	631
YANG J.-H., YANG X.-H.	

Articles originaux / Original papers

Preparation and rapid fractionation of a silk gland cell-free protein extract : Preliminary investigations of the protein-binding properties of the P25 gene 5'-flanking sequences	635
Préparation et fractionnement rapide d'un extrait protéique acellulaire de glandes séricigènes : Etudes préliminaires des interactions ADN-protéines en amont du gène de P25	657
J.R. DREVET, P.M. COUBLE	

Effect of gibberellic acid on the economic parameters of the silkworm, the Pure Mysore breed of <i>Bombyx mori</i> L.	667
Effet de l'acide gibberellique sur les paramètres économiques de la souche Pure Mysore du ver à soie <i>Bombyx mori</i> L.	677
S.B. MAGADUM, M.A. HOOLI	

A few observations on the host-parasite interaction between the uzifly, <i>Exorista sorbillans</i> (Wiedemann) (Diptera : Tachnidae) and its host, <i>Bombyx mori</i> L. (Lepidoptera : Bombycidae)	681
Quelques observations sur l'interaction parasite-hôte entre la mouche uzi <i>Exorista sorbillans</i> (Wiedemann) (Diptera : Tachinidae) et son hôte <i>Bombyx mori</i> L. (Lepidoptera : Bombycidae)	689
R. GOVINDARAJU, B. SARATCHANDRA	

Pollen germination and pollen tube growth of mulberry as influenced by triazole compounds	693
Influence des composés triazoles sur la germination du pollen et la croissance du tube pollinique chez le mûrier	699
V.M. SREEDHAR, M.P. SHREE, G. BORAI AH	

Histopathological and histochemical changes in mulberry (<i>Morus alba</i> L.) powdery mildew due to infection by <i>Phyllactinia corlyea</i> (Pers) Karst.	703
Modifications histopathologiques et histochimiques chez le mûrier (<i>Morus alba</i> L.) atteint par l'oïdium causé par <i>Phyllactinia corylea</i> (Pers) Karst.	709
G.C. VIJAYAKUMAR	

Notes brèves / Brief notes

Influence of kenchu virus infection in some strains of silkworm, <i>Bombyx mori</i> L., on deterioration of cocoon parameters	713
Influence du virus de kenchu sur la détérioration des paramètres du cocon chez certaines souches du ver à soie <i>Bombyx mori</i> L.	717
R.N. BASHKAR, R. GOVINDAN, M.C. DEVAIAH, R. MUNIRAJAPPA	

Screening of some mulberry varieties against <i>Phloespora</i> leaf spot disease of mulberry under Kahsmir conditions	719
Sélection de certaines variétés de mûrier résistantes à la maladie de la tache <i>Phloespora</i> dans les conditions du Cachemire	725
N.A. MUNSHI, M.A. ZARGAR, T.N. TANKI, A.H. LONE	

Dyeing silk with vegetable dyes. II. Mulberry plant extracts	727
Teinture de la soie avec des extraits végétaux. II - Extraits de mûrier	733
M.K. VIJAYEENDRA, B.R. YADAKAR YADAV, V.V. HADIMANI	

Bibliographie / Bibliography	737
---	------------



† André SCHENK

(1912-1991)

EDITORIAL

André Schenk est décédé le 18 novembre 1991. Notre organisation lui doit son existence même puisqu'il en fut le Secrétaire général fondateur. Dans le message qu'il a adressé à notre Conférence de Paris en décembre 1990, il souhaitait que "l'esprit scientifique domine l'avenir du ver à soie afin de progresser :

- dans la technologie séricicole pour satisfaire toujours mieux la "faim de soie" dans le monde ;
- dans les travaux si variés qui sont réalisés en prenant le ver à soie comme "type biologique" ;
- dans l'utilisation optimale de la glande séricigène du ver à soie pour des applications biotechnologiques."

Ce message, que je perçois aujourd'hui comme ses dernières volontés pour la CSI, a été entendu et je n'oublierai pas ces souhaits qui constituent comme un programme pour l'action du Secrétaire général dans les prochaines années.

Son action a été telle depuis 1948, aussi bien en France que dans le monde entier, que de nombreuses personnes, membres ou non de la CSI, ont été affectées par la disparition d'André Schenk.

Ce numéro de Sericologia est dédié à sa mémoire et trois personnalités que tous les membres de la CSI connaissent bien lui rendent hommage dans les pages qui suivent.

Ces trois personnalités ont été de très proches collaborateurs d'André Schenk pendant de nombreuses années et sont donc les mieux placées pour témoigner de son action et honorer sa mémoire. Il s'agit du Dr Bouvier qui a été son adjoint au Secrétariat de la CSI, du Professeur Vago et du Professeur Legay qui ont travaillé sous sa direction à la Station séricicole d'Alès.

Gérard CHAVANCY,
Secrétaire général de la CSI,
Rédacteur en chef de Sericologia.

EDITORIAL

André Schenk died on 18th November 1991. Our organization owes him its very existence since he was its founding Secretary-General. In the message he sent to our Conference in Paris in December 1990, he wished 'the scientific spirit to govern the future of the silkworm in order to progress :

- in sericultural technology to satisfy the world-wide "hunger for silk" ;
- in the widely varied work which is carried out using the silkworm as a "biological model" ;
- in the optimal use of the silk gland of the silkworm for biotechnological application.'

This message, which I perceive today as his last will for the ISC, was heard and I will not forget these wishes which make up a programme for the action of the Secretary-General in the coming years.

His action had been so important since 1948, both in France and world-wide, that many people, ISC members or not, were affected by André Schenk's death.

This issue of Sericologia is dedicated to his memory and three personalities, whom all the ISC members know well, pay tribute to him in the following pages.

These three persons had been very close colleagues of André Schenk for many years and are therefore in the best position to give an account of his work and to honour his memory. These are Dr Bouvier, who used to be his deputy at the ISC Secretariat, Prof. Vago and Prof. Legay, who worked under his leadership at the Sericultural Station of Alès.

Gérard CHAVANCY,
ISC Secretary-General,
Editor of Sericologia.

HOMMAGE A ANDRE SCHENK
TRIBUTE TO ANDRE SCHENK

André Schenk nous a quitté le 18 novembre 1991 à l'âge de 79 ans. Toute sa vie professionnelle a été consacrée au ver à soie et à la sériciculture.

Dès sa sortie de l'Ecole nationale d'Agriculture de Montpellier, il entre, en 1936, à la Station séricicole d'Alès, dirigée alors par Ch. Secretain, auquel il succèdera en 1946.

C'est à son initiative que se réunira à Alès en 1948 le VIIe Congrès séricicole international où sont représentés tous les pays séricicoles sans aucune exclusive.

A la suite de ce Congrès, en vue de préparer de nouvelles rencontres, est créée la Commission permanente des congrès séricicoles qui se transformera bientôt en une organisation intergouvernementale, la Commission séricicole internationale (CSI).

Reconnu par tous les Etats-membres comme le "Fondateur", il est élu et réélu sans interruption au poste de Secrétaire général jusqu'en 1979.

C'est sous sa direction que le Secrétariat général de la CSI publie la "Revue du Ver à Soie - Journal of Silkworm" qui se transforme en 1978 et prend son titre actuel "Sericultoria".

Il crée également le Prix Louis Pasteur, décerné par la CSI et destiné à honorer des scientifiques ou des techniciens ayant contribué au développement de la sériciculture dans le monde.

Malgré la fermeture de la Station d'Alès, fin 1977, et, bien qu'à la retraite, A. Schenk s'intéresse toujours à tout ce qui touche la sériciculture en France : Président d'honneur du Syndicat national des Sériculteurs, animateur ou conseiller de nombreuses associations locales et régionales, il participait encore quelques jours avant son décès à des activités séricicoles.

Dr Henri BOUVIER,
Secrétaire général honoraire.

André Schenk departed on 18th November 1991 at the age of 79. His entire professional life was devoted to the silkworm and sericulture.

As soon as he left the National School of Agriculture of Montpellier, he entered the Sericultural Station of Alès in 1936, then run by Ch. Secretain, whom he succeeded in 1946.

On his initiative, the 7th International Sericultural Congress convened in Alès in 1948, a congress where all the sericultural countries, without exception, were represented.

Further to this Congress, with a view to preparing new meetings, the Permanent Commission of International Congresses was created and soon transformed into an intergovernmental organization, the International Sericultural Commission (ISC).

Recognized by all the Member States as the 'Founder', he was consistently elected and re-elected at the post of Secretary-General until 1979.

Under his leadership, the ISC Secretariat-General published the 'Revue du Ver à Soie - Journal of Silkworm' which was modified in 1978 and took its present title, 'Sericultoria'.

He also created the Louis Pasteur Prize, awarded by the ISC and intended for scientists or technicians who contributed to the development of sericulture world-wide.

Despite the Station of Alès being closed in late 1977 and although retired, A. Schenk still kept an interest in all that concerned sericulture in France : Honorary Chairman of the National Union of Sericulturists, organizer of or advisor to many local and regional societies, he was still engaged in sericultural activities a few days before he died.

Dr Henri BOUVIER,
Honorary Secretary-General.

Parallèlement à sa large activité dans les domaines économiques relatifs à la sériciculture, M. Schenk était un grand initiateur de l'acheminement de cette industrie vers une conception technologique moderne. En restructurant la Station séricicole INRA d'Alès et en créant des programmes de recherches internationaux, il a tenu à appréhender les problèmes de l'élevage industriel par des approches scientifiques et biotechnologiques de base.

Une perspective liée au Ver à soie, à laquelle il était particulièrement attaché, était celle de la considération de cet insecte comme un "modèle" biologique expérimental pour les études fondamentales en biologie, en génétique et en pathologie. De telles disciplines ont effectivement eu récemment un large développement, notamment à la suite des travaux de certains de ses collaborateurs.

L'enseignement des techniques et des aspects biologiques de la sériciculture a été l'une de ses préoccupations majeures et ceci aussi bien à l'attention des éleveurs qu'à celle des techniciens des pays des zones tropicales et subtropicales. De même, dans les laboratoires de sa Station, de nombreux jeunes scientifiques de différents pays ont acquis leur formation à la recherche biologique.

Ces activités si diversifiées ont toujours été imprégnées de la personnalité cordiale, bienveillante, enthousiaste et conviviale de M. Schenk : l'image que conserveront de lui tous ceux, très nombreux et dispersés sur tous les continents, qui avaient avec lui des relations professionnelles ou des liens amicaux.

Prof. C. VAGO,
Membre de l'Institut.

In addition to his extensive activity in the economic domains relating to sericulture, Mr Schenk was a great initiator and lead this industry towards a modern technological conception. By reorganizing the INRA Sericultural Station of Alès and developing international research programmes, he was anxious to tackle the problems raised by industrial rearing through basic scientific and biotechnological approaches.

A prospect linked to the silkworm and to which he used to attach great value was that of the silkworm considered as an experimental biological 'model' for basic studies in biology, genetics and pathology. Such subjects have indeed recently had a wide development, particularly further to the work of some of his colleagues.

Teaching the techniques and biological aspects of sericulture was one of his chief concerns, both towards rearers and technicians in tropical and subtropical areas. Likewise, in the laboratories of his Station, many young scientists from various countries acquired their training in biological research.

These varied activities have always been suffused with Mr Schenk's warm, good-natured, enthusiastic and convivial personality. This is the image that will be retained by the many, scattered over all the continents, who had professional relationships or friendly ties with him.

Prof. C. VAGO,
Member of the Institute.

Au moment de rendre un dernier hommage à André Schenk, il me semble qu'on doit se souvenir de la situation de la recherche scientifique française à la sortie de la guerre en 1945.

Car le premier mérite d'André Schenk a certainement été de profiter de la réunion du VII^e Congrès séricicole international pour provoquer le développement d'une véritable recherche scientifique sur le Ver à soie, à un moment où beaucoup de travaux étaient jusqu'alors restés techniques. La création d'une Commission séricicole internationale, qui a favorisé les échanges (informations, missions) entre les pays concernés, a été jugée très opportune par de nombreux pays. Ceux-ci lui sont restés très reconnaissants de cette initiative.

Le deuxième mérite, qui est aussi le souvenir de tous ceux qui ont eu affaire avec André Schenk, le souvenir, en particulier, de ses collaborateurs à la Station de l'INRA consacrée au Ver à soie à Alès, c'est certainement l'enthousiasme avec lequel il abordait les problèmes qui lui étaient posés. Tous ceux qui ont travaillé dans cette période difficile d'après guerre savent la quantité d'énergie qu'il fallut dépenser pour remettre en place un potentiel de recherche qui avait été à peu près complètement détruit ou désorganisé. C'est dans ce contexte qu'il faut rendre hommage aux qualités d'André Schenk qui a contribué de façon significative, à sa place et dans son domaine, à une remarquable période de développement scientifique et technique.

Prof. Jean-Marie LEGAY,
Université Claude-Bernard, Lyon I.

In paying our final respects to André Schenk, I feel that one must recall the situation of the French scientific research at the end of the war in 1945.

For André Schenk's greatest credit was certainly to take advantage of the meeting of the 7th International Sericultural Congress to bring about the development of proper scientific research on the silkworm at a time when much of the work remained technical. The establishment of an International Sericultural Commission, which furthered exchanges (information, assignments) between the countries concerned, was considered as very relevant by many countries which remained very grateful to him for this initiative.

His second credit, which is also the memory of all those who had dealings with André Schenk, in particular the memory of his colleagues of the INRA Silkworm Station in Alès, was certainly the enthusiasm with which he tackled the problems raised. All those who have worked during this difficult period just after the war know how high an amount of energy had to be spent to restore a research potential which had been almost entirely destroyed or disrupted. Within this context, one has to pay tribute to André Schenk's qualities. He contributed significantly, in his position and in his field, to a remarkable period of scientific and technical development.

Prof. Jean-Marie LEGAY,
Université Claude-Bernard, Lyon I.



André SCHENK

Dessin de Robert Legay, 1948.

Drawing by Robert Legay, 1948.

INFORMATIONS

Le Comité exécutif de la Commission séricicole internationale du 31 octobre 1991 a élu les **Présidents de Sections** suivants :

- **Section Mûrier** : Brésil, non communiqué.
- **Section *Bombyx mori*** : Dr Yoshiki OHTSUKI, Department of Insect Genetics and Breeding, National Institute of Sericultural and Entomological Science, Owashi-1, Tsukuba, Ibaraki 305, Japon.
- **Section Vers à Soie non mûrier** : Mr Jacob THOMAS, Project Co-ordinator, Central Silk Board, 39, United Mansions, II Floor, Mahatma Gandhi Road, Bangalore - 560 001, Inde.
- **Section Bacologie** : Prof. Jean-Marie LEGAY, URA CNRS n° 243, Biométrie, Génétique et Biologie des Populations, Université Claude-Bernard - Lyon 1, 43, boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.
- **Section Filature et Artisanat** : Mrs Chanya PANNENGPET, Agricultural Researcher, P.C. Level 7, Nakhonratchasima Sericultural Research Center, Mittraphap Road, Nakhonratchasima 30000, Thaïlande.
- **Section Economie et Développement** : Dr Hassan Aly KEDHR, Sous-Secrétaire d'Etat à l'Economie agricole, Ministère de l'Agriculture, Dokki, Giza, Egypte.

Ces personnalités animeront les sections correspondantes lors du prochain congrès international de la CSI en 1993 et, à ce titre, feront la sélection des interventions orales pour le congrès.

D'autre part, entre les congrès, les Présidents de section sont chargés de proposer au Secrétariat et au Comité exécutif de la CSI des thèmes de rencontres scientifiques dans le domaine de leur section. Ces thèmes, qui doivent être très délimités, seront soumis au Secrétariat général. Les colloques, symposiums, ateliers ainsi retenus ne seront ouverts qu'aux spécialistes du sujet (un petit nombre de participants).

Toutes propositions ou suggestions de telles réunions scientifiques et techniques doivent être adressées aux **Présidents** de section.

ANNOUNCEMENT

The International Sericultural Commission Executive Committee of 31st October 1991 has elected the following **Section Leaders** :

- **Mulberry Section** : Brazil, not known.
- ***Bombyx mori* Section** : Dr Yoshiki OHTSUKI, Department of Insect Genetics and Breeding, National Institute of Sericultural and Entomological Science, Owashi-1, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
- **Non Mulberry Silkworm Section** : Mr Jacob THOMAS, Project Co-ordinator, Central Silk Board, 39, United Mansions, II Floor, Mahatma Gandhi Road, Bangalore - 560 001, India.
- **Bacology Section** : Prof. Jean-Marie LEGAY, URA CNRS no. 243, Biométrie, Génétique et Biologie des Populations, Université Claude-Bernard - Lyon 1, 43, boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.
- **Reeling and Craftsmanship Section** : Mrs Chanya PANNENGPET, Agricultural Researcher, P.C. Level 7, Nakhonratchasima Sericultural Research Center, Mittraphap Road, Nakhonratchasima 30000, Thailand.
- **Economics and Development Section** : Dr Hassan Aly KEDHR, Under-Secretary of State to Agricultural Economics, Ministry of Agriculture, Dokki, Giza, Egypt.

These persons will lead the corresponding sections during the next ISC international congress in 1993 and will therefore make the selection of the oral presentations for the congress.

In addition, between congresses, the Section Leaders will have to propose topics for scientific meetings in the field of their section to the ISC Secretariat and Executive Committee. These topics, which should be strictly defined, will be submitted to the Secretariat-General. The gatherings, symposia and workshops thus organized will be open only to specialists in the topic in question (a small number of participants).

All proposals or suggestions for scientific and technical meetings as described above should be made to the Section Leaders.

SERICULTURE RESEARCH AND ITS IMPACT IN INDIA

R.K. DATTA & S.N. CHATTERJEE

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

INTRODUCTION

Other than China, India has the oldest tradition of sericultural practices and has the proud privilege of having a wide fauna of sericigenous insects and the flora of their food plants. India is the only country having the tradition of utilising four silkworm varieties : mulberry silkworm (*Bombyx mori* L.), tasar (*Antheraea mylitta* D.), muga (*Antheraea assamensis*) and eri (*Philosamia cynthia ricini*). Formerly, prior to the 19th century, sericultural practices were mostly confined to northern and eastern India and only during later period, it spread to Southern Peninsula (Mukherjee, 1898 ; Nanavaty, 1965).

With reference to organised research endeavour in India during the British period, it may be said that there were certain attempts initially by the industry itself. The publication of a detailed sericulture manual in Indian language (Bengali) in 1894 is such an example. The manual had three major parts, i.e. the Mulberry and Silkworm, Disease of Silkworm and Mulberry Plant and the Commercial Cocoon. The same manual was later translated into English by the then Director of the Department of Land Records and Agriculture (in 1896), British India, for the sericulturists both in India and the British Colonies. It is also of interest to note that as early as 1800, a sericultural school was in operation in Rampur Boalia (the then Bengal Province) "with the object of training cocoon-rearers in the art of avoiding silkworm epidemics, and it is giving very good work in disseminating the knowledge derived from the experiments" (Mukherjee, 1898).

There were several other research endeavours, initiated by British India ; however, these attempts were mostly isolated and short-lived. The data presented in Table 1 show a rough estimate of export of silk fabrics to the British and French Colonies 100 years back.

R & D ENDEAVOUR IN INDEPENDENT INDIA

It is only in independent India that a concerted effort has been initiated for research in sericulture. As a first step, the Government of India constituted the Central Silk Board under the Ministry of Commerce in 1949. To promote the main research endeavours in all the fields of sericulture, the Central Silk Board later on took over the Research and Training Schools of Berhampore, West Bengal (estd : 1943) as also Mysore and started building a nationwide R & D infrastructure.

R & D ORGANISATION IN SERICULTURE IN INDIA TODAY

Today, in India, the existing R & D organisation can be grouped into 3 categories : Central Research and Training Institutes and their satellites, i.e. those under direct administrative control of the Central Silk Board, the research institutes under the Directorate of Sericulture of the respective State Governments and a limited number of laboratories of selected Universities. However, under the present status, the All India Sericulture Research Co-ordination Committee (AISRCC) organised by

the Central Silk Board is the final body to monitor all the sericultural research projects proposed in the country.

Table I. Export of silk fabric from India to other countries.

Tableau I. Exportation de tissus de soie d'Inde vers l'étranger.

Country Pays	In 1876 1876 (Yards)	In 1890 1890 (Yards)
England / Angleterre	1,328,229	1,430,850
France / France	470,902	723,776
Persia / Perse	20,709	23,427
Arabia / Arabie	267,389	64,964
Egypt / Egypte	18,907	8,163
Turkey / Turquie	61,365	29,117
Indochina / Indochine	119,607	17,342
Ceylon / Ceylan	61,721	10,968
Mauritius / Maurice	53,108	12,971

(From Mukherjee, 1898 / D'après Murkherjee, 1898)

The R & D organisations of the Central Silk Board are presented in Table II. As is evident, two main research institutes look after the problems of mulberry sericulture. Of these two institutes, the institute at Mysore is presently considered as the premier research institute because of the infrastructure developed and also for the fact that the institute is presently looking after the interest of 4 southern states (Karnataka, Andhra Pradesh, Tamilnadu and Kerala), contributing about 89 % of the total production in the country.

Mulberry silk contributes about 90 % of the total silk production in the country and obviously thus, the major research thrust is on mulberry sericulture. Nonetheless, due attention is given on the other sectors too (Tasar, Eri and Muga) as these are important for tribal development, afforestation, maintenance of ecological balance and forest resources. Accordingly, attention is paid to the R & D programmes connected with the use of the above silkworm species in India. Besides, development programmes like Interstate Tasar Development Project and Muga Seed Development Project have been implemented in non-mulberry sericultural areas.

INTRODUCTION OF OAK TASAR IN INDIA

As an example of due thrust in the non-mulberry sector, the introduction of Oak Tasar is cited. In the 1970's, a new hybrid combination was raised from a cross between *Antheraea roylei* (from the sub-himalayan belt) and *Antheraea pernyi* (Chinese Tasar). This was named *Antheraea proylei* (Jolly), and introduced as an Indian "Temperate Tasar" for utilising the natural flora of Oak species abundant in North-west and North-eastern India.

Table II. Present R&D organisation of the Central Silk Board.

Tableau II. Organisation actuelle de la Recherche et du Développement du Central Silk Board.

Sl. no. <i>N° de série</i>	Main institute / Regional Stations <i>Principaux instituts / Stations régionales</i>	Year of establishment/ Re-organisations <i>Année de création/ réorganisation</i>	No. of RSRS* <i>Nombre de RSRS*</i>	No. of RECs** BSMTCs*** <i>Nbre de REC** BSMTC***</i>
1	Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore (CSRTI)	1943 (1970)	3	17
2	Central Sericultural Research & Training Institute, Mysore (CSRTI)	1961	5	27
3	Central Tasar Research & Training Institute, Ranchi (CTRTI)	1964	7	43
4	Central Silk Technological Research Institute, Bangalore (CSTRI)	1982	-	6
5	Germplasm Station Hosur, Tamilnadu	1989	-	-
6	Silkworm Seed Technology Laboratory Bangalore (SSTL)	1989-90	-	-
7	Seribiotech, Bangalore	To be established <i>En projet</i>	-	-
Regional stations / Stations régionales				
1	Regional Sericultural Research Station Pampore (J & K)	1958	-	7
2	Regional Sericultural Research Station Majra (UP)	1973	-	3
3	Regional Muga Reseach Station Mirza (Assam)	1972	-	4
4	Regional Sericultural Research Station Jorhat (Assam)	1972	-	5

* Regional Sericultural Research Station / *Station régionale de Recherches séricicoles.*** Research Extension Centre / *Centre de transfert de la Recherche.**** Basic Seed Multiplication & Training Centre / *Centre de Formation et de Production de Graines.*

PRODUCTIVITY OF INDIAN SILK : R & D IMPACT

As indicated above, mulberry being the major contributor to the total silk production, major emphasis has to be given on mulberry silk alone. As is evident from data presented in Table III, total production in the first 20 years since independence, showed 81 % increase but the productivity (raw silk/hectare) increased by only 19.7 %. The next decade showed 138.5 % increase in total production over that in 1969-70, while the productivity increased by 48 %. Subsequently, during 1989-90, the increase in productivity remained almost the same (about 44.1 %) against 156.5 % increase in total production.

Table III. Overview of production and productivity of mulberry silk in India during 40 years.

Tableau IV. Production et productivité globales de la soie mûrier en Inde pendant 40 ans.

Year <i>Année</i>	Production / <i>Production</i>		Productivity / <i>Productivité</i>	
	Cocoons <i>Cocons</i> (× 1000 MT)	Raw silk <i>Soie grège</i> (MT)	Renditta <i>Rendement</i> <i>à la bassine</i>	Raw silk / ha <i>Soie grège/ha</i>
1949-50	16.0	969 (100)**	-	15.0
1969-70	26.57	1,758 (181)	15.1	17.9
1979-80	55.90	4,193 (433)	13.3	26.5
1989-90*	110.19	10,756 (1,110)	10.24	38.2

The figures in parentheses indicate the growth index of raw silk from the base year / *Les chiffres entre parenthèses indiquent l'indice de croissance de la soie grège par rapport à l'année de base.*

From : Datta, 1990 / *D'après Datta (1990).*

** Includes tasar silk also / *Comprend également la soie tasar.*

The increase in productivity by 48 % during 1979-80 obviously points towards a major breakthrough in Research and Development. Different analyses show that breakthroughs were in the improvement in mulberry production, evolution of superior silkworm breeds and a more scientific way of rearing silkworms, improvement in silk reeling (Krishnaswami *et al.*, 1973 ; Krishnaswami, 1988a, 1988b ; Datta, 1989).

ECONOMICS OF SERICULTURE IN INDIA

Under tropical conditions and in countries having a low GNP, mulberry sericulture in particular is more remunerative than other agricultural crops. While to make a profit in most of the agricultural crops, one needs to have a large land holding ; on the contrary, a sericultural farmer with a much smaller land holding makes a substantial profit. Further of significance is the proper utilisation of family labour and participation of womanfolk in the production process. Comparative evaluation of the net income per ha/year for several crops and the mulberry are presented in Table IV.

Table IV. Mulberry gives higher return.

Tableau IV. Le mûrier donne de meilleurs revenus.

Agricultural crops <i>Cultures</i>	Net income (ha/year) <i>Revenu net (ha/année)</i>
Rainfed conditions* / Sans irrigation*	(Rs.) / (Roupiés)
Ragi + pulses / <i>Ragi + légumineuses</i>	2,500.00
Jowar + pulses / <i>Jowar + légumineuses</i>	1,750.00
Hybrid jowar / <i>Jowar hybride</i>	3,000.00
Coriander + pulses + horsegram <i>Coriandre + légumineuses + graminées</i>	3,750.00
Groundnut / <i>Arachide</i>	3,750.00
Maize / <i>Maïs</i>	2,500.00
Mulberry / <i>Mûrier</i>	4,500.00
Irrigated conditions / Avec irrigation	
Paddy / <i>Riz non décortiqué</i>	3,750.00
Hybrid maize / <i>Maïs hybride</i>	6,250.00
Sugar cane / <i>Canne à sucre</i>	7,500.00
Potato / <i>Pomme de terre</i>	7,500.00
Mulberry (improved cross) <i>Mûrier (croisement perfectionné)</i>	13,250.00
Mulberry (bivoltine hybrids) <i>Mûrier (hybrides bivoltins)</i>	16,000.00

Ref. : A handbook for Sericulture Extension Workers, CSRTI, 1990.

* Rainfed conditions of Karnataka (rainfall : 18"-20")

* *Etat du Karnataka (pluviométrie : 18"-20")*.

NEW MULBERRY VARIETIES AND CULTIVATION

India traditionally used to cultivate the mulberry variety having very small leaves with lobation. The research endeavours were found successful in introducing new varieties like Kanva2, S1, S54, C776 and S779. These high-yielding varieties are adapted to local conditions and are good in rooting. Further, against the close system of mulberry plantation (known under the name of Kolar plantation), a new package with pit system and wider spacing has helped not only in increasing the production of mulberry, but also contributed towards the improvement of the quality of mulberry leaves. A brief resume of research impact on mulberry cultivation is presented in Table V.

NEW SILKWORM BREEDS

Traditionally, Indian sericultural farmers are in the habit of rearing low-yielding silkworm varieties like Chotopat, Nistari, Desipalu, Cheenapalu, etc. (19th and early 20th centuries). Even during the 1960's, the breeds mostly used were Nistari, Pure Mysore, C. 'Nichi and Sarupat, in single or in hybrid combinations. However, records also show the use of bivoltine breeds in good seasons, e.g. Baropalu. As is evident from Table VI, in later periods the idea of using cross-breeds gained a

new momentum and, besides increase in production, the quality of the silk is also improved to a certain extent (as is evident from the renditta). CSRTI, Mysore, has evolved many bivoltine breeds, out of which three breeds, viz. NB7, NB18 and NB4D2 became highly popular along with Kalimpong-A developed by CSRTI, Berhampore, West Bengal, in the field of south India.

The idea of exploiting bivoltine races in India was tested during the British period and also again in a very systematic way during the 1970's. However, as it stands today, for the reasons detailed later on, production of bivoltine hybrid cocoons for bivoltine silk is still restricted to certain specific isolated pockets.

Table V. Impact of mulberry varieties.

Tableau V. Impact des variétés de mûrier.

Variety (under pit system) <i>Variété (en système de parcelles)</i>	Improvement in yield/ha over local variety (%) <i>Amélioration en rendement/ha sur les variétés locales (%)</i>
S30	63.16
S36	84.21
S41	56.32
S54	86.32
Kanva2	31.53
S799 (West Bengal)	27.36
S1 (West Bengal)	23.20
C776 (West Bengal)	26.65
Local : Mysore : 12 tonnes (Traditional system of plantation) (<i>Système traditionnel de plantation</i>)	
Local : Bengal : 14 tonnes	

Note : In West Bengal, the growth period of the plants is shortened due to winter.

Dans le Bengal occidental, la période de croissance des plantes est plus courte en raison de l'hiver.

NEW REARING TECHNOLOGY

Through the course of experience, farmers developed certain practices of rearing, but these were in accordance with the needs of the low-yielding silkworm varieties and lower socio-economic conditions of Indian peasantry. The introduction of new mulberry varieties and new silkworm breeds with a higher yield potential obviously requires modification in the rearing technology. This led the scientists towards detailed research on the different aspects of silkworm rearing and, accordingly, packages were developed for rearing improved silkworm breeds (Krishnaswami, 1988a, 1988b). This includes the specification for feed/instar, space, environment, rearing apartments, rearing trays, egg incubation and egg handling also.

Table VI. Improvement in cocoon quality through silkworm breeds*.

Tableau VI. Amélioration de la qualité des cocons par la sélection*.

Year Année	Race/hybrid Race ou hybride	Yield/100 dfls Rendement pour 100 pontes saines (kg)	Silk content Richesse soyeuse (%)	Renditta Rendement à la bassine
Southern states / Etats du sud				
1950-60	PM × C.'Nichi	15-20	14	16-18
	PM × HS6			
1960-70	PM × J ₁₁₂	20-25	16	14-16
	PM × C ₁₀₈			
	PM × C ₁₁₀			
1970-72	PM × KA	25-30	17	12-13
	PM × NN _{6D}			
W.B. plains / Plaines du Bengal occidental				
1800 ca	Nistari	13-80	11	13
1980-83	G	26	14	10
1983-85	N × G	27	14	11
1985-86	N × KB	42-46	17	9
1986-87	PM × NB ₇ (Jaya)	35	15	10
Hill areas of West Bengal / Collines du Bengal occidental				
1970	P5 × KB	47	20	8
1985	NB ₁₈ × NB ₇	56	20	8
Southern states / Etats du sud				
1972-78	PM × NB _{4D2}	30-35	17	10-11
1978-80	PM × NB ₁₈	35-40	18	9-10
1970-72	KA × NB _{4D2}	30-35	18	10
1973-78	KA × NB ₄₈	40-45	19	8-9
1978-80	NB ₁₈ × NB ₇	45-50	20	7-8
1984-86	PCN × Biv.	18-22	17	8-9
	(Rainfed / Sans irrigation)**			
1984-87	MY ₁ × NB ₁₈	38-42	19	8-9

* Field trial of Breed combinations recommended Research Institutes of CSB / Expériences sur le terrain de croisements de sélection, d'après les recommandations des Instituts de Recherche CSB.

** For Kanataka State only / Etat du Karnataka uniquement.

CROP PROTECTION

The productivity/unit area is also dependent on the packages developed by the research institutes for protecting the silkworm crop from pests and diseases. The uzifly (*Exorista sorbillans* W.) is the main pest of silkworm which causes big damage to silkworm crops each year. Scientists of CSRTI, Mysore, have developed a few control measures to contain the damage significantly. These are :

- 1) Applications of China Clay (lavigated) with lime spread on the spinning larvae.

- 2) Uzicide (1 % benzoic acid) to kill the eggs laid by the uzifly.
- 3) Dusting of dimilin (10 %) on uzi maggots/pupae to sterilise male and female uziflies.
- 4) A good number of hyper-parasites (Hymenopteran) have been identified which feed on uzi maggots/pupae.

The integrated pest control mechanism has been developed in the institute and the same is implemented in the nearby villages to study the efficacy of the system to contain the population of the uzifly. Scientists of CSRTI, Mysore, have been able to develop a dusting material (Reshamkeet Oushadh) as bed disinfectant against diseases like grasserie and muscardine. This formulation has been manufactured by 7 companies in the Southern States and this has helped in protecting the crop and thereby improving the returns to the farmers.

POST-COCOON TECHNOLOGY

Scientists working under CSB Research Organisation have also helped in improving the economics of sericulture by their contribution in improving the technology for stifling the cocoons, cooking as also reeling. The innovation like ushnakothi (hot air stifling chamber), or smokeless chula, has also helped in saving the fuel and improving upon the working conditions in the reeling establishment.

The traditional country charka is well adapted to the traditional multivoltine breeds of India. However, the introduction of improved breeds and their hybrids has generated the need for improving upon the country charka. Accordingly, the reeling machines have been developed to suit the prevalent status of the industry. Results showed that with modified multiend reeling machines, our bivoltine silk shows certain characters comparable to grade A of international standard.

R & D CONTRIBUTION IN THE FIELD OF NON-MULBERRY SILK PRODUCTION

As indicated earlier, in India, three other silkworm species are also under commercial exploitation. Of these, in the context of demand of Indian silk on the world market, the tropical tasar is most important because of its natural hue, rough texture and antique look. During the last 40 years, scientists have been able to give a proper industrial organisational structure to the production of tasar cocoons and silk. The major contributions in this direction are "the evolution of new acclimatised silkworm varieties, evolution of the package for block plantation for outdoor silkworm rearing, establishment of the organisation for production of quality seed using three tier multiplication system, development of reeling machines for tasar cocoon and also introduction of spinning on earthenware vessels in place of thigh reeling".

Muga, the golden silk, is only restricted to Brahmaputra valley (Assam) and is a highly cherished material. Scientists have helped in raising block plantation of the food plants for muga to improve upon the productivity. Mention should also be made of the improvement in the reeling machinery for muga cocoons as also of the spinning machinery for eri cocoons developed by the Indian scientists.

PRESENT STATUS OF INDUSTRY AND THE NEED FOR NEW BREAKTHROUGHS

India today produces about 11,700 MT of mulberry silk and about 1,200 MT of non-mulberry silk and, accordingly, claims the position of the second largest producer in the world. However, it is also true that in India itself, the deficit amounts to roughly 1,000 MT. However, the socio-economic conditions of our country, the policies of its Government, the natural environment and the expertise gained through age-old tradition obviously marks India as the best contender to fill up the gap in the world production.

NEED FOR FURTHER BREAKTHROUGHS (In silkworm breeding and genetics)

Today in India, the major limitation is that more than 85 % of its total production of mulberry silk comes from the low-yielding multivoltine or multi $\times$ bivoltine hybrids and, thus, obviously is of low international grade. Whereas, to achieve the desired improvement in the quality of the silk produced, the exploitation of bivoltine hybrids is essential. Moreover, the absolute yield potential of the bivoltine hybrids is much higher than the others but this potential cannot be realised today. This aspect has been clarified by the yield gap analysis (Datta, 1988). The analysis reveals that the bivoltine hybrids have a much lower adaptability to our situation in comparison to that realised from multivoltine crosses or multi $\times$ bivoltine crosses and the overall analysis suggests :

a) that multivoltine breeds/strains, especially the traditional races (e.g. Nistari, Pure Mysore, Sarupat, Moria, C.'Nichi) have genetic endowment more adaptive to the low management of silkworm rearing available in our country ;

b) for India, being a poor country, it is extremely difficult to provide the matching infrastructure and management conditions essential for successful exploitation of yield potential of bivoltine breeds and strains, either exotic or those evolved here.

These aspects have led to the identification of the following areas of advanced research wherein major breakthroughs are urgently needed (Chatterjee and Datta, 1989) :

i) Understanding of the molecular basis of the "hardiness" or higher adaptability of the low-yielding multivoltine silkworm breeds.

ii) Identification of biochemical/physiological parameters correlated with the survival and other yield components.

iii) The molecular mapping of the silkworm genome for identifying the chromosome segments contributing to yield components and also to the factors responsible for higher hardiness.

iv) Better understanding of the molecular basis of the immunity response in mulberry and non-mulberry (wild/semi wild) silkworm.

v) Development of the suitable gene transfer system in silkworm.

vi) Developing ultimate *modus operandi* for germ-line transformation in silkworm for the necessary genetic manipulation between multivoltine and bivoltine silkworm breeds.

DISEASE CONTROL AND MONITORING

Socio-economic conditions prevalent, unequal economic development in rural areas and age-old tradition are the major obstacles in the way of creating ideal rearing management situation and the hygienic status required for rearing bivoltine silkworm breeds and hybrids. Complementary to the attempt towards improving the survival potential of the improved silkworm breeds through breeding, efforts were also made to come out with accurate and cost-effective methods of early and correct diagnosis for diseases like pebrine (*Nosema bombycis*), NPV and CPV. The latex bead agglutination test with the polyclonal antibody raised against the *Nosema* spores has already been standardised and the Government of India has taken a collaborative programme with the National Institute of Immunology for kit development.

Thus, in this area, the following research breakthroughs are urgently needed to further increase the cost-effectivity of the sericultural package for Indian farmers :

i) Development of diagnostic kit based on latex agglutination or colour coded enzyme reaction for correct identification of virulent *Nosema* infection.

ii) Development of diagnostic kit for the nuclear polyhedrosis virus (NPV) causing significant losses to silkworms.

iii) Development of diagnostic kit for the flacherie virus at chawki rearing stage.

MULBERRY CULTIVATION AND PRACTICES

As indicated earlier, the mulberry varieties evolved and the packages developed definitely helped the sericultural farmers to improve upon their productivity. Nonetheless, enough scope exists for further improvement in the cost-effectivity of cultivation package (a) by way of improving upon the nutritive quality of the mulberry ; (b) by reducing the fertiliser input through the use of the biofertiliser ; (c) more economical use of water and using alternative plantation system.

CSRTI, Mysore, has given due attention to these aspects and agronomists have been able to establish the existence of specific mycorrhizal association with mulberry root. Simultaneously, experiments during the last two years showed the possibility of using *Azotobacter* and *Azospirillum* to reduce the nitrogen input by about 50 % without affecting the yield of the mulberry leaf.

The same institute is also engaged in working out the full package for cultivating mulberry as medium, high trees in slopy terrain of Eastern and Western Ghats.

Towards improving the nutritive quality of the mulberry to suit the need of bivoltine silkworm, it is necessary to combine the exotic mulberry genotype with that of the indigenous. For this, research endeavour has been initiated for developing technology for somatic hybridization through protoplast fusion.

REARING TECHNOLOGY AND INNOVATION

With the spread of sericulture from traditional areas to non-traditional zones and also to suit the changes realised in our country it has become necessary to develop separate package for low-cost rearing houses to rear adult silkworms and also rearing houses for chawki rearing. The institute at Mysore has already contributed towards developing certain model rearing houses using either RCC construction or low-cost construction based on the available cheap building materials like stones, mud, coconut/palm leaves, etc.

However, with the introduction of sericulture in the farms with larger land holdings and for other relevant reasons, it has become necessary to develop low-cost temporary/semi-permanent sheds for late-age rearing. This is an area where the institute is presently working and is also trying to absorb the technologies developed by Japan and other countries like China and Brazil.

In the rearing management sector special emphasis on the aseptic rearing condition and development of artificial diet for young age silkworms appears pertinent.

SERI-BIOTECHNOLOGY : NEW R & D FRONTIER IN SERICULTURE

The tool of molecular biology has been of service to applied biology today, in a large way. The word **Biotechnology** today has become a household word and is truly in service for the quantum improvement in the industrial output, be it a fermentation industry or agro-industry. The Government of India has also considered sericulture as an appropriate priority field for developing biotechnological research infrastructure in India. Accordingly, the establishment of the laboratory of Seribiotech at Bangalore is in the offing. The institute, at its primary stage, is expected to have 3 major laboratories : Molecular Genetics Laboratory, Laboratory for Vector Development and Laboratory for Germline Transformation.

The future projection for seribiotechnological research includes short-term projects for development of diagnostic kit for diseases, biological control for uzi menace and also long-term projects on the improvement in the egg production potential of non-mulberry silkworm, development of better immunity response (higher germload) tolerance for the productive silkworm breeds, introgressing "resistance genes" in mulberry for controlling nematode infection and ultimately providing cost-effective *modus operandi* to improve the quality of the Indian silk and to help India in commensurating the deficit in the global silk production.

REFERENCES

- CHATTERJEE S.N., DATTA R.K. (1989), The growth and importance of biotechnology : An overview. *Indian Silk*, 28(3), 60-67.
- DATTA R.K. (1988), Indian Sericulture - Past, Present and Future. Proc. Int. Congress on Tropical Sericulture Practices. Bangalore, India, Feb., 18-23.
- DATTA R.K. (1990), Improving the Productivity of Indian Silk. Brainstorming Workshop on Biotechnology in Sericulture. New Delhi, India, Jan., 5-6.
- KRISHNASWAMI S., NARASIMHANNA M.N., SURYANARAYANA S.K., KUMARARAJ S. (1973), Manual of Sericulture. Vol. 2. Silkworm Rearing. UN FAO, Rome.
- KRISHNASWAMI S. (1988a), Development of an appropriate technology in India for tropical sericulture. Int. Congr. on tropical Sericulture Practices. Bangalore, India, Feb., 18-23.
- KRISHNASWAMI S. (1988b), Chawki - The crucial input for the success of the sericulture. *Indian Silk*, 26(1), 82-87.
- MUKHERJEE N.G. (1898), *Handbook of sericulture*. Bengal Secretariat Book Depot, Calcutta, India.
- NANAVATY M.M. (1965), *Silk from grub to glamour*. Paramount Publishing House, Bombay, India.

LA RECHERCHE EN SERICICULTURE ET SES REPERCUSSIONS EN INDE

R.K. DATTA & S.N. CHATTERJEE

Central Sericultural Research & Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura,
Mysore - 570 008, Karnataka, Inde.

INTRODUCTION

L'Inde a la plus ancienne tradition, après la Chine, en matière de pratiques séricicoles et le privilège de disposer d'une faune variée d'insectes séricigènes et de la flore de leurs plantes nourricières. L'Inde est le seul pays qui utilise traditionnellement quatre variétés de vers à soie : le ver à soie du mûrier (*Bombyx mori*), le ver à soie tasar (*Antheraea mylitta* D.), le ver à soie muga (*Antheraea assamensis*) et le ver à soie Eri (*Philosamia ricini*). Autrefois, avant le XIX^e siècle, les pratiques séricicoles étaient limitées principalement au nord et à l'est de l'Inde et c'est seulement par la suite qu'elles se sont étendues à la péninsule méridionale (Mukherjee, 1898 ; Nanavaty, 1965).

En ce qui concerne la recherche organisée pendant la période britannique, on peut dire qu'un certain nombre de tentatives ont été lancées par l'industrie elle-même. La publication d'un manuel détaillé de sériciculture en langue indienne (bengali) en 1894 en est un exemple. Ce manuel comportait trois parties principales : le ver à soie et le mûrier, la maladie du ver à soie et du plant de mûrier et le cocon commercial. Ce même manuel fut plus tard traduit en anglais par le Directeur du Department of Land Records and Agriculture (en 1896), Indes britanniques, pour les sériciculteurs d'Inde et des colonies britanniques. Il est également intéressant de noter que, dès 1800, une école séricicole existait à Rampur Boalia (alors Province du Bengal) ayant pour objectif de "former des éleveurs de cocons à l'art d'éviter les épidémies de vers à soies, cette école réalise un excellent travail de diffusion de la connaissance acquise à partir des expériences" (Mukherjee, 1898).

Il y eut plusieurs autres projets de recherche sur l'initiative des Indes britanniques ; cependant, ces projets furent pour la plupart isolés et de courte durée. Les données présentées dans le tableau I donnent une estimation des exportations des tissus de soie vers les colonies britanniques et françaises au siècle dernier.

LA RECHERCHE ET LE DEVELOPPEMENT EN INDE APRES SON INDEPENDANCE

C'est seulement après son indépendance que l'Inde a pu fournir des efforts concertés en matière de recherches séricicoles. Dans un premier temps, le Gouvernement indien créa le Central Silk Board, sous tutelle du Ministère du Commerce en 1949. Afin de promouvoir les recherches dans tous les domaines liés à la sériciculture, le Central Silk Board reprit par la suite les écoles de recherches et de formation de Berhampore, Bengal occidental, (fondée en 1943) et de Mysore, puis commença à établir une infrastructure Recherche et Développement à l'échelle nationale.

ORGANISATION DU SECTEUR RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT EN INDE AUJOURD'HUI

A l'heure actuelle, le secteur Recherche et Développement en Inde est réparti sur trois structures : les Central Sericultural Research & Training Institutes et leurs satellites, c'est-à-dire les instituts sous tutelle directe du Central Silk Board, les instituts de recherche sous tutelle du Directorate of Sericulture de leurs gouvernements locaux respectifs et un nombre limité de laboratoires d'universités sélectionnées. Cependant, d'après les statuts actuels, le All India Sericulture Research Co-ordination Committee (AISRCC) organisé par le Central Silk Board est l'organe de décision finale sur tous les projets de recherches proposés dans le pays.

Les structures Recherche et Développement du Central Silk Board sont présentées dans le tableau II. Comme on peut le constater, deux instituts de recherches principaux traitent des problèmes liés à la sériculture mûrier. L'institut de Mysore est considéré comme le plus important de ces deux instituts en raison des infrastructures qui y sont développées et du fait que cet institut a maintenant la charge des intérêts de quatre Etats du sud (Karnaka, Andhra Pradesh, Tamil Nadu et Kerala), ce qui représente environ 89 % de la production totale du pays.

La soie mûrier constitue environ 90 % du total de la production nationale de soie ; la primeur est donc tout naturellement donnée à la recherche liée à la sériculture mûrier. Néanmoins, on poursuit également des recherches dans les autres secteurs (tasar, eri et muga) et ce, à juste titre, car ceux-ci sont importants pour le développement des populations locales, la reforestation, le maintien de l'équilibre écologique et des ressources forestières. Les programmes Recherche et Développement liés à l'utilisation de ces espèces sont donc également suivis. En outre, des programmes de développement, comme le Interstate Tasar Development Project et le Muga Seed Development Project, ont également été mis sur pied dans les régions de sériculture non-mûrier.

INTRODUCTION DU TASAR DU CHENE EN INDE

L'exemple de l'introduction du ver à soie du chêne illustre bien la volonté de recherche dans le secteur non-mûrier. Dans les années 1970, une nouvelle combinaison hybride a pu être obtenue par croisement entre *Antheraea roylei* (de la ceinture sub-himalayenne) et *Antheraea pernyi* (tasar chinois). Celle-ci fut dénommée *Antheraea proylei* (Jolly) et introduite en Inde comme "tasar tempéré" afin d'utiliser la flore naturelle des différentes espèces de chênes qui abondent dans le nord-ouest et le nord-est de l'Inde.

PRODUCTIVITE DE LA SOIE INDIENNE : REPERCUSSIONS DU SECTEUR R & D

Comme on l'a dit plus haut, le mûrier étant la principale source de la production totale de soie, les recherches ont essentiellement porté sur la soie mûrier. Comme le montre les données présentées dans le tableau III, la production totale a augmenté de 81 % dans les 20 premières années qui ont suivi l'indépendance ; mais la productivité (soie grège/hectare) n'a augmenté que de 19.7 %. Pour la décennie suivante, on note une augmentation de 138.5 % de la production totale par rapport à celle de 1969-70, tandis que la productivité augmentait de 48 %. Par la suite, en 1989-90, l'augmentation de la productivité est restée à peu près identique (environ 44.1 %) tandis que la production totale augmentait de 156.5 %.

L'augmentation de 48 % de la productivité en 1979-80 est la conséquence d'une découverte majeure dans le secteur R & D. Différentes analyses montrent que les percées sont dues à l'amélioration de la production de mûriers, l'obtention de souches supérieures de vers à soie, une façon plus scientifique d'élever les vers à soie et au perfectionnement du dévidage de la soie (Krishnaswami et coll., 1973 ; Krishnaswami, 1988a, 1988b ; Datta, 1989).

L'ECONOMIE SERICICOLE EN INDE

Dans des conditions tropicales et dans des pays à faible PNB, la sériciculture mûrier en particulier est plus rentable que les autres cultures. Pour réaliser un profit dans la plupart des cultures, il est nécessaire de disposer de vastes terres agricoles ; tandis qu'un sériciculteur avec une petite surface de terrain peut réaliser un profit substantiel. Il est important de signaler l'utilisation adéquate du travail familial et la participation des femmes dans le processus de production. L'évaluation comparative du revenu net par hectare/an pour plusieurs cultures et pour le mûrier est présentée dans le tableau IV.

NOUVELLES VARIETES DE MURIERS ET LEUR CULTURE

L'Inde cultivait traditionnellement une variété de mûrier avec de très petites feuilles lobées. Les recherches ont permis d'implanter avec succès de nouvelles variétés comme Kanva 2, S1, S54, C776 et S779. Ces variétés performantes sont adaptées aux conditions locales et racinent facilement. De plus, par rapport au système fermé de plantation des mûriers (connu sous le nom de plantation Kolar), un nouveau système comportant des parcelles et des espacements plus grands a permis non seulement d'augmenter la production de mûrier, mais a également contribué à améliorer la qualité des feuilles de mûrier. Un bref résumé des répercussions de la recherche sur la culture des mûriers est présenté dans le tableau V.

NOUVELLES VARIETES DE VERS A SOIE

Par tradition, les sériciculteurs indiens élevaient des variétés de vers à soie à faible rendement comme Chotopat, Nistari, Desipalu, Cheenapalu, etc. (XIXe et début XXe siècle). Même au cours des années soixante, les souches les plus utilisées étaient Nistari, Pure Mysore, C. Nichi et Sarupat, en combinaisons simples ou hybrides. Cependant, on trouve également mention de l'utilisation de souches bivoltines (par exemple, Baropalu) pendant les saisons propices. Comme le montre le tableau VI, l'idée d'utiliser des hybrides prit par la suite un nouvel élan et permit, outre l'augmentation de la production, l'amélioration, dans une certaine mesure, de la qualité de la soie (comme le montre le rendement à la bassine). Le CSRTI de Mysore a développé de nombreuses souches bivoltines dont trois, NB7, NB18 et NB4D2, sont maintenant couramment utilisées, ainsi que Kalimpong-A développé par le CSRTI de Berhampore, Bengal occidental, dans les fermes de l'Inde du sud.

L'idée d'exploiter des races bivoltines en Inde fut mise en pratique pendant la période britannique et également de façon très systématique au cours des années soixante-dix. Cependant, sous sa forme actuelle, pour les raisons détaillées plus bas, la production de cocons hybrides bivoltins pour obtenir de la soie bivoltine est essentiellement restreinte à certaines zones spécifiques isolées.

NOUVELLE TECHNOLOGIE D'ELEVAGE

A mesure qu'ils acquerraient de l'expérience, les fermiers développèrent certaines méthodes d'élevages, mais celles-ci correspondaient aux besoins des variétés de vers à soie peu performantes et aux faibles conditions socio-économiques des sériciculteurs indiens. L'introduction de nouvelles variétés de mûriers et de nouvelles souches de vers à soie à potentiel plus performant a évidemment nécessité de modifier la technologie de l'élevage. Ceci a conduit les scientifiques à entreprendre des recherches détaillées sur les différents aspects de l'élevage des vers à soie et des méthodes furent donc mises au point pour l'élevage de souches de vers à soie perfectionnées (Krishnaswami, 1988a, 1988b). Celles-ci comprennent la spécification du nourrissage/âge, de l'espace, de l'environnement, des pièces d'élevage, des litières, de l'incubation des oeufs ainsi que de la manipulation des oeufs.

PROTECTION DES ELEVAGES

La productivité/unité dépend également des méthodes mises au point par les instituts de recherches pour protéger les élevages des parasites et des maladies. La mouche uzi (*Exorista*

sorbillans W.) est le principal parasite du ver à soie et cause chaque année de nombreux dommages aux élevages. Les chercheurs du CSRTI de Mysore ont développé quelques méthodes de lutte pour contenir les dommages de manière significative. Celles-ci sont :

- 1) Application d'argile de Chine (laviguée) avec de la chaux, étalée sur les larves fileuses.
- 2) Utilisation d'uzicide (acide benzoïque à 1 %) pour tuer les oeufs pondus par la mouche uzi.
- 3) Vaporisation de dimilin (10 %) sur les asticots uzi pour stériliser les mouches mâles et femelles.
- 4) On a identifié un grand nombre d'hyperparasites (hyménoptères) qui se nourrissent d'asticots uzi.

Le mécanisme intégré de lutte contre les parasites a été développé à l'institut et instauré dans les villages voisins afin d'étudier l'efficacité de ce système contre la population uzi. Les chercheurs du CSRTI de Mysore ont réussi à mettre au point un produit à vaporiser (Reshamkeet Oushadh) à utiliser comme désinfectant de litière contre certaines maladies comme la grasserie et la muscardine. Ce produit est fabriqué par 7 sociétés des Etats du Sud et contribue à la protection des élevages, améliorant de ce fait les revenus des fermiers.

TECHNOLOGIE EN AVAL DU COCON

Les chercheurs de l'organisme de recherche du Central Silk Board ont également aidé à l'amélioration de l'économie séricicole en contribuant au perfectionnement de la technologie d'étouffage, de cuisson et de dévidage des cocons. Des innovations telles que l'ushnakothi (chambre d'étouffage à air chaud), ou du chula sans fumée a également permis d'économiser le fuel et d'améliorer les conditions de travail dans les bâtiments de dévidage.

La charka de ferme traditionnelle est bien adaptée au dévidage des cocons de souches polyvoltines d'Inde. Cependant, l'introduction de souches améliorées et de leurs hybrides a entraîné la nécessité de perfectionner la charka de ferme. On a donc perfectionné les machines à dévider pour qu'elles puissent s'adapter aux besoins de l'industrie. Les résultats montrent qu'avec des machines à dévider multibouts, notre soie bivoltine présentent certains caractères comparables au grade A des normes internationales.

CONTRIBUTION DU SECTEUR R & D DANS LE DOMAINE DE LA PRODUCTION DE SOIE NON-MURIER

Ainsi que nous l'avons mentionné plus haut, trois autres espèces de vers à soie sont exploitées commercialement en Inde. Parmi celles-ci, du point de vue de la demande en soie indienne sur le marché mondial, le tasar tropical est le plus important en raison de sa teinte naturelle, de sa texture rêche et de son aspect "vieillot". Au cours des quarante dernières années, les chercheurs sont parvenus à donner une structure organisationnelle et industrielle adéquate à la production des cocons et de la soie tasar. Les contributions principales dans ce domaine sont "l'élaboration de nouvelles variétés acclimatées, la mise au point d'un système de plantation en bloc pour l'élevage en extérieur, l'établissement d'une organisation de la production de graines de qualité au moyen d'un système de multiplication à trois niveaux, le développement de machines à dévider les cocons tasar ainsi que l'introduction du dévidage sur des récipients en terre au lieu du dévidage à la cuisse".

Le muga, la soie d'or, est limité à la vallée du Brahmaputra (Assam) et est considéré comme un matériel précieux. Les chercheurs ont contribué à améliorer les plantations en bloc des plantes nourricières du muga pour augmenter la productivité. Il faut également citer le perfectionnement des machines à dévider les cocons muga ainsi que des machines à dévider les cocons eri mises au point par les chercheurs indiens.

SITUATION ACTUELLE DE L'INDUSTRIE ET NECESSITE DE NOUVELLES DECOUVERTES

L'Inde produit aujourd'hui environ 11 700 tonnes de soie mûrier et environ 1 200 tonnes de soie non-mûrier et peut de ce fait prétendre à la place de deuxième producteur mondial. Cependant, il est également vrai qu'en Inde, le déficit s'élève environ à 1 000 tonnes. Toutefois, les conditions socio-économiques de notre pays, les politiques de son Gouvernement, le milieu naturel et la maîtrise acquise au long d'une pratique ancestrale font évidemment de l'Inde le pays le mieux placé pour combler le déficit de la production mondiale.

NECESSITE DE NOUVELLES DECOUVERTES (Sélection et génétique des vers à soie)

En Inde, l'obstacle principal tient aujourd'hui au fait que plus de 85 % de la production totale de soie mûrier provient de souches polyvoltines ou d'hybrides polyvoltins × bivoltins à faible rendement et correspond donc évidemment à un grade international inférieur ; alors que pour obtenir l'amélioration souhaitée de la qualité de la soie produite, l'exploitation d'hybrides bivoltins est essentielle. De plus, le potentiel absolu du rendement des hybrides polyvoltins est beaucoup plus élevé que celui des autres mais ce potentiel ne peut être réalisé à l'heure actuelle. Cet aspect a été mis en évidence par l'analyse du déficit du rendement (Datta, 1988). Celle-ci révèle que les hybrides bivoltins ont une capacité d'adaptation beaucoup plus faible à notre environnement que les croisements polyvoltins ou les croisements polyvoltins × bivoltins et l'analyse globale suggère que :

a) les races/souches polyvoltines, particulièrement les races traditionnelles (par exemple, Nistari, Pure Mysore, Sarupat, Moria, C. Nichi) ont un capital génétique beaucoup plus adaptable aux conditions précaires des élevages dans notre pays ;

b) l'Inde étant un pays pauvre, il est extrêmement difficile de fournir une infrastructure et une gestion adaptées essentielles à la bonne exploitation du potentiel de rendement des races et des souches bivoltines, qu'elles soient exotiques ou développées ici.

Ces problèmes ont conduit à l'identification des domaines de recherches à approfondir et pour lesquels il est impératif d'obtenir rapidement des résultats (Chatterjee et Datta, 1989) :

1) Compréhension de la base moléculaire de la résistance ou de la forte capacité d'adaptation des souches polyvoltines à faible rendement.

2) Identification des paramètres biochimiques/physiologiques corrélés à la survie et aux autres composants du rendement.

3) Cartographie moléculaire du génome du ver à soie afin d'identifier les segments chromosomiques qui contribuent aux composants du rendement ainsi que les facteurs responsables de la bonne résistance.

4) Meilleure compréhension de la base moléculaire de la réponse immunitaire chez les vers à soie mûrier et non-mûrier (sauvages ou semi-sauvages).

LA LUTTE CONTRE LES MALADIES ET LEUR CONTROLE

La conjoncture socio-économique, un développement économique inégal dans les zones rurales et des pratiques ancestrales forment les principaux obstacles à la création d'une situation idéale de gestion de l'élevage et des conditions d'hygiène nécessaires à l'élevage de souches et d'hybrides bivoltins. Outre les tentatives faites pour améliorer le potentiel de survie des souches perfectionnées par la sélection, un effort a également été fourni afin de mettre au point des méthodes précises et rentables de diagnostic précoce et exact de maladies telles que la pébrine (*Nosema bombycis*), le virus de la polyédrose nucléaire et le virus de la polyédrose cytoplasmique. Le test d'agglutination sur billes de latex avec un anticorps polyclonal pour éliminer les spores de *Nosema* a également été normalisé et le Gouvernement indien a lancé un programme de coopération avec l'institut national d'immunologie pour un développement généralisé.

De ce fait, des résultats dans les domaines suivants sont impératifs pour augmenter encore la rentabilité des méthodes séricicoles chez les fermiers indiens :

1) Développement d'un ensemble de diagnostics basés sur l'agglutination au latex ou une réaction enzymatique induisant une coloration afin d'identifier correctement les cas d'infestation virulentes par *Nosema*.

2) Développement d'un ensemble de diagnostics du virus de la polyédrose nucléaire (NPV) responsable de pertes importantes de vers à soie.

3) Développement d'un ensemble de diagnostics du virus de la flacherie infectieuse aux premiers stades larvaires.

METHODES DE CULTURE DU MURIER

Comme on l'a indiqué plus haut, la mise au point de variétés de mûrier et le développement de méthodes de culture ont effectivement aidé les sériciculteurs à améliorer leur productivité. Néanmoins, il reste des possibilités d'étude si l'on veut perfectionner encore la rentabilité des méthodes de culture (a) en améliorant la qualité nutritive du mûrier, (b) en diminuant l'utilisation des engrais par l'utilisation d'engrais biologiques, (c) en utilisant l'eau de manière plus économique et des systèmes de plantations alternatifs.

Le CSRTI de Mysore s'est attaché à l'étude de ces aspects et les agronomistes ont pu établir l'existence d'une association mycorrhizale spécifique aux racines du mûrier. Parallèlement, des expériences menées au cours des deux dernières années ont montré qu'il était possible d'utiliser *Azotobacter* et *Azospirillum* pour réduire l'apport en azote d'environ 50 % sans affecter le rendement en feuilles de mûrier.

Le même institut est actuellement en train de mettre au point une méthode complète de culture de mûriers en taille moyenne/haute pour les terrains escarpés des Ghats orientaux et occidentaux.

Afin d'améliorer la qualité nutritive du mûrier et satisfaire les besoins du ver à soie bivoltin, il est nécessaire de combiner le génotype du mûrier exotique avec celui du mûrier local. A cette fin, un programme de recherche a été mis en place afin de développer la technologie de l'hybridation somatique par fusion des protoplastes.

TECHNOLOGIE D'ELEVAGE ET INNOVATION

Avec l'extension de la sériciculture des zones traditionnelles aux zones non traditionnelles et pour satisfaire les changements réalisés dans notre pays, il est devenu nécessaire de développer des méthodes séparées à faible coût pour les bâtiments d'élevage de vers à soie adultes ainsi que pour les bâtiments d'élevage de vers à soie chawki. L'institut de Mysore a déjà apporté sa contribution au développement de certains bâtiments d'élevage modèles utilisant soit la construction RCC soit une construction à faible coût basée sur des matériaux bon marché comme les pierres, la tourbe, les feuilles de cocotier ou de palmiers, etc.

Cependant, avec l'introduction de la sériciculture dans les grandes propriétés et pour d'autres raisons, il est devenu nécessaire de développer des cabanes temporaires ou semi-permanentes à faible coût pour l'élevage des derniers stades. C'est une question sur laquelle l'institut travaille actuellement et il tente également d'assimiler les technologies développées par le Japon et par d'autres pays comme la Chine et le Brésil.

Dans le secteur de la gestion de l'élevage, il semble pertinent de mettre plus particulièrement l'accent sur l'aseptisation des conditions d'élevage et le développement de l'aliment artificiel pour les vers des premiers stades.

SERI-BIOTECHNOLOGIE : LA NOUVELLE FRONTIERE DU SECTEUR R & D EN SERICULTURE

La biologie moléculaire est, à de nombreux points de vue, un outil important en biologie appliquée d'aujourd'hui. Le mot *Biotechnologie* est devenu un mot courant et est réellement utile à

l'amélioration quantitative de la production industrielle, que ce soit l'industrie de fermentation ou l'agro-industrie. Le Gouvernement indien considère également la sériciculture comme un domaine prioritaire adapté au développement des infrastructures de recherches biotechnologiques en Inde. De fait, le laboratoire Seribiotech à Bangalore est en voie de création. On pense que l'institut aura, dans un premier temps, trois laboratoires principaux : un laboratoire de génétique moléculaire, un laboratoire de développement des vecteurs et un laboratoire de transformation des lignées germinales.

Les recherches seribiotechnologiques futures comprennent des projets à court terme concernant le développement d'un ensemble de diagnostics des maladies, la lutte biologique contre la menace uzi et également des projets à long terme sur l'amélioration du potentiel de production des oeufs du ver à soie non-mûrier, le développement de meilleures réponses immunitaires (tolérance aux germes) pour les souches de vers à soie productives, l'insertion des "gènes de résistance" chez le mûrier pour lutter contre l'infestation des nématodes et à terme fournir un *modus operandi* afin d'améliorer la qualité de la soie indienne et aider l'Inde à combler le déficit de la production globale de soie.

RESEARCH ON POLYPLOIDY AND POLYPLOID BREEDING OF MULBERRY IN CHINA

YANG J.-H. & YANG X.-H.

Sericultural Research Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, 48 Shiqiao Road,
Hangzhou, Zhejiang 310021, China.

China is the most abundant in mulberry polyploid resources, of which natural triploids, tetraploids, hexaploids, octoploids, docosaploids and spontaneous haploids have been discovered. The most efficient method for inducing artificial tetraploids is probably using about 0.2 % colchicine solution prepared with 2 ppm BA to be injected into the swelling bud or growing cone or applied to the growing point of a seedling at the cotyledon expanding stage. The paper deals also with the technical problems in breeding triploids by crossing them between tetraploid and diploid and by pollinating diploidised gametes to the haploid ones, and the prospects for mulberry polyploid breeding in the future.

Keywords : Mulberry, *Morus* L., breeding, polyploid, China.

INTRODUCTION

Mulberry varieties may be improved for a region by means of importation, screening from germplasm resources, selection of natural hybrids and bud mutants, hybridisation, radiation mutation and polyploid breeding. As some of the polyploids, especially triploids, possess better economic characteristics, much attention has been paid by mulberry breeders to the investigation of natural polyploids and its utilization, artificial polyploid induction and breeding. Based on a rough statistics by the authors, 84 papers dealing with mulberry polyploids were reported, which accounted for 41.5 % of the total of those about mulberry breeding presented in PBA by CAB during 1981-1990. Since the 1970s, examination of polyploids in variety resources and polyploid breeding in mulberry has been conducted by the National Sericultural Research Institute and by related institutions in the main sericultural provinces in China and considerable progress has been made both in theory and application, out of which more than 28 research papers have been published.

CATEGORIES OF NATURAL POLYPLOID MULBERRY

Studies on cytology of *Morus* plant were initiated in the 1960s in China. Along with the deepening of investigation of mulberry germplasm resources in the last ten years, cytogenetics of *Morus* has been systematically studied. The research results show that most of *Morus* plants are diploids of $2n = 28$. Numbers of polyploids, however, exist in nature. The polyploids of *Morus* plants hitherto discovered in China are listed in Table I.

In addition to the various categories of polyploids shown in Table I, researchers also found some mixoploidy and heteroploidy, such as Wanchang 11 and Guizhou 31, 6 x varieties, mixes with 4 x, 4 x variety Yaan 7 mixes with both 2 x and 6 x (He *et al.*, 1989). The number of chromosomes in the variety Wenqisang is $2n = 27$, i.e. a monosomic (Chu *et al.*, 1986).

On the basis of the data given in Table I, there exist numbers of natural polyploids, i.e. 60 portions of triploid, 5 portions of tetraploids, 46 portions of hexaploids, 1 portion of octoploid and 1 portion

Table I. Natural polyploids of *Morus* plants in China.Tableau I. Polyplôides naturels des plants de *Morus* en Chine.

Ploids <i>Ploidie</i>	Original locality <i>Lieu d'origine</i>	Varieties and species <i>Variétés et espèces</i>	Information source <i>Source d'information</i>
Triploid <i>Triploïde</i> 2n = 42 3x (60 entries) (60 clones)	Zhejiang	Huosang, Baidpihuosang (<i>M. mizuho</i> H.) ; Pingyangwusang (<i>M. alba</i> L.) ; Hongdinsang, Wupisang, Zaochunsang, Fuyangsang, Hongyahasang (<i>M. multicaulis</i> L.)	Wu (1964) Chu (1986) Yang (1990) Ji (1991)
	Guangdong	Lunjiao 40, Da 10, Dongluo (<i>M. atropurpurea</i> K.) ; Zicheng 2, 5, 6 (<i>M. australis</i> P.)	Huang (1988) Guo and Huang (1990)
	Guanxi	Weisheng 1, 2, Weishi 3, Weili 5 (<i>M. atropurpurea</i> K.)	Li (1989)
	Hainan	Baiyan 1, Chaoyang 1, 4, Zhouquiao 2, Ya 3, Sanya 2, 4, 6 (<i>M. atropurpurea</i> K.)	
	Yunnan	Shuisang	Pan (1980)
	Guizhou	Guizhou 20 (<i>M. australis</i> P.) Daozhengyesang	He (1989) Li (1989)
	Sichuan	Heiyiusang, Dahongpi, Guapiaosang, Dahuasang, Leshanhuasang, Junlian 9, Wang 2, Hong 1, Jian 21 (<i>M. alba</i> L.) ; Baxianyaosang, Datongyaosang, Yaan 7, Yazhousang, Chasang, Minshan 9, 10, 11, 12 (<i>M. australis</i> P.) ; Hong 11, 12 (<i>M. notabilis</i> S.) ; No. 32, Shimian 7, Wangyuan 2, Wanyuanyasang, Emciyansang	He (1989) Zhu (1989) Jiang (1985) Yu (1988) Chu (1986) Li (1989)
	Shandong	Heilu (<i>M. multicaulis</i> L.)	Li (1989)
	Xinjiang	Hetianbaisang, Shayi 1, Abai 1, 2, Jiake 2 (<i>Morus alba</i> L.)	
Tetraploid <i>Tétraploïde</i> 2n = 56 4x	Guangdong	Taishen 1 (<i>M. cathayana</i> H.)	Huang (1988)
	Sichuan	Lushan 3 (<i>M. cathayana</i> H.) Chengkou 4, Minshan 13	He (1989) Zhu (1989)
	Tibet	Xizhangyesang	Chu (1986)

Continued / Suite page suivante

Table I. (continued) / Tableau I. (suite)

Ploids <i>Ploidie</i>	Original locality <i>Lieu d'origine</i>	Varieties and species <i>Variétés et espèces</i>	Information source <i>Source d'information</i>
Hexaploid <i>Hexaploïde</i> 2n = 84 6 x (46 entries) (46 clones)	Zhejiang	Tianmumaosang (<i>M. cathayana</i> H.)	Sun (1989)
	Guangdong	Yinshi 1, 2, 4, Ruyang 2, 4, 6 Qinshi 1, Wengtie 1, Luojiadu 6 (<i>M. cathayana</i> Y.)	Huang (1988) Guo and Huang (1990)
	Hubei	Dabishanpisang, Dahuyayepisang, Xiaohuayepisang, Yuanyepisang, Hubei 3, 8, 9, 16 (<i>M. cathayana</i> H.)	Chu (1986) Yu (1988) Li (1989)
	Sichuan	Ganluosang, Ganluo 4, Hongxian 13, Chengkou 5, Wenyan 1, Wangchang 11, Ping 4, 5, 6, 8, Minshan 4, 6, Huidong 5, Yingjing 9, Lushan 13 (<i>M. cathayana</i> H.); Jian 14 (<i>M. mongolica</i> var. <i>diabolica</i> K.); Wengcheng 8 (<i>M. mongolica</i> S.)	He (1989) Zhu (1989)
	Guizhou	Guizhou 2, 7, 8, 9, 21, 22, 41, Deijiang 21 (<i>M. cathayana</i> H.); Deijiang 1 (<i>M. leavigata</i> W.); Fu 13, Meitan 3	He (1989) Jiang (1985) Yu (1988)
Octoploid <i>Octoploïde</i>	Sichuan	Fengdu 8 (<i>M. cathayana</i> H.)	Zhu (1989)
Docosaploid <i>Docosaploïde</i>	Xinjiang	Xinjiangyaosang (<i>M. nigra</i> L.)	Li (1989)

of docosaploid. The discovery of 8 x Fendu 8 (Zhu *et al.*, 1989) ascertains the existence of octoploid in China (Janaki Ammal, 1948). Furthermore, a spontaneous haploid in the species, *M. notabilis*, was found in nature (Li *et al.*, 1989), which may be the first reported in mulberry. In the genus, *Morus*, in China *Morus nigra* L. has been known as a docosaploid (2n = 308), *M. australis* P. as a triploid (2n = 42), *M. mongolica* S., *M. mongolica* var. *diabolica* K. and *M. leavigata* W. contain hexaploids (2n = 84), and *M. cathayana* H. involves tetraploids (2n = 56), hexaploids and octoploids (2n = 112). All of the 4 cultivated species in China, *M. multicaulis* L., *M. alba* L., *M. atropurpurea* K. and *M. mizuho* H., contain triploids, respectively. With so many findings of natural polyploids, China has probably the most abundant mulberry resources in the world, although a number of natural polyploids, mainly triploids, have also been discovered such as in Japan, the USSR, India and Thailand.

It is assumed that there are some particularly favorable ecological conditions for the formation of polyploids in certain parts of China, e.g. in Southwest China, respecting the geographical position, i.e. the latitude and longitude, altitude and local climates, which combine to make possible the occurrence of quite a great number of polyploids to be discovered in Sichuan and Guizhou Provinces.

INDUCTION OF ARTIFICIAL TETRAPLOID

Induced tetraploids are generally characterized by enlarged organs, such as large and thick leaves and stumpy and less-numbered branches. In spite of their good leaf quality, the leaf output of most tetraploids is usually no more than that of their parent diploids. Therefore, only very few of them are directly used in production. Some newly reported tetraploids derived from hybrid seedlings, however, possess the characters of high-yielding potential. A tetraploid Letnil 2, for instance, increases leaf output by 18.5 % over the standard variety (Gatin *et al.*, 1985), and Yue I.4 and Yue I.42, etc., increase by 10-44.9 % (Guo and Huang, 1989). The reason for this is probably that these tetraploids were induced from hybrids with the properties of heterosis.

In order to carry out polyploid breeding and to get artificial triploids, it is necessary to obtain artificial tetraploids for hybridization since there are very few tetraploids in nature. As shown by research experiments made by us and other scientists, the tetraploids may be produced by the following methods: (1) irradiating the buds at the swelling stage in spring by acute gamma rays with the dose of 5,000 rad at the exposure rate of 1,500-2,000 rad/hr and pruning next spring the shoots directly above their leafless parts or grafting single buds with V_1 branch below the leafless parts (Yang *et al.*, 1984; Katagiri, 1976), (2) treating the swelling buds in spring or the growing cone of clonal variety shoots or young seedlings at the growing stage with 0.1-0.4 % concentration of colchicine (Yang *et al.*, 1989; Guo and Wu, 1989; Tojyo, 1985), (3) crossing between hexaploid and diploid, i.e. $6x \times 2x$ or $2x \times 6x$, is likely to lead to the production of $4x$ plants, the morphological characters of which generally tend to be those of $6x$ plants (Sun *et al.*, 1989). Of the above-mentioned methods, the most efficient is using approximately 0.2 % colchicine solution prepared with 2 ppm BA solution to be injected into the swelling bud or growing cone for successive 2-4 time (once or twice a day) (Yang *et al.*, 1989) and applied to the growing point of a young seedling at the cotyledon expanding stage twice a day (a.m. and p.m.) for 2 days (Guo and Wu, 1989).

By use of the above methods, a number of various tetraploids have been brought about in China: clonal autotetraploids Heyebai, Tuantouheyebai, Tongxiangqing, Husang 197, Yu 711 and Shinichiose 4 xs, etc., autotetraploids induced from hybrid seedlings Yue I.4, 12, 57 etc., and allotetraploid Zhongsang 5801 $\times$ Tianmumaosang, totalling over 120 items altogether.

THE BREEDING OF ARTIFICIAL TRIPLOID

The typical characters of triploid mulberry are good elongation of branches and roots, good regenerating ability of buds, rather larger leaves than their parents and high-yielding potential, and its leaf quality is generally intermediate between tetraploid and diploid. All of these characteristics are generally of good economic value. That is why mulberry breeders take aim at triploid in polyploid breeding, and such nice triploids as Shinkenmochi and Aobanezumi in Japan as well as Az 8 and Az 9 in the USSR etc., are being spread on a commercial scale. Some selected natural triploids have been utilized in sericultural production in China, such as Lunjiao 40, Da 10, Heiyiusang, Leshuanusang and Huosang, etc.

By adopting the cross combinations of $4x$ (female) $\times$ $2x$ (male) and $2x$ (female) $\times$ $4x$ (male), artificial triploid can be produced. The germinating ability of the seeds of the later combination is usually quite poor, but could be enhanced by refrigerating the hybrid soroses at 2 °C over 7 days (Yang *et al.*, 1989) following the experiment done by Watanabe (1985). By producing diploidized gametes with treatments of 0.05-0.1 % colchicine to inflorescences of diploid plants and crossing them with gametes of ordinary diploids plants could possibly be produced triploid (Yang *et al.*, 1989; Tojyo, 1985, etc.). For the breeding of triploid, as compared with that of diploid it is necessary to pay much attention on sowing hybrid seeds and cultivating seedlings. The procedures of selection and evaluation are almost the same as those of conventional breeding.

Using the above methods, numbers of triploids, including vegetatively propagated varieties and hybrid combinations, have so far been obtained in China. Some varieties such as Dazhonghua (Pan and Yang, 1990) and Yue I.25 $\times$ Miao 33 and Dexin 7 $\times$ Yue I.1 (Guo and Wu, 1989) are found to be quite promising.

PROSPECTS FOR FUTURE RESEARCH

Along with adopting conventional and other breeding methods, polyploid breeding is one of the effective ways for improving mulberry varieties. Besides continuative investigation and application of natural polyploids, research of artificial polyploids in China in the future are suggested to focus on: (1) inducing more tetraploids and then producing triploid varieties to be perpetuated by vegetative propagation, (2) making triploid heterosis combinations after getting tetraploids derived from clonal varieties or hybrid seedlings, and (3) screening high-yielding tetraploids from tetraploidized hybrids or hybridized tetraploids for direct use in sericulture.

REFERENCES

- CHU R.-Y., SUN X.-X. (1986), The studies on cytogenetics of *Morus* plant, I. the number of chromosomes of some mulberry varieties. *Sericult. Sci.*, 12(4), 199-202.
- GATIN F.G., ASAMOYA M.N. (1985), A tetraploid mulberry variety, Letnil 2. *Silk*, 15, 3. *In* PBA (1988), 58(2), 1780.
- GUO Z.-X., HUANG L.-H. *et al.* (1989), Studies on induction of hybrid mulberry seedlings to tetraploid plants by the treatment of colchicine. *Silk Newslett. Guangdong*, 2, 15-18.
- GUO Z.-X., WU J.-Y. (1989), Studies on induction of hybrid mulberry seedlings to tetraploid plants by using colchicine. *Sericult. Sci.*, 15(1), 13-17.
- GUO Z.-X., HUANG L.-H. *et al.* (1990), Observation on the chromosome number of mulberry in South China. *Silk Newslett. Guangdong*, 2, 40-42.
- GUO Z.-X., WU J.-Y. *et al.* (1990), Studies on triploid hybrids of mulberry, III. the breeding of Yue I.25 $\times$ Miao 33 and Dexim 7 $\times$ Yue I.1. *Silk Newslett. Guangdong*, 4, 20-22.
- HE D.-Y., ZHOU M.-Z. (1989), Studies on the cytogenetics of *Morus* in Southwest China, I. observation on the chromosome number of *Morus*. *Sericult. Sci.*, 15(1), 7-12.
- HUANG L.-H., WU J.-Y. *et al.* (1988), Observation on the chromosome number of *Morus* in Guangdong regions. *Silk Newslett., Guangdong*, 3, 43-45.
- HUANG Y.-J. (1981), A preliminary report on the polyploid plant of mulberry. *Sericult. Sci.*, 7(2), 83-86.
- JANAKI AMMAL E.K. (1948), The origin of the black mulberry. *J. Roy. Hort. Soc.*, 73, 117-120.
- JI D.-F., LING S.-K. (1991), Investigation of mulberry varieties in Zhejiang. *Bull. Sericult.*, 22(2), 8-10.
- JIANG T.-Q., ZHU Y. (1985), Preliminary studies on cytology of *Morus* plant. *Sericult. Sichuan*, 4, 1-4.
- KATAGIRI K. (1976), Radiosensitivity, mutation and tetraploid induction in the gamma-ray irradiated growing shoots in mulberry. *J. Sericult. Sci. Jpn.*, 45(6), 461-468.
- LI C.-L., YU M.-D. (1989), Studies on ploid of *Morus* plant. *Sericult. Jiazhou*, 3, 56-58.
- PAN Y.-L. (1980), Examination technics for cell chromosomes of mulberry root tips. *Sericult. Sci.*, 6(3), 195-197.
- PAN Y.-L., YANG J.-H. (1990), Studies on heredity and breeding technics of mulberry. *In* Collected papers of economic crop breeding. Shanghai Sc. Tech. Publ. Hse., 59-64.
- SEKI H. (1969), On the artificial polyploid of *Morus* plant (mulberry). Work Report no. 7 of The Farm Attached to the Faculty of Textile and Sericulture of Sinshu University, Japan.
- SUN X.-X., ZHANG M.-B. (1989), Breeding of mulberry tetraploid plants. *Sericult. Sci.*, 15(1), 60-61.
- TOJOYO I. (1985), Research of polyploidy and its application in *Morus*. *JARQ*, 18(3), 222-227.
- WATANABE Y. (1985), Effects of ethrel and low temperature on germination of the triploid seeds in *Morus*. *Acta Sericologica*, 134, 45-53.
- WU Y. (1964), On the chromosome numbers of various forms of Chinese mulberry. *Sericult. Sci.*, 2(3), 165-167.
- YANG J.-H., YANG X.-H. (1984), Studies on breeding the mulberry by radiation, 3. induced polyploid mutant and its identification. *Sericult. Sci.*, 10(1), 9-12.

- YANG J.-H., YANG X.-H. (1989), Breeding of artificial triploids in mulberry. *Sericult. Sci.*, 15(2), 65-70.
- YANG J.-H. (1990), Polyploid breeding of mulberry. *In* Practical mulberry breeding. Sichuan Sc. Tech. Publishing Hse., 207-218.
- YANG J.-H., YANG X.-H. (1990), Relationship between stomatal chloroplast number and ploids in mulberry. *J. Agri. Sci. Zhejiang*, 5, 238-240.
- YU M.-D. (1988), Studies on ploids of mulberry. *Sericult. Sichuan*, 3, 10-11.
- ZHU Y., GUO M.-W. *et al.* (1989), Studies on polyploid of *Morus* plant in Sichuan Province. *Sericult. Sichuan*, 4, 5-11.

RECHERCHES SUR LA POLYPLOIDIE ET LA SÉLECTION DE POLYPLOIDES CHEZ LE MURIER EN CHINE

YANG J.-H. & YANG X.-H.

Sericultural Research Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, 48 Shiqiao Road, Hangzhou, Zhejiang 310021, Chine.

La Chine possède les ressources les plus abondantes en mûriers polyploïdes ; parmi ceux-ci, on a découvert des triploïdes, tétraploïdes, hexaploïdes, octoploïdes, docosaploïdes naturels ainsi que des haploïdes spontanés. La méthode la plus efficace pour induire des tétraploïdes artificiels est probablement d'injecter une solution de colchicine à 0,2 % préparée avec 2 ppm de BA dans le bourgeon ou dans le cône de croissance ou de l'appliquer sur le point de croissance d'un germe au stade de développement du cotylédon. Cet article traite également des problèmes techniques liés à la culture et à la sélection de triploïdes par croisement avec des tétraploïdes et des diploïdes et par pollinisation de gamètes diploïdes avec des gamètes haploïdes ainsi que des perspectives de culture des mûriers polyploïdes.

INTRODUCTION

On peut améliorer les variétés de mûriers d'une région par l'importation, la sélection à partir des ressources d'une banque génétique, la sélection d'hybrides naturels et de mutants, l'hybridation, la mutation par radiation et la sélection de polyploïdes. Certains polyploïdes, particulièrement des triploïdes, possédant de meilleurs caractéristiques économiques, les moriculteurs se sont attachés à l'étude des polyploïdes naturels et à l'induction artificielle de polyploïdes et la sélection. Selon une estimation des auteurs, 84 articles traitant des mûriers polyploïdes ont été publiés, ce qui représente 41,5 % du total des publications sur la culture du mûrier présentées en PBA par le CAB de 1981 à 1990. Le National Sericultural Research Institute et les institutions connexes des principales provinces séricoles de Chine effectuent des recherches sur les polyploïdes en terme de ressources variétales et sur la culture des polyploïdes chez le mûrier depuis le début des années soixante-dix. Des progrès considérables ont été réalisés, tant sur le plan théorique que sur le plan appliqué dans ce domaine, qui ont conduit à la publication de plus de 28 articles de recherche.

CATEGORIES DE MURIERS POLYPLOIDES NATURELS

Des études sur la cytologie du plant de *Morus* ont été lancées dans les années soixante en Chine. La cytogénétique de *Morus*, parallèlement à l'approfondissement des recherches sur les ressources génétiques du mûrier, a été étudiée de manière systématique au cours des dix dernières années. Les résultats de ces recherches montrent que la plupart des plants de *Morus* sont des diploïdes de $2n = 28$. Un grand nombre de polyploïdes existent cependant à l'état naturel. Les polyploïdes des plants de *Morus* découverts à ce jour en Chine sont présentés dans le tableau I.

Outre les différentes catégories de polyploïdes présentées dans le tableau I, les chercheurs ont également découvert des cas de mixoploïdie et d'hétéroploïdie, tels que Wanchang 11 et Guizhou 31, variétés 6x qui fusionnent avec les 4x, la variété Yaan 4x fusionne aussi bien avec les 2x qu'avec les 6x (He et coll., 1989). Le nombre de chromosomes chez la variété Wenqisang est de $2n = 27$, c'est-à-dire qu'elle est monosomique (Chu et coll., 1986).

Les données présentées dans le tableau I montrent qu'il existe un grand nombre de polypléides naturels : 60 cas de triploïdes, 5 cas de tétraploïdes, 46 cas d'hexaploïdes, 1 cas d'octoploïde et 1 cas de docosaploïde. La découverte de Fendu 8 à 8 x (Zhu et coll., 1989) atteste de l'existence d'octoploïdes en Chine (Janaki Ammal, 1948). De plus, on a découvert un haploïde spontané chez l'espèce *M. notabilis* à l'état naturel (Li et coll., 1989) qui pourrait être le premier observé chez le mûrier. En Chine, on a observé, dans le genre *Morus*, un docosaploïde ($2n = 308$) chez *Morus nigra* L., un triploïde ($2n = 42$) chez *M. australis* et chez *M. mongolica* S. variété *diabolica* K. et *M. leavigata* des hexaploïdes ($2n = 84$), *M. cathayana* H. comprend des tétraploïdes ($2n = 56$), des hexaploïdes et des octoploïdes ($2n = 112$). Les quatre espèces cultivées en Chine, *M. multicaulis* L., *M. alba* L., *M. atropurpurea* K. et *M. mizuho* H. contiennent toutes des triploïdes. L'observation d'un nombre aussi important de polypléides permet de dire que la Chine a probablement les ressources de mûrier les plus abondantes du monde, bien qu'un certain nombre de polypléides naturels, principalement des triploïdes, ait également été découvert au Japon, en URSS, en Inde et en Thaïlande.

On suppose qu'il existe des conditions écologiques particulièrement favorables pour la formation des polypléides dans certaines régions de Chine, comme la Chine du sud-ouest, et dont la position géographique (latitude et longitude, altitude et climats locaux), permet à ces conditions de se combiner pour rendre possible l'existence du grand nombre de polypléides découverts dans les Provinces de Sichuan et de Guizhou.

INDUCTION DE TETRAPLOIDES ARTIFICIELS

Les tétraploïdes induits se caractérisent généralement par des organes hypertrophiés comme, par exemple, des feuilles grandes et épaisses et des ramifications courtes et peu nombreuses. Malgré la bonne qualité de leurs feuilles, le rendement en feuilles de la plupart des tétraploïdes n'est généralement pas plus élevé que celui des diploïdes parentaux. C'est pourquoi seulement un très petit nombre d'entre eux est utilisé dans la production. Cependant, on a découvert récemment des tétraploïdes dérivés de sauvageons hybrides possédant un potentiel performant. Le tétraploïde Ltenil 2, par exemple, donne une production de feuilles supérieure de 18,5 % à la variété normale (Gatin et coll., 1985) ; Yue I.4, Yue I.42, etc., donnent des productions supérieures de 10 à 44,9 % (Guo et Huang, 1989). La raison en est probablement que ces tétraploïdes sont induits à partir d'hybrides ayant des propriétés d'hétérosis.

Si l'on veut sélectionner des polypléides et obtenir des triploïdes artificiels, il est nécessaire de produire des tétraploïdes artificiels pour l'hybridation car il existe très peu de tétraploïdes à l'état naturel. Comme le montrent les expériences que nous et d'autres chercheurs avons réalisées, les tétraploïdes peuvent être produits par les méthodes suivantes : (1) irradiation aux rayons gamma avec une dose de 5 000 rad pour un taux d'exposition de 1 500 à 2 000 rad/heure des bourgeons au stade de dilatation au printemps, suivie au printemps suivant d'une taille des pousses juste au-dessus des parties aphyllées ou greffage de bourgeons uniques sur une branche V_1 au-dessous des parties aphyllées (Yang et coll., 1984 ; Katagiri, 1976), (2) traitement des bourgeons en phase de dilatation au printemps ou du cône de croissance des pousses de variétés clonales ou des jeunes germinations en phase de croissance avec des concentrations de 0,1 à 0,4 % de colchicine (Yang et coll., 1989 ; Guo et Wu, 1989 ; Tojyo, 1985), (3) le croisement entre hexaploïde et diploïde, (c'est-à-dire $6x \times 2x$ ou $2x \times 6x$) est susceptible d'entraîner la production de plants $4x$ dont les caractères morphologiques tendent généralement à être identiques à ceux des plants $6x$ (Sun et coll., 1989). Des méthodes mentionnées ci-dessus, la plus efficace consiste à injecter une solution de colchicine à 0,2 % préparée avec une solution de BA à 2 ppm dans le bourgeon ou dans le cône deux à quatre fois de suite (une à deux fois par jour) (Yang et coll., 1989) et à l'appliquer au point de croissance d'une jeune graine en germination au stade de dilatation du cotylédon deux fois par jour (le matin et l'après-midi) pendant deux jours (Guo et Wu, 1989).

L'utilisation des méthodes décrites ci-dessus a permis d'obtenir un certain nombre de tétraploïdes différents en Chine : les autotétraploïdes clonaux Heyebai, Tuantouheyebai, Tongxiangqing, Husang 197, Yu 711 et Shinichiose à $4x$, etc., les autotétraploïdes induits à partir de sauvageons hybrides Yue I.4, 12, 57, etc. et l'allotétraploïde Zhongsang 5801 $\times$ Tianmumsaosang, soit 120 souches au total.

CULTURE DE TRIPLOIDES ARTIFICIELS

Les caractères typiques du mûrier triploïde sont : un bon allongement des branches et des racines, une bonne capacité de régénération des bourgeons, des feuilles plus grandes que celles des parents et un important rendement potentiel ; la qualité des feuilles est généralement intermédiaire entre le tétraploïde et le diploïde. Toutes ces caractéristiques ont généralement une bonne valeur économique. C'est pourquoi les moriculteurs cherchent à obtenir des triploïdes, et des triploïdes performants tels que Shinkenmochi et Aobanezum au Japon ainsi que Az 8 et Az 9 en URSS sont multipliés à l'échelle commerciale. Certains triploïdes naturels sélectionnés ont été utilisés pour la production en Chine, comme Lunjiao 40, Da 10, Heiyusang, Leshanhuasang et Huosang.

L'adoption des croisements de $4 \times$ (femelle) $\times 2 \times$ (mâle) et $2 \times$ (femelle) $\times 4 \times$ (mâle) permet d'obtenir des triploïdes artificiels. La capacité de germination des graines de la deuxième combinaison est généralement très faible, mais pourrait être améliorée en plaçant au froid les soroses hybrides à 2°C pendant 7 jours (Yang et coll., 1989) selon l'expérience réalisée par Watanabe (1985). L'obtention de gamètes diploïdes par traitement à la colchicine à 0,5 jusqu'à 0,1 % des inflorescences des plants diploïdes et le croisement de celles-ci avec des gamètes de plants diploïdes ordinaires pourrait peut-être permettre la production de triploïdes (Yang et coll., 1989 ; Tojyo, 1985, etc.). La culture des triploïdes, contrairement à celle des diploïdes, nécessite de veiller particulièrement à l'ensemencement des graines hybrides et à la germination. Les méthodes de sélection et d'évaluation sont pratiquement identiques à celles qui sont utilisées dans la culture traditionnelle.

En Chine, l'utilisation des méthodes décrites ci-dessus a permis d'obtenir un grand nombre de triploïdes, y compris chez les variétés reproduites de manière végétative et chez les combinaisons hybrides. Certaines variétés comme Dazhonghua (Pan et Yang, 1990) et Yue 1.25 $\times$ Miao 33 et Dexin 7 $\times$ Yue 1.1 (Guo et Wu, 1989) se révèlent très prometteuses.

PERSPECTIVES D'AVENIR DES RECHERCHES

Parallèlement à l'adoption des méthodes de culture conventionnelles ou autres, la culture polyploïde constitue l'une des méthodes efficaces d'amélioration des variétés de mûrier. Outre les recherches suivies et l'application des polyploïdes naturels, on suggère de faire porter la recherche future en Chine dans le domaine des polyploïdes artificiels plus particulièrement sur : (1) l'induction de nouveaux tétraploïdes puis la production de variétés triploïdes par reproduction végétative, (2) l'hétérosis triploïde après l'obtention de tétraploïdes dérivés de variétés clonales ou de graines hybrides, et (3) la sélection de tétraploïdes performants à partir d'hybrides tétraploïdés ou de tétraploïdes hybridés, qui permettront une application immédiate en sériciculture.

PREPARATION AND RAPID FRACTIONATION OF A SILK GLAND CELL-FREE PROTEIN EXTRACT : PRELIMINARY INVESTIGATIONS OF THE PROTEIN-BINDING PROPERTIES OF THE P25 GENE 5'-FLANKING SEQUENCES

J.R. DREVET* & P.M. COUBLE

Université Claude Bernard, Lyon I, Centre de Génétique moléculaire et cellulaire, UMR 106 du CNRS, 42, boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

*The territorialized and coordinated expression of silk genes in **Bombyx mori** silk gland cells constitutes an attractive model for the understanding of temporal, spatial and hormonal regulation of gene expression. Transcriptionally active posterior silk gland cell crude protein extracts were prepared, efficiently and rapidly fractionated in order to identify DNA-binding proteins which can account for the selective expression of silk-protein genes. Two DNA-binding activities, present in a low-salt step eluted chromatographic fraction of the whole cell extract, were evidenced within the P25 promoter domain. Preliminary investigations have been performed to optimize DNA-protein(s) interactions.*

Keywords : *Bombyx mori*, silk gland, cell-free protein extract, regulation of gene expression, gel-shift assays, promoter, DNA-binding proteins.

INTRODUCTION

At any given time, cells utilize only a portion of the genetic information encoded in the DNA. Cell type diversity arises from differences in the subset of the total information that distinct cells express. In addition, development and differentiation are associated with changes in the pattern of gene expression within a single cell. Thus, the processes by which these differential patterns of expression are established are of central interest in the growth and differentiation of multi-cellular organisms.

To date, a large number of tissue-specific and developmental stage-specific genes have been identified. In the majority of systems investigated, gene expression appears to be regulated, at least in part, at the level of the initiation of transcription (see Maniatis *et al.* (1987) for recent examples and Gruss (1984) and Darnell (1982) for review). It is well established now that cell-type specific transcriptional control of gene expression is accomplished by the action of sequence specific DNA-binding proteins that interact with promoter and enhancer domains (see Ptashne (1986-1988) and Schlokati and Gruss (1986) for review). The prevailing view is that regulation of transcription from a particular promoter involves the concerted activity of multiple protein components within the transcription complex.

* Corresponding author : Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, The University of Calgary, Calgary, Alberta T2N 4N1, Canada.

Although many systems and genes have been investigated in order to understand the mechanisms of transcriptional control at intensity, temporal and spatial levels, none of them offer such a complete approach of the regulatory pathways as the *Bombyx mori* silk gland model. In fact, most of the systems studied concerned culture cells and so have no developmental history.

Briefly, the following points outline the main characteristics of the *Bombyx mori* silk gland model and present it as a unique and powerful system to understand the mechanisms of gene expression. The silk gland of *Bombyx mori* (see Figure 1b) is an organ which is entirely limited to the production of a finite set of proteins which constitute the silk thread. During secretory periods, which match the inter-molt stages of the larval development of the worm, the massive production of P25 and fibroin, the two disulfide-bonded subunits of the major silk protein, is the result of the intense expression of their respective genes in the posterior silk gland cells (PSG, see Figure 1b). The transcription of these two single copy genes (per haploid genome) occurs in an intense and strictly coordinated manner. Indeed, the accumulation of each transcript is identical during the secretory activity phase (Couble *et al.*, 1983); and the activity of the two genes is punctuated by the cycle of the insect larval development (genes are expressed during inter-molt periods and remain silent during molts). Moreover, the activity of both genes is strictly restricted to the posterior silk gland cells only (Couble *et al.*, 1987).

Another interesting aspect of this biological system comes from the fact that the middle silk gland cells (MSG, see Figure 1b), which constitute a part of the same organ, produce, synchronously with the posterior cells, a set of particular proteins (called sericins) and undergo the same events during the larval development (Michaille *et al.*, 1989).

Thus, both the close concertation of the expression of P25 and fibroin genes in the posterior silk gland cells and the sharp restriction of silk-gene expression in two different territories of the same organ suggest that a level of gene coordination exists throughout the organ.

Lastly, for many years it has been documented that a hormonal regulatory pathway (partly governed by ecdysteroids) sharply controls the larval development of the silkworm, and may act directly on silk-protein gene expression (Shigematsu and Moriyama, 1970).

Thus, the *Bombyx mori* silk gland appears to be a complete and attractive model in order to investigate the mechanisms of tissue-, temporal- and hormonally specific expression of class II genes.

A few years ago we evidenced that P25, fibroin and sericin 1 genes showed some sequence homologies in their 5'-flanking regions (Couble *et al.*, 1985). This suggested that the strict coordination and restriction of expression of the silk genes might be governed by trans-acting factors interacting with DNA sequences shared by these genes, or specific to each gene. In order to test this assumption, we have undertaken the analysis of the DNA-protein interaction(s) in *Bombyx mori* silk gland cell protein extracts. Here we report the preparation and fractionation of crude whole cell extracts from posterior silk gland cells and the preliminary investigations carried out with P25 promoter domain using gel retardation assays in order to identify proteins which can act as transcriptional regulatory factors.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Restriction endonuclease, DNA-polymerase I (Klenow fragment), calf intestine phosphatase, T4 polynucleotide kinase and proteinase K were purchased from Boehringer Mannheim. Poly(dI.dC)-(dI.dC) and PMSF (phenyl-methylsulfonyl fluoride) were purchased from Sigma. Heparine-sepharose was purchased from Pharmacia [γ - ^{32} P]ATP and [α - ^{32} P]UTP (>5000 Ci/mmol) were purchased from Amersham Corp.

Animals

Silkworms were hybrids of *Bombyx mori* European strains (200 $\times$ 300) reared at the 'Unité nationale séricicole' (La Mulatière, Lyon) at 22 °C with fresh mulberry leaves provided four times daily.

Methods

Cell extract preparation

Whole cell extracts were prepared from posterior silk gland cells according to the method described originally by Tsuda *et al.* (1981) with the following modifications. Silkworm larvae (120 between the first and second day of the fifth instar) were dissected and posterior silk glands (PSG : see Figure 1b) were collected and frozen immediately in liquid nitrogen before storage at -80 °C. Silk glands were rapidly warmed to 0 °C by washing in buffer A containing : 40 mM Tris-HCl (pH 7.9), 5 mM MgCl₂, 12 % sucrose, 25 % glycerol, 0.5 mM PMSF. Silk glands were then minced with scissors and homogenized in dounce in 10 ml of buffer A plus 3 mM DTT (dithiothreitol). The homogenate was precipitated by the addition of one/tenth volume of saturated (NH₄)₂SO₄ by gentle stirring. The homogenate was then centrifuged at 45,000 rpm for 4 hours in a 50.2 Ti rotor (Beckmann) at 0 °C and the supernatant was precipitated by addition of (NH₄)₂SO₄ (0.33 g/ml). After complete dissolution, the solution was centrifuged for 30 min. at 30,000 rpm in a 50.2 Ti rotor (Beckmann) at 0 °C. The pellet was resuspended in 1/20 initial volume of dialysis buffer containing : 20 mM HEPES [N-2-hydroxyethyl-piperazine-N-2-ethan sulfonic acid]-NaOH (pH 7.9), 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 2 mM DTT, 17 % glycerol, 0.5 mM PMSF, 0.15 mM spermidine and 0.15 mM spermine. After dialysis for 5 hours at 4 °C the dialysate was centrifuged at 30,000 rpm at 0 °C for 30 min. in a 50 Ti rotor (Beckmann). The supernatant was finally aliquoted and frozen in liquid nitrogen. The protein content was determined by the method of Lowry *et al.* (1951) with bovine serum albumin as standards. Extracts were adjusted to 20-30 mg of protein/ml.

Fractionation of whole cell extracts

Heparin-sepharose chromatography of whole cell extracts was performed as follows. All operations were carried out at 4 °C. Ten ml of crude extract adjusted to 5 mg/ml were applied onto a 2 ml Heparin-sepharose column equilibrated with buffer H containing 0.1 M KCl (buffer H is 20 mM HEPES pH 7.9, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF and 20 % glycerol). The column was washed with 6 ml of buffer H plus 0.1 M KCl and 5 column volumes each of buffer H plus 0.4 M KCl and buffer H plus 1.0 M KCl. The protein fractions (500 µl) from each salt elution were pooled and fractions eluted with 0.4 and 1.0 M KCl were dialyzed 5 hours against buffer H (low salt) and rapidly frozen in liquid nitrogen prior to storage at -80 °C.

DNA probes

The DNA fragments used as templates in *in vitro* run-off transcription assays and probes used in bandshift experiments are presented in Figure 2. All DNA fragments were subcloned in pUC18 plasmid DNA and checked by rapid nucleotide sequencing on supercoiled plasmid DNA according to the method described by Chen *et al.* (1985). Inserts were excised from plasmid vectors, 5' end-labelled using [γ -³²P]ATP and T4 polynucleotide kinase, then purified on prepacked Elutip-d column according to the supplier's instructions (Schleicher and Schuell).

In vitro transcription run-off experiments

In vitro run-off assays were carried out in a 25 µl reaction containing : 12 mM HEPES pH 7.9, 7 mM MgCl₂, 60 mM KCl, 0.2 mM EDTA 1.3 mM DTT, 10 % glycerol, 10 mM phosphate creatin, 500 µM GTP and CTP, 50 µM ATP, 5 µCi [α -³²P]UTP, 8 to 15 µl of whole cell protein extract (200 to 600 µg of protein) and 0.1 to 1.0 µg of calibrated DNA template. The incubation was performed for 45 to 60 min. at 30 °C, at which time RNA synthesis was stopped by the addition of 6 volumes of a solution consisting of : 2.5 M ammonium acetate, 1 % SDS, 25 µg/100 µl of carrier tRNA and 1 unit of RNase inhibitor (Boehringer Mannheim). Labelled RNAs were phenol/chloroform (1/1) extracted, ethanol precipitated, heat denatured for 5 min. at 95 °C in 95 % formamide and loaded onto a 6 % denaturing acrylamide (19/1 : acrylamide/bis-acrylamide) gel. Gels were dried and exposed overnight at -70 °C against autoradiographic film (Kodak X-AR 5). 5'-end-labelled Hinf I restriction fragments of pEMBL8 plasmid DNA were used as size markers.

Bandshift assays

The labelled fragments (0.1 to 1 ng) were incubated with the whole cell or fractionated protein extract (25 µg of protein unless otherwise indicated) from posterior silk gland cells. Protein-DNA complexes were then separated on low ionic strength native polyacrylamide gels (Fried and Crothers, 1981 ; Garner and Revzin, 1981). Incubation of probes with protein extracts was performed at 0 °C for 20 min. in a final volume of 25 µl consisting of 12 mM HEPES-NaOH (pH 7.9), 60 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 4 mM Tris-HCl, 0.6 mM DTT, 12 % glycerol and in the presence of optimal amounts (3 to 10 µg in a 25 µl reaction) of non-specific DNAs [herring sperm or pBR322 DNAs or poly(dI.dC)-(dI.dC)]. Optimum conditions of protein-DNA binding were determined for each probe by changing protein, unspecific competitors and labelled DNAs concentrations in the reaction mixture. After 30 min. of pre-electrophoresis (30 mA), the samples were loaded onto a 5 % native acrylamide gel (19/1) for appropriate time (determined by the length of each probe) at 15 volts/cm. The gel was then dried and exposed for autoradiography for 12 hours at -70 °C.

The proteinous nature of complexed factors was tested by digesting extracts with either proteinase K (20 µg, 15 min. at 10 °C) or trypsin (50 ng, 15 min. at 10 °C), as well as by heat-treatment prior to incubation with the labelled probes using standard conditions.

For protein-clipping experiments, protease digestions of complexed factors were performed by adding 5-10 or 25 ng of trypsin after the incubation period. Incubations were then continued for 10 min. at 0 °C and samples were loaded onto a 5 % non-denaturing gel as described above.

Two-dimensional electrophoresis analysis of fractionated protein extracts

The procedures used for protein sample preparation and electrophoresis were essentially as described by O'Farrel (1975). Proteins were precipitated by acetone (2 volumes, 30 min., twice at -20 °C) and resuspended in loading buffer consisting of : 9.5 M urea, 6 % triton X-100, 2 % of ampholites (pH range : 3.5-9.5) [Pharmacia]. Ten to 150 µg of protein per sample were loaded onto cylindrical electrofocusing gels (150 × 1 mm) containing 4 % acrylamide (28.4/1.6), 9.2 M urea, 2 % triton X-100, 4 % ampholites (as described above). Focusing was carried out at 25 °C for 14600 volts/hour. After equilibration for 5 min. in a buffer containing 0.25 M Tris-HCl (pH 8.0), 2 % SDS, 10 % sucrose, gels were stored frozen at -70 °C or loaded directly for the second dimension onto 10 % acrylamide separating gels. Electrophoresis were performed at a constant temperature of 1 °C in a buffer consisting of 0.25 M Tris-HCl (pH 8.3), 0.192 M glycine, 0.1 % SDS. Running conditions were 80 mA for 2.5 hours. Separated proteins were visualized by AgNO₃ staining as described by Morrissey (1981). Background was reduced by immersing gels for 30 sec. in 'Farmer' reducer (Heukeshoven and Dernick, 1983).

RESULTS AND DISCUSSION

The *Bombyx mori* silk gland offers experimental facilities which have no counterparts in other studied models. The properties which make this biological system interesting can be summarized as follows :

- the silk gland, the second largest organ in the silk worm body, is a simple secretive epithelium composed of a single cellular wall. So, as it is true for culture cells we have, at the level of the organ, the advantage of a practically pure cell type population ;
- the organ is organized in two territories easy to isolate (see Figure 1b), both are specialized in the production of a limited number of proteins which have no physico-chemical relationship ;
- in each secretory part of the organ, cells are identical and grow synchronously during the larval development ;
- the cell number is fixed from the beginning to the end of the larval life (Fayard, 1978). The growth is completed by an endoploid process (18 to 19 turns of endo-mitosis events) which leads to giant secretory cells (0.4 × 0.3 × 0.3 mm) (Perdrix-Guillot, 1974).

Whole cell extract preparation

Silk gland cells from the posterior part of the organ (PSG : see Figure 1b) were excised from fifth instar (two-day old) larvae and treated as described in 'Materials and Methods'. This age has been chosen from trials using older or younger fifth instar animals because it corresponds to the beginning of activity of silk gland cells at the last larval stage (see Figure 1c). Since the accumulation of P25, fibroin and sericin 1 mRNAs is exponential during the secretory phase (Couble *et al.*, 1983), this age coincides with a period when silk-gene specific trans-acting factors, if any, must be present at high concentrations in silk gland cells. In addition, silk glands excised at the beginning of the last secretory period allowed us to avoid the presence of high amounts of fibroin – the largest silk protein (370 kilo-daltons) – which is detrimental to the preparation of protein extracts, due to mechanical hindrances during the homogenization process.

Homogenization strength and time, ammonium sulfate precipitation ranges, ultracentrifugation speeds and dialysis times have been optimized in order to maximize the recovery of cell proteins to avoid DNA contamination and denaturation of protein samples. Routinely, using the protocol described above, whole cell protein extracts prepared with batches of 120 silk glands allowed us to obtain 40 to 60 mg of protein.

Quality of protein extracts prepared from posterior silk gland cells

The factor chosen to assess the quality of the crude protein extracts was their ability to transcribe, *in vitro*, fibroin and P25 truncated templates in run-off transcription assays. As shown in Figure 3a, using fibroin template, we were able to detect a 546 bp labelled product, the size expected with this calibrated template (see Figure 2). This band was not present in an assay performed in the presence of α -amanitin, a specific inhibitor of polymerase II activity. These results indicate that the fibroin template is efficiently and accurately transcribed in freshly prepared posterior silk gland cell extracts.

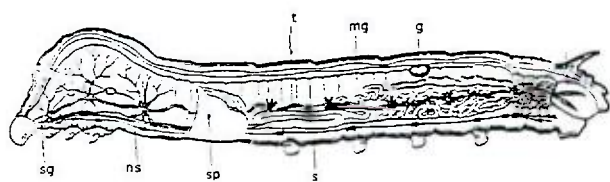
P25 calibrated template (see Figure 2) has also been used in similar *in vitro* run-off transcription experiments. The results obtained were surprising (see Figure 3b). Intense products resulting from polymerase II activity were identified but with unrelated sizes when compared to the calibrated DNA used as template (see Figure 2), locating the putative starting site of P25 transcription approximately 130 bp upstream from the cap site determined previously by primer extension experiments (Couble *et al.*, 1985). This particular point will not be discussed here ; further experiments have shown that the choice of these abnormal initiation sites is due to conformational hinderances when using linear templates, with respect to particular secondary structures occurring in the P25 promoter region (Couble *et al.*, 1985 ; Drevet and Couble, 1990), and with respect to the protein-DNA binding properties we have evidenced in this area (Drevet, 1989 ; Drevet *et al.*, 1991 submitted). Such artefactual polymerase II products, when linear DNAs were used as templates, have already been reported.

The results of this first set of experiments show that intense and at least accurate (for fibroin linear template) *in vitro* transcription can be obtained in our crude protein extracts of posterior silk gland cells. These assays do not give us information about the presence or the absence of specific trans-acting factors in our extracts. However, they provide evidence as to the quality of the protein preparations which seem to contain most (if not all) of the factors required for the transcriptional events. This led us to expect that DNA-binding proteins involved in specific regulation of posterior silk gland genes are present in such extracts.

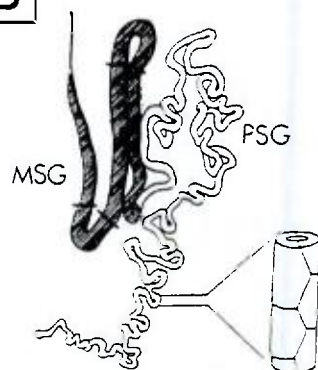
DNA-binding assay in crude protein extract with P25 promoter domain

In order to test if there is some DNA binding activity in our protein extracts, bandshift experiments were undertaken. In a first set of experiments whole cell extracts were used as the source of protein and incubated, as described in 'Materials and Methods', with a probe which encompasses 400 bp of the P25 5'-flanking sequence (from -18 to -424) (probe P₁ ; see Figure 2). In Figure 4, we present the results of these experiments carried out with three protein extracts collected from three different batches of silkworms. Multiple retarded bands were obtained. Although the intensity of the retarded complexes changed from extract A to extract C, we have not been able to detect qualitative differences in the pattern of bands obtained with the different extracts. This demonstrates the

A



B



C

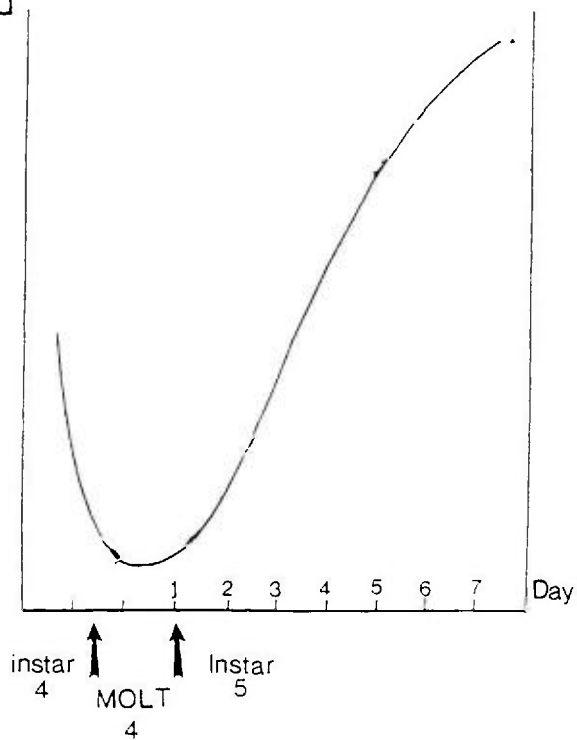


Fig. 1A : Schematic representation of a larva in the 5th instar.

The main internal organs are pointed out : mid-gut (mg), trachea (t), gonad (g), silk gland (s), spiracle (sp), nervous system (ns), salivary gland (sg). (From 'The silkworm : an important laboratory tool' Ed. Y. Tazima (1978), Kodansha, Tokyo).

Fig. 1B : Detail of a schematic silk gland.

The hatched part outlines the middle silk gland (MSG) and the posterior silk gland (PSG) territories. A detail of the single secretory cell wall is shown for the PSG.

Fig. 1C : Schematic representation of major silk genes mRNA evolution during the last larval development.

P25 and fibroin mRNAs behavior at the last larval instar. One graph is represented to reflect the equimolarity of the accumulation of both mRNAs during the period of activity of P25 and fibroin genes (intermolts) and the destabilization and disappearance of both transcripts during molt period (Couble *et al.*, 1983).

Fig. 1A : Représentation schématique d'une larve au cinquième âge.

Les principaux organes internes sont indiqués : intestin moyen (mg), trachée (t), gonade (g), glande séricigène (s), spiracle (sp), système nerveux (ns), glande salivaire (sg). (D'après "The silkworm : an important laboratory tool" Ed. Y. Tazima (1978), Kodansha, Tokyo).

Fig. 1B : Représentation d'une glande séricigène schématisée.

La partie hachurée représente les territoires du réservoir (MSG) et du sécréteur (PSG). L'unique paroi cellulaire sécrétrice est détaillée pour le sécréteur.

Fig. 1C : Représentation schématique de l'évolution des principaux ARNm des gènes de la soie au cours du dernier âge larvaire.

Accumulation des ARNm de fibroïne et de P25 au dernier stade larvaire. Le graphique unique reflète l'équimolarité de l'accumulation des deux ARNm pendant la période d'activité des gènes de P25 et de fibroïne (entre les mues) et la déstabilisation jusqu'à la disparition des deux transcrits au cours de la période de mue (Couble *et coll.*, 1983).

reproducibility in the preparation of whole cell protein extracts. However, the high number (at least 6 to 8 complexes), the low intensity (the retarded bands altogether represent less than 3 % of the total probe used in the reaction), and the relative identical migration of these complexes led us to fractionate the whole cell extract in order to simplify the analysis of bandshift experiments.

Fractionation of whole cell protein extract

Among different types of fractionation performed, Heparin-sepharose chromatography has been chosen because it leads to an efficient and rapid partition of the protein factors which bind the promoter domain of P25 gene.

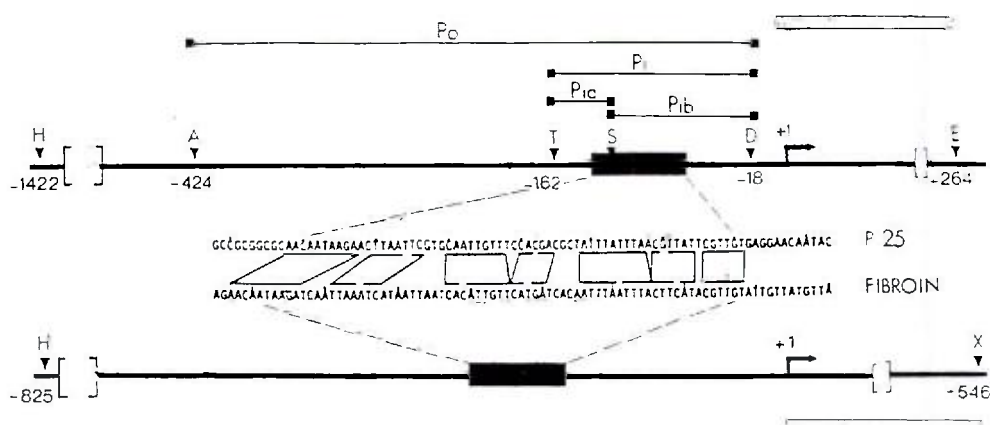


Fig. 2 : Schematic representation of the 5'-flanking regions of P25 and fibroin genes.

The upper and lower bold lines represent the insert contained in P25 7.7 HindIII/EcoRI Puc 18 and fibroin 1.37 HindIII/XhoI Puc18 subclones, respectively. The arrows indicate transcriptional orientations. The dark boxes show the 100 bp highly homologous domain between P25 and fibroin promoter (evidenced as the fibroin enhancer element: Suzuki *et al.*, 1983). Sequences of P25 promoter (Chevallard *et al.*, 1986) and fibroin promoter (Tsujimoto *et al.*, 1979) are expanded and compared in between; homologies are underlined. Base numbering is relative to the cap site of each gene.

Subfragments P₀, P₁, P_{1a} and P_{1b} of the P25 promoter were obtained following secondary restrictions as indicated (H = HindIII; A = Aval; T = TaqI; D = DpnI; S = Sac II; E = EcoRI; X = XhoI). The empty boxes represent the size of the neo-transcript expected in run-off *in vitro* transcription assays.

Fig. 2 : Représentation schématique des régions 5' flanquantes des gènes de P25 et de fibroïne.

Les lignes supérieure et inférieure en gras représentent les fragments contenus respectivement avec les montages P25 1,7 HindIII/EcoRI Puc18 et de fibroïne 1,37 HindIII/XhoI Puc18. Les flèches indiquent les orientations des transcriptions. Les carrés noirs positionnent le domaine de 100 pb fortement homologue sur les promoteurs des gènes de P25 et de la fibroïne (domaine dont on a démontré qu'il était l'élément enhancer de la fibroïne, Suzuki *et coll.*, 1983). Les séquences de ces régions (Chevallard *et coll.*, 1986; Tsujimoto *et coll.*, 1979) sont détaillées, comparées et les homologies soulignées. La numérotation de base est fonction du site d'initiation de la transcription (désigné +1) de chaque gène.

Les sous-fragments P₀, P₁, P_{1a} et P_{1b} du promoteur de P25 ont été obtenus à partir des restrictions secondaires, comme il est indiqué (H = HindIII; A = Aval; T = TaqI; D = DpnI; S = Sac II; E = EcoRI; X = XhoI). Les carrés évidés représentent la taille du néo-transcrit attendu dans les tests de transcription *in vitro*.

Routinely, the distribution of step eluted protein was 65 % in the flow through fraction (0.1 M KCl), 15 % in the second fraction (0.4 M KCl) and 3 % in the last one (1.0 M KCl). Two-dimensional SDS-PAGE analysis of the protein content of each fraction was performed in order to evaluate the partitioning of the chromatography process (Figure 5a). This analysis revealed :

- the complexity of protein extracts from posterior silk gland cells, because of the numerous protein species spotted ;
- the efficiency of the partitioning performed, evidenced by the fact that only a few protein spots are common in the three fractions.

As shown in Figure 5b, gel retardation assays were carried out with each fraction. In order to reduce further the complexity of bandshift patterns, probe P₁ (-162 to -18, see Figure 2) has been used instead of probe P₀. Note that this new probe strictly encompasses the region of high homology between P25 and fibroin promoter domains (see Figure 2) (Couble *et al.*, 1985). Several retarded bands (at least three) were systematically detected in the flow through fraction. These bands correspond to two complexes with relative identical migrations designated A and B, and an additional faint complex with a lower migration (called AB). Further investigations reported elsewhere, using competition experiments and DNase I footprinting assays have shown that complexes A and B are formed independently and concern different regions of P25 promoter domain, and that complex AB is due to the interaction of both complexes A and B. In addition, comparisons with fibroin enhancer domain binding activities and cell distribution analysis of these factors in the silk gland were performed and are still in progress (Drevet, 1989 ; Drevet and Couble, 1990 ; Drevet *et al.*, 1991 submitted).

In contrast with the two strong complexes obtained in fraction 0.1 M KCl, fractions 0.3 and 1.0 M KCl revealed that very few proteins have affinity for P25 probe P₁. Only a weak complex with an identical migration to complex A was observed in some extracts in the 0.4 M KCl fraction. Footprinting experiments have revealed that this complex involves the same DNA sequence on probe P₁ as the one found for complex A in the 0.1 M KCl fraction (data not shown). This complex is likely due to an incompletely partitioned factor(s) giving the retarded band A in the flow through fraction during the Heparin-sepharose chromatography.

No reproducible complex was detected with the 1.0 M KCl step eluted fraction even when incubations were performed with high amounts of protein extracts.

Thus, protein factors interacting with P25 promoter DNA sequences are present in the flow through Heparin-sepharose chromatographic fraction of our whole cell extracts. This partition seems to be particular to our system, since most of the chromatographic fractionations realized to date in order to isolate specific DNA-binding proteins from nuclear or crude whole cell protein extracts, have shown that putative trans-acting factors are usually recovered in the 0.3 to 0.6 M salt eluted fractions. Therefore, the restriction of P25 promoter DNA-binding proteins only in the 0.1 M KCl fraction has several interesting aspects. Firstly, this fraction contains a low concentration of non-specific DNA-affinity proteins (e.g. : basic proteins as histones) which are, in their majority, eluted in the 0.4 and 1.0 M KCl fractions. As a consequence we have been able to reduce by 4 to 6 fold the concentration of non-specific DNA competitor used in bandshift experiments with the 0.1 M KCl fraction compared with the crude extract or even fractions 0.4 and 1.0 M KCl (for equal amount of protein used). Secondly, it appears that the 0.1 M KCl is free of an exonuclease activity present in some crude extracts (reported Figure 6c, lanes 1 to 4). This activity leads to the total disappearance of the probe after a 10 min. incubation period at 0 °C. Finally, the flow through fraction eluted at low ionic strength does not necessitate a dialysis step prior to being used in bandshift assays or in any further fractionation steps.

Optimization of DNA-protein interactions on P25 promoter sequences

Parameters which govern the reaction have been investigated in order to optimize the DNA-protein interactions. In a first experiment (see Figure 6a), increasing concentrations of protein extract (from 1 to 80 µg) were incubated with a fixed amount of probe P₁. The results of this first set of assays show that even with high amounts of protein it is not possible to shift all the probe into a complexed form. The following assays (Figure 6b), in which a fixed amount of protein extract was

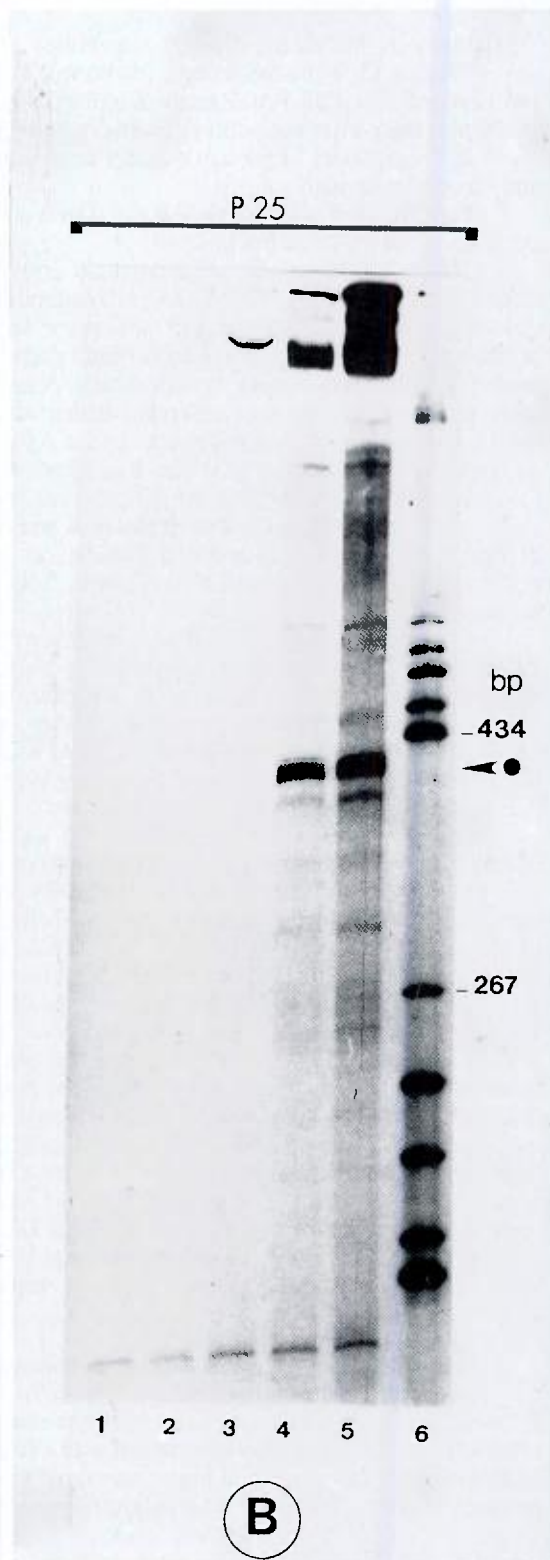
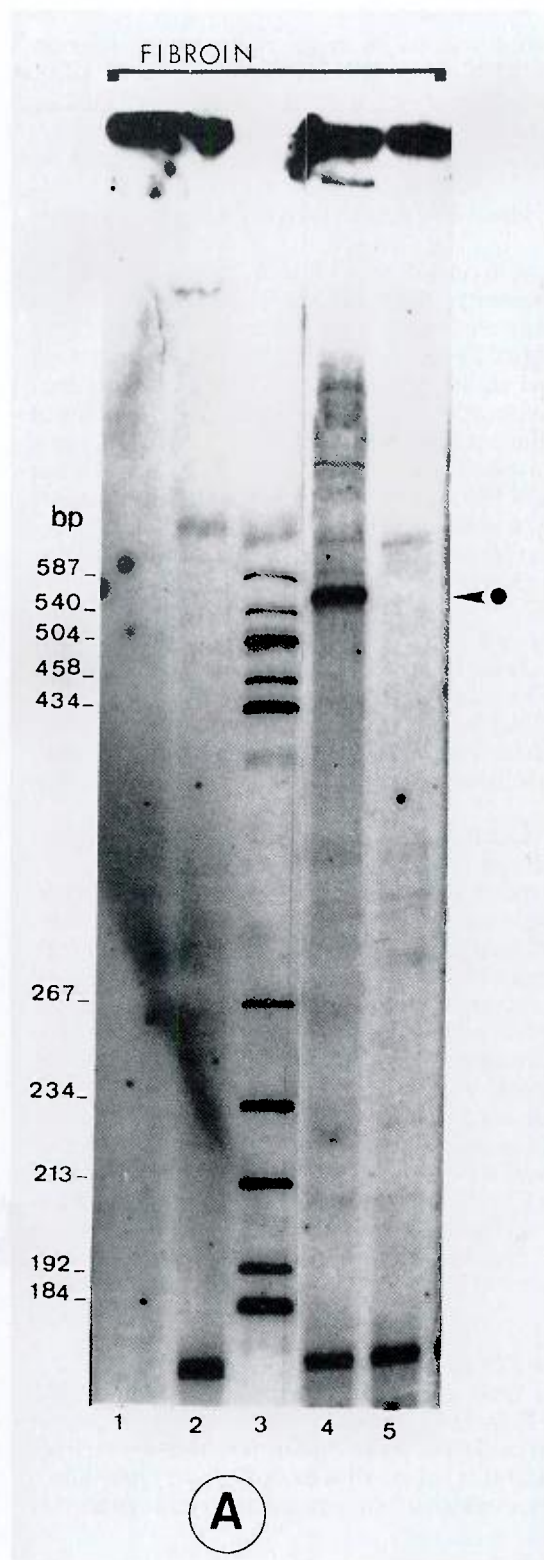


Fig. 3 : Run-off *in vitro* transcription assay with fibroin and P25 truncated templates.

Fibroin (HindIII/XhoI : 1.37 kb) or P25 1.7 kb (HindIII/EcoRI) restriction fragments (see Figure 2) were used as templates in run-off *in vitro* transcription assays using *Bombyx mori* whole cell extract (300 µg under standard conditions, unless otherwise indicated) (lanes 4 and 5 pBA and lanes 4 and 5 panel B). Lanes 1 and 2 panels A and B show control reactions carried out either in absence of protein extract (lanes 1) or in absence of DNA template (lanes 2). Polymerase II activity was ascertained using α -amanitin selective inhibitor (0.2 µg/ml) (lane 5 panel A and lane 3 panel B). γ P32 ATP 5'end-labelled HaeIII restriction fragments of pEMBL8 plasmid were loaded as size marker.

Fig. 3 : Tests de transcription *in vitro* à l'aide de matrices tronquées de fibroïne et de P25.

Les fragments de restriction des gènes de fibroïne (HindIII/XhoI : 1,37 kb) et de P25 1,7 kb (HindIII/EcoRI) (voir Figure 2) ont été utilisés comme matrices dans les essais de transcription *in vitro* en extrait protéique acellulaire de cellules de la partie postérieure de la glande séricigène (300 µg dans des conditions standard, sauf indication contraire) (puits 4 et 5, cliché A et puits 4 et 5, cliché B). Les puits 1 et 2 des clichés A et B montrent les réactions témoins obtenues soit en l'absence d'extrait protéique (puits 1) ou en l'absence de matrice d'ADN (puits 2). L'activité polymérase II est déterminée au moyen d'un inhibiteur sélectif α -amanitine (0,2 µg/ml) (puits 5, cliché A et puits 3, cliché B). Les fragments de restrictions HaeIII du plasmide pEMBL8 marqués au P32 sont utilisés comme indicateurs de taille.

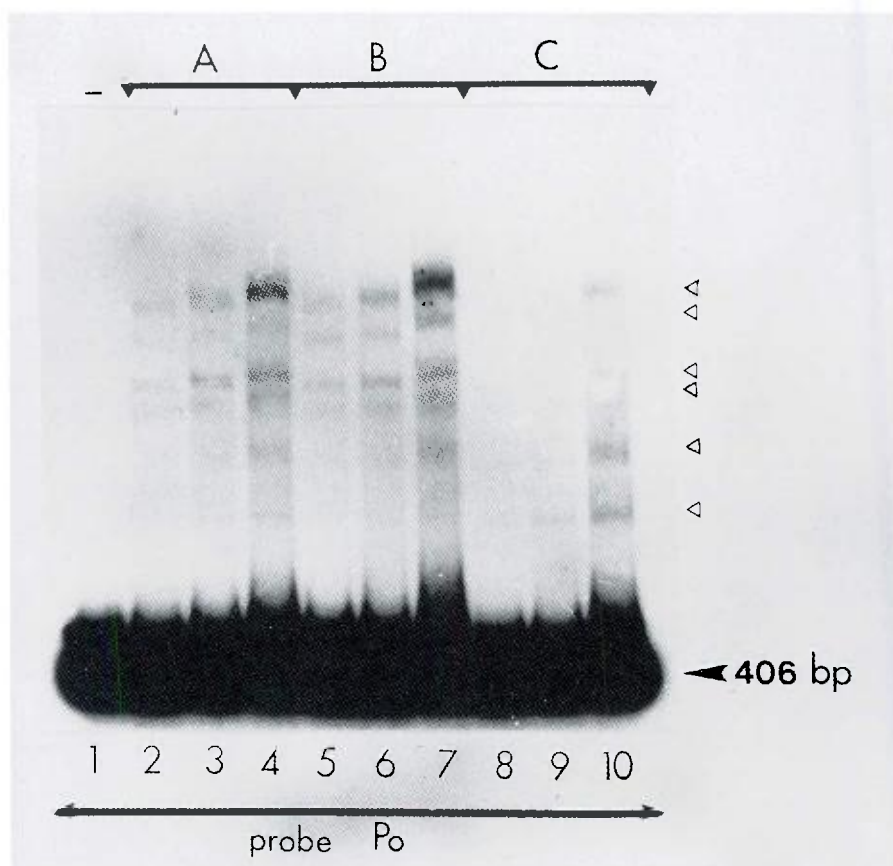


Fig. 4 : Gel retardation assays with posterior silk gland cell crude protein extracts.

1 ng (20,000 cpm) of probe P_0 (-424 to -18 ; see Figure 2) was incubated with 5 μ g (lanes 2, 5 and 8), 10 μ g (lanes 3, 6 and 9) and 20 μ g (lanes 4, 7 and 10) μ g of protein extract A, B et C collected from three different preparations. Lane 1 corresponds to a control performed without protein. The empty arrows indicate retarded complexes.

Fig. 4 : Test de retardement de migration en extrait protéique acellulaire total.

1 ng (20 000 cpm) de la sonde P_0 (de -424 à -18, voir Figure 2) ont été incubées avec 5 μ g (puits 2, 5 et 8), 10 μ g (puits 3, 6 et 9) et 20 μ g (puits 4, 7 et 9) μ g d'extraits protéiques A, B et C prélevés sur trois préparations différentes. Le puits 1 correspond à un témoin ne contenant pas de protéines. Les flèches vides indiquent les complexes retardés.

incubated with decreasing concentrations of probe P₁, confirm this point ; even with low amounts of probe the ratio of bound-DNA versus free-DNA remains unchanged. This is not due to the presence of an excess of unspecific proteins that could compete for the occupancy of the binding domain, since we have shown that even with high concentrations of unspecific competitor DNA the ratio of bound-DNA to free-DNA was not modified (see Figure 6d, lanes 11 to 14). This most likely reflects a problem of accessibility of both sites due to secondary structures we have evidenced in this area. Indeed, the domain encompassed by probe P₁ covers palindromic sequences which we suspect can form a stable loop structure (Couble *et al.*, 1985). We can make the assumption that this particular structure can be spontaneously adopted during the incubation of the probe with the protein extract partly preventing the probe from interacting with specific factor(s) A and B.

Besides, the dissimilarity in the intensity of the retarded bands A and B may suggest that complexes A and B involve different protein factor(s). These differences in the intensity of the retarded complexes could be in relation with differences in the abundance and/or in the affinity of the factor(s) for their target sequences. In addition, we have also noted that the intensity of the retarded bands changed in a non-linear manner when increasing concentrations of protein extract were used, suggesting cooperative interactions between protein factors giving complexes A and B (this is illustrated Figure 6a, between the conditions with 5 and 10 µg of protein, lanes 4 and 5). This was confirmed by the fact that scanner analysis and 'Scatchard' statistical interpretation of retarded complexes have enabled us to find a linear relation between the bound DNAs and the non-complexed DNA (data notshown).

Concentrations of other components in the bandshift reaction (KCl, EDTA, MgCl₂ and non-specific DNA competitors) as well as physical parameters (temperature and incubation time) have been optimized (Figure 6c and d).

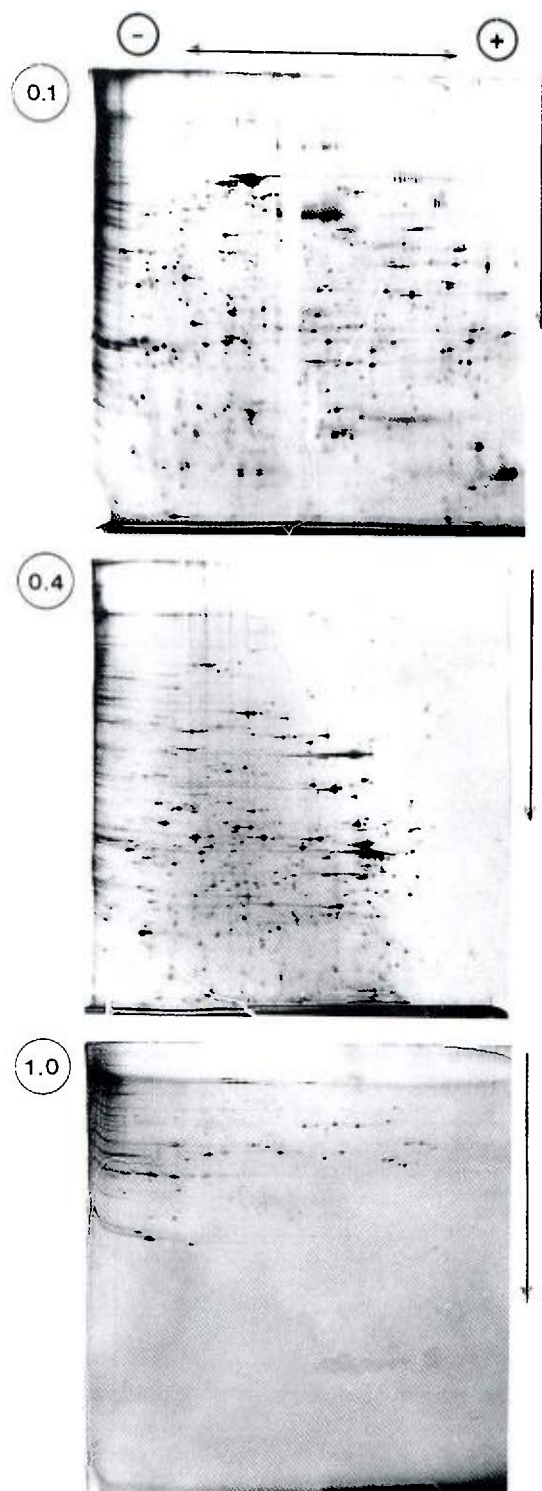
(i) Without non-specific competitor DNA, the probe saturated with protein did not enter the gel (see Figure 6c, lane 10). The addition of 1 µg of poly(dI.dC)-(dI.dC) (equivalent to a 1000 fold mass excess of cold DNA) was necessary to displace these proteins from the labelled probe. This type of synthetic DNA has very low affinity for the protein factors that we followed, since no competition on the retarded bands was observed even with increasing concentrations (up to 10 µg/per assay) (see Figure 6c, lanes 12 to 13). This was not the case with competitor-DNAs of higher complexity (e.g. : sonicated salmon sperm DNA or restriction fragments of pBR322 plasmid DNA) which compete strongly the specific retarded DNA-protein complexes when used at identical concentrations (1 to 2 µg/assay) (see Figure 6c, lanes 8 and 9). Since we have observed that a 10 fold molar excess of cold probe I is sufficient to completely eliminate the retarded bands (data not shown) (Drevet *et al.*, 1991 submitted), this efficient competition by unspecific DNAs suggests that the target sequences of these protein factors are short and that they can be statistically found in other DNAs.

(ii) Complexes were stable at 4 °C and equilibrium was reached within the first five minutes of the incubation. The intensity of the retarded bands decreased when reactions were performed at higher temperatures (above 5 °C) or for more than 20 minutes at 4 °C (not shown). This decrease in the intensities of the retarded bands is most likely due to nuclease activities and/or protease contaminations.

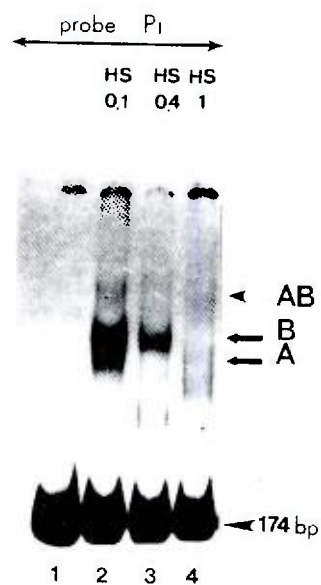
(iii) The complexes showed low sensitivity to the presence of divalent ions Ca²⁺ or Mg²⁺, since chelation performed by adding an excess of EDTA in the reaction mixture (up to 10 mM final concentration) had no effect on the retarded complexes (see Figure 6d).

Optimum conditions as defined in 'Materials and Methods' routinely give us a ratio of bound DNA to free DNA comprised between 0.4 and 0.5 with the 0.1 M KCl Heparin-sepharose fraction. Considering the fact that even after a first fractionation step the extract is relatively crude since many other proteins are present in the flow through fraction (more than 65 % in mass), these high ratios suggest that factors evidenced by these assays are relatively abundant in such extracts.

(iv) To further characterize complexes A and B, proteolytic and heat denaturing treatments were performed on the individual complexes obtained with subprobes P_{1a} and P_{1b} (resulting from Sac II secondary restriction of the initial P₁ probe ; Drevet and Couble, submitted). As shown in Figure 7a, trypsin or proteinase K treatment of the extract prior to the incubation period resulted in the disappearance of the retarded products. Also, heat treatments of the extract resulted in a rapid loss of its ability to give complexes with probes P_{1a} and P_{1b}. These experiments confirm the proteinous



A



B

Fig. 5A : SDS-PAGE two-dimensional analysis of fractionated silk gland protein extract.

As described in 'Material and Methods'. From top to bottom, fractions 0.1, 0.4 and 1.0 M KCl. The horizontal arrow indicates the direction of the run during the first migration (IEF : iso-electrofocusing), the vertical arrows indicate the direction of the second migration SDS-PAGE.

Fig. 5B : Gel retardation assay using fractionated extract.

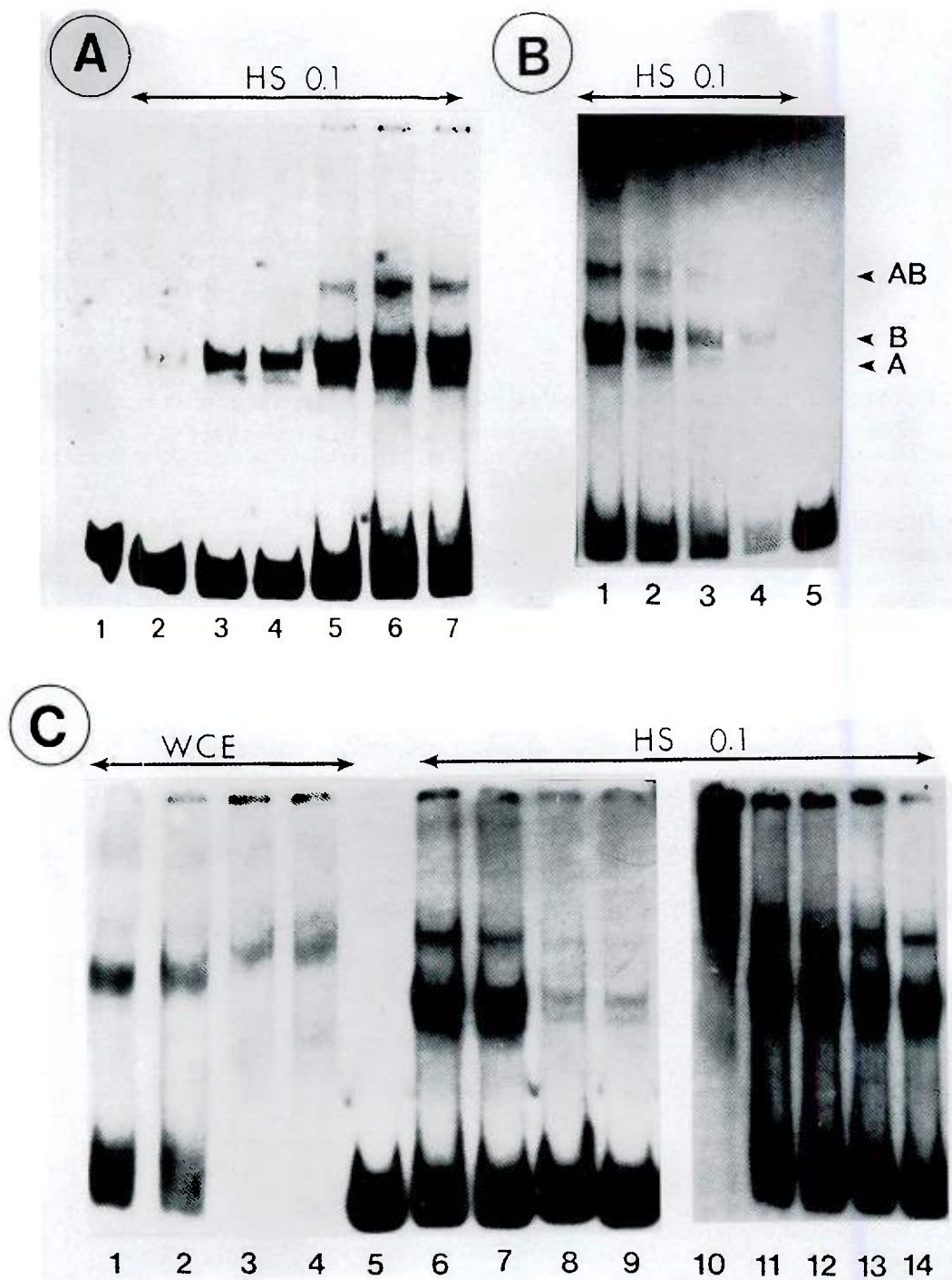
1 ng (20.000 cpm) of probe P₁ (-167 to -18, see figure 2) has been used in bandshift assays with 0 (lane 1) or 10 µg of protein of each Heparin-sepharose (HS) fraction (lanes 2 to 4, respectively). Arrows indicate retarded complexes.

Fig. 5A : Analyse bi-dimensionnelle SDS-PAGE d'un extrait protéique fractionné de cellules postérieures de la glande séricigène.

Conformément au protocole détaillé dans "Matériels et Méthodes". De haut en bas : fractions 0,1, 0,4 et 1,0 M KCl. La flèche horizontale indique le sens de migration au cours de la première électrophorèse (IEF : focalisation iso-électrique), les flèches verticales indiquent le sens de la deuxième migration (SDS-PAGE).

Fig. 5B : Test de retardement de migration avec un extrait fractionné.

1 ng (20.000 cpm) de la sonde P₁ (de -167 à -18 ; voir figure 2) a été incubé avec 0 (puits 1) ou 10 µg de protéine pour chaque fraction Héparine-sépharose (HS) (puits 2 à 4, respectivement). Les flèches dans la marge pointent les complexes retardés.



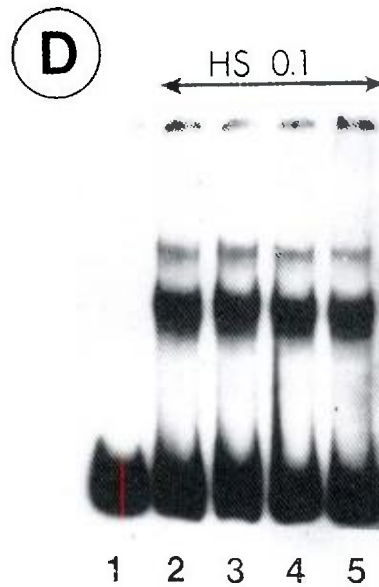


Fig. 6 : Optimization of DNA-protein interactions in the flow-through Heparin-sepharose fraction.

Probe P₁ (see Figure 2) was used in all the bandshifts shown in this figure. **Panel A** : from lanes 1 to 7, increasing concentrations of protein extract (fraction 0.1 M KCl), 0-1-5-10-20-40-80 µg respectively were incubated with a fixed amount of probe P₁. **Panel B** : decreasing concentrations of probe P₁ (from left to right, lanes 1 to 4 : 2-1-0.5-0.1 ng) were incubated with a fixed amount of protein extract (20 µg of fraction 0.1 M KCl). **Panel C** : Lanes 1 to 4, 1 ng of probe P₁ was incubated with increasing amounts of whole cell extract (10-20-40-80 µg of protein) or with no extract (lane 5). Lanes 6 and 7, standard bandshift assays using 20 µg of protein (fraction 0.1 M KCl), 1 ng of probe and 2 µg of cold competitor synthetic DNA poly(dI.dC)-(dI.dC). Lanes 8 and 9 identical reactions performed with 2 µg of cold pBR322 plasmid DNA (lane 8) or 2 µg of sonicated herring sperm DNA (lane 9) as non-specific competitors. Lanes 10 to 14 standard bandshift assays carried out without non-specific DNA competitor (lane 10) or with increasing concentrations of poly(dI.dC)-(dI.dC) : 0.5-1-5-10 µg (lanes 11 to 14, respectively). **Panel D** : bandshift assays realized under standard conditions in the presence of increasing concentrations of EDTA (5-10-20 mM, lanes 3 to 5, respectively).

Fig. 6 : Optimisation des interactions ADN-protéines dans la fraction 0.1 M KCl Héparine-sépharose.

La sonde P₁ (voir Figure 2) a été utilisée dans tous les gels présentés dans cette figure. **Cliché A** : puits 1 à 7, des concentrations croissantes d'extraits protéiques (fraction 0.1 M KCl), 0-1-5-10-20-40-80 µg, respectivement, ont été incubées avec une quantité déterminée de la sonde P₁. **Cliché B** : des concentrations décroissantes de la sonde P₁ (de gauche à droite, puits 1 à 4 : 2-1-0.5-0.1 ng) ont été incubées avec une quantité déterminée d'extrait protéique (20 µg de la fraction 0.1 M KCl). **Cliché C** : puits 1 à 4, 1 ng de la sonde P₁ a été incubé avec des concentrations de plus en plus fortes d'extraits de cellules intactes (10-20-40-80 µg de protéines) ou sans extrait (puits 5). Les puits 6 et 7 sont des réactions de contrôle où 20 µg de protéine (fraction 0.1 M KCl), 1 ng de sonde et 2 µg de poly(dI.dC)-(dI.dC) d'ADN synthétique compétiteur froid ont été utilisés. Les réactions identiques des puits 8 et 9 obtenues avec 2 µg d'ADN de plasmide pBR322 (puits 8) ou 2 µg d'ADN de sperme de hareng soniqué (puits 9) utilisés comme compétiteurs non-spécifiques. Dans les échantillons 10 à 14, les réactions ont été réalisées sans compétiteur d'ADN non-spécifique (puits 10) ou avec des concentrations de plus en plus fortes de poly(dI.dC)-(dI.dC) : 0.5-1-5-10 µg (puits 11 à 14 respectivement). **Cliché D** : les tests de retard de migration ont été réalisés dans des conditions standard en présence de concentrations de plus en plus fortes d'EDTA (5-10-20 mM, puits 3 à 5 respectivement).

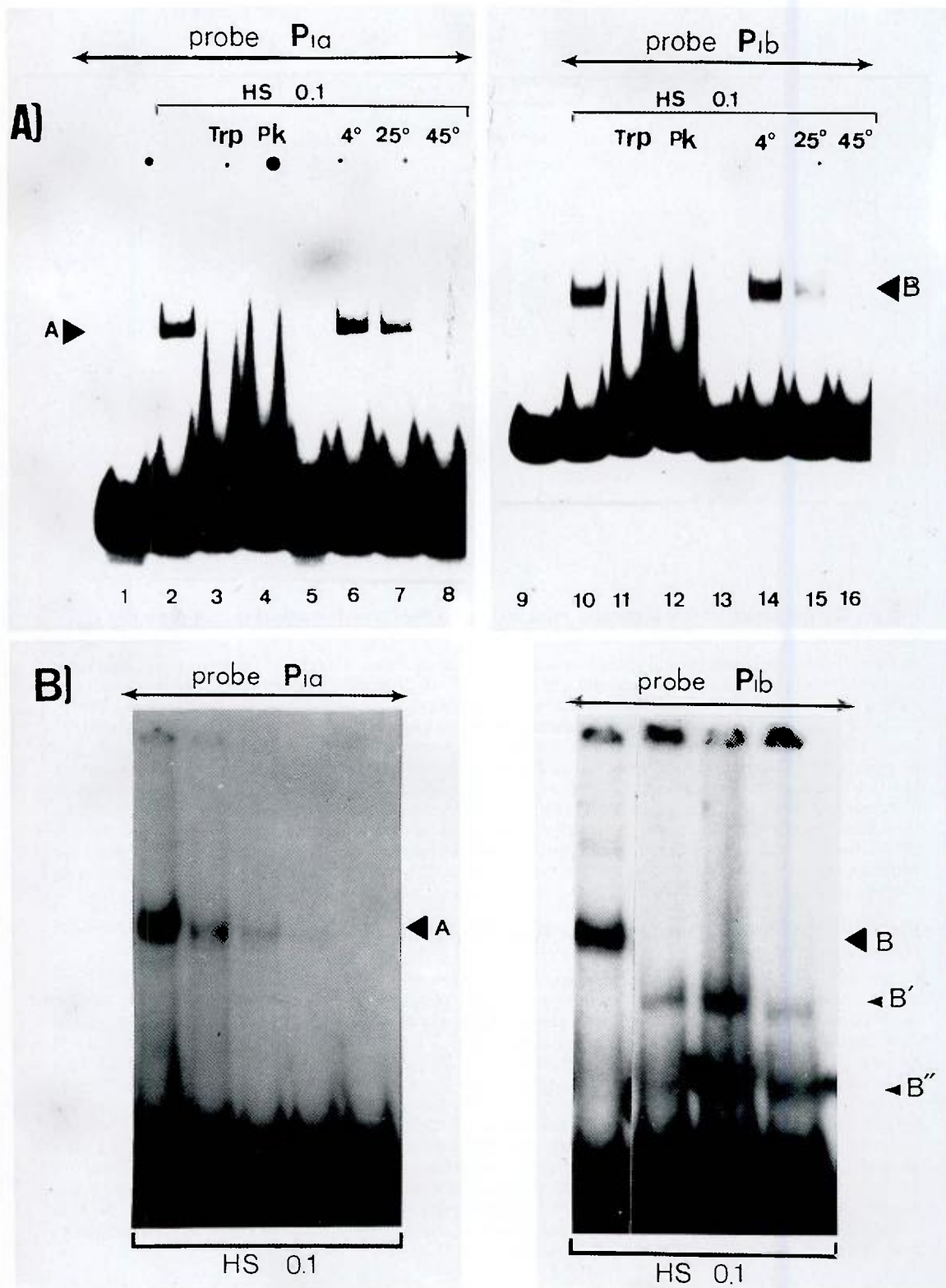


Fig. 7A : Proteinous nature of A and B P25 promoter DNA-protein interactions ascertained by heat and proteolytic treatments

Probes P_{1a} and P_{1b} were incubated with 0 µg (lanes 1, 5 and 9, 13) and 20 µg (lanes 2, 3, 4, 6, 7, 8 and 10, 11, 12, 14, 15, 16) of protein from fraction 0.1 M KCl under standard conditions. Lanes 3 and 11, the protein extract was treated for 10 min at 4 °C with 10 µg of proteinase K. Lanes 4 and 12, the protein extract was treated for 10 min at 4 °C with 50 ng of trypsin. Lanes 6 to 8 and 14 to 16, the protein extract was subjected, prior to incubation with the probe, to a 30 min. heat treatment at the following temperatures : 4, 25 and 45 °C.

Fig. 7B : Partial proteolytic cleavages of complexes A and B.

Probes P_{1a} and P_{1b} were incubated with 20 µg of protein (fraction 0.1 M KCl) and treated with trypsin (5 to 25 ng) for 10 min. at 4 °C. Arrows indicate complex B and subcomplexes of lower migration generated (complexes B' and B'').

Fig. 7A : Confirmation de la nature protéique des interactions A et B sur le promoteur de P25.

Les sondes P_{1a} et P_{1b} ont été incubées avec 0 µg (puits 2, 3, 4, 6, 7, 8 et 10, 11, 12, 14, 15, 16) de protéines issues de la fraction 0.1 M KCl dans des conditions standards. Puits 3 et 11 : l'extrait protéique a été préalablement traité avec 10 µg de protéinase K pendant 10 minutes à 4 °C. Puits 4 et 12 : l'extrait protéique a été préalablement traité avec 50 ng de trypsine pendant 10 minutes à 4 °C. Puits 6 à 8 et 14 à 16 : l'extrait protéique est soumis, avant incubation avec la sonde, à un traitement à la chaleur de 30 minutes aux températures suivantes : 4, 25 et 45 °C.

Fig. 7B : Clivages protéolytiques partiels des complexes A et B.

Les sondes P_{1a} et P_{1b} sont incubées avec 20 µg de protéines (fraction 0.1 M KCl) et traitées à la trypsine (5 à 25 ng) pendant 10 minutes à 4 °C. Les flèches signalent le complexe B et les complexes de migration plus élevés générés par la protéolyse ménagée (complexes B' et B'').

nature of the interactions evidenced on P25 promoter domain. Partial proteolytic cleavages (Schreiber *et al.*, 1988) following the incubation have revealed that complex B was shifted to two subcomplexes B' and B'' of lower migration (see Figure 7b). Such behavior after partial proteolytic cleavages was not observed with complex A. This confirms the difference between complex A and complex B and suggests that complex B might be composed of different polypeptides or that is possible to separate the binding domain (protected by the DNA) from other areas that could carry the activity of the complexed factor.

The development of DNA-dependent soluble *in vitro* system for mammalian RNA polymerase II has been a long-standing objective in the study of eukariotic gene regulation. In the last decade concentrated whole cell extracts (e.g. : HeLa whole cell extracts) have been extensively used to transcribe *in vitro* viral genes as well as mammalian genes (Weil *et al.*, 1979 ; Manley *et al.*, 1980a, 1980b). The availability of such a soluble system has permitted the investigation of regulatory factors that control the rate of initiation at different promoter sites. But the use of such heterologous systems does not truly reflect the regulation of polymerase II activity.

Here we report the preparation and rapid fractionation of a homologous cell-free system that can be used in *in vitro* transcription assays as well as in gel retardation experiments. The origin of this protein extract is the posterior silk gland cells of *Bombyx mori* which, as it has been pointed out in this report, constitute an attractive system for the understanding of the mechanisms of temporal, spatial and hormonal regulated silk protein genes. To our mind, no other system developed to date allows such a complete approach of the mechanisms of gene regulation in eukariotic cells.

The identification of *cis*- and *trans*-acting elements that play roles in the regulated expression of silk gland genes has been undertaken and is still in progress. Characterization of P25 promoter binding activities (complexes A and B and upstream complexes) are under extensive study, as well as comparisons with fibroin enhancer protein binding properties (Tsuda *et al.*, 1986 ; Suzuki and Suzuki, 1988) and sericin 1 promoter region, respectively to explain the strict coordination existing between P25 and fibroin genes and the restriction of expression of P25/fibroin genes versus sericin genes within the same tissue (Drevet, 1989 ; Drevet and Couble, 1990 ; Drevet *et al.*, 1991 submitted). In addition, *in vitro* results will be compiled with *in vivo* experiments carried out in *Bombyx mori* transgenic worms and also performed in heterologous context using *Drosophila melanogaster* transgenic flies, since we have been able to show that P25 gene constructs injected in *Drosophila* embryos are correctly expressed and that the expression is restricted to the anterior part of the *Drosophila* salivary gland – the ontogenic equivalent of the *Bombyx mori* silk gland – (Bello and Couble, 1990).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the 'Unité nationale séricicole' (La Mulatière, Lyon, France) for providing us with *Bombyx mori* larvae.

REFERENCES

- BELLO B., COUBLE P.M. (1990), Specific expression of a silk-encoding gene of *Bombyx* in the anterior salivary gland of *Drosophila*. *Nature*, 346,480-482.
- CHEN E.I., SEEBURG P.H. (1985), Supercoil sequencing : a fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA*, 4, 165-170.
- CHEVILLARD M., COUBLE P., PRUDHOMME J-C. (1986), Complete nucleotide sequence of the gene encoding the *Bombyx mori* silk protein P25 and predicted amino-acid sequence of the protein. *Nucleic Acids. Res.*, 14, 6341-6342.
- COUBLE P.M., CHEVILLARD M., MOINE A., RAVEL-CHAPUIS P., PRUDHOMME J-C. (1985), Structural organization of the P25 gene of *Bombyx mori* and comparative analysis of its 5'-flanking DNA with that of the fibroin gene. *Nucleic Acids. Res.*, 13, 1801-1814.
- COUBLE P.M., 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, 431-440.

- COUBLE P.M., MOINE A., GAREL A., PRUDHOMME J.-C. (1983), Developmental variations of a non-fibroin mRNA of *Bombyx mori* silk gland encoding for a low-molecular-weight silk protein. *Developmental Biol.*, 97, 398-407.
- DARNELL J.E. jr (1982), Variety in the level of gene control in eukaryotic cells. *Nature*, 297, 365-371.
- DREVET J.R. (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. Ph.D. thesis, UCLB Lyon I.
- DREVET J.R., COUBLE P. (1990), Tissue-specific expression of protein factors showing affinity for the promoter regions of silk protein genes in *Bombyx mori*. *Sericologia*, 30, 171-187.
- FAYARD J.M. (1978), Production de soie et caractéristiques des glandes séricigènes de 13 races de Ver à Soie (*Bombyx mori*). *Ann. Genet. Sel. Anim.*, 10, 259-270.
- FRIED J.A., CROTHERS D.M. (1981), Equilibrium and kinetics of *lac* repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids. Res.*, 9, 6505-6525.
- GARNER M.M., REVZIN A. (1981), A gel electrophoresis method for quantifying the binding of protein to specific DNA-regions. *Nucleic Acids. Res.*, 9, 3047-3060.
- GRUSS P. (1984), Magic enhancers ? *DNA*, 3, 1-5.
- HEUKESHOFEN J., DERNICK R. (1985), Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*, 6, 103-112.
- LOWRY O.H., ROSENROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. (1951), Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- MICHAÏLLE J.-J., GAREL A., PRUDHOMME J.-C. (1989), The expression of five middle silk gland specific genes is territorially regulated during the larval development of *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*, 1, 19-27.
- MANIATIS T., GOODBOURNS S., FISCHER J.A. (1987), Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science*, 236, 1237-1245.
- MANIATIS T., FRITSCH E., SAMBROOK J. (1982), *In Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- MANLEY J.L. (1980a), *In vitro* transcription in whole cell extract. *Methods in Enzymology*, 101, 568-582.
- MANLEY J.L., FIRE A., CANO A., SHARP P.A., GEFTER M. (1980b), DNA-dependent transcription of adenovirus genes in a soluble whole-cell-extract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 3855-3859.
- MORRISSEY J.H. (1981), Silver stain for proteins in polyacrylamide gels : a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.*, 117, 307-310.
- O'FARREL P.H. (1975), High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 250, 4007-4021.
- PERDRIX-GUILLOT S. (1974), Endoduplication de la chromatine dans la glande séricigène de *Bombyx mori*. Structures nucléaires dans la glande séricigène embryonnaire. *Ann. Embryol. Morphol.*, 7, 445-458.
- PTASHNE M. (1986), Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance. *Nature*, 322, 697-701.
- PTASHNE M. (1988), How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature*, 335, 683-689.
- SCHLOKAT U., GRUSS P. (1990), Enhancer as control elements for tissue-specific transcription. *In Oncogene and Growth Control*. Kahn P. and Grap T. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, p. 226.
- SCHREIBER E., MATHIAS P., MULLER M.M., SCHAFFNER W. (1988), Identification of a novel lymphoid specific octamer binding protein (OTF-2B) by proteolytic clipping bandshift assay (PCBA). *EMBO J.*, 7, 4221-4229.
- SHIGEMATSU H., MORIYAMA H. (1970), Effect of ecdysterone on fibroin synthesis in posterior division of silk gland of silkworm *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 16, 2015.
- SHIMURA K. (1988), The structure, synthesis and secretion of the fibroin in the silkworm *Bombyx mori*. *Sericologia*, 28, 457-479.
- SUZUKI T., SUZUKI Y. (1988), Interaction of composite protein complex with the fibroin enhancer sequence. *J. Biol. Chem.*, 263, 5979-5986.

- TSUDA M., HIROSE S., SUZUKI Y. (1986), Participation of the upstream region of the fibroin gene in the formation of transcription complex *in vitro*. Mol. Cell. Biol., 6, 3928-3933.
- TSUDA M., SUZUKI Y. (1981), Faithful transcription initiation of fibroin gene in a homologous cell-free system reveals an enhancing effect of 5'-flanking sequence far upstream. Cell, 27, 175-182.
- TSUJIMOTO Y., SUZUKI Y. (1979), The DNA sequence of *Bombyx mori* fibroin gene including the 5'-flanking mRNA coding entire intervening and fibroin protein coding regions. Cell, 18, 591-600.
- WEIL P.A., LUSE D.S., SEGALL J., ROEDER R.G. (1979), Selective and accurate initiation of transcription at the Ad2 major late promoter in a soluble system dependent on purified RNA polymerase II and DNA. Cell, 18, 469-478.

PREPARATION ET FRACTIONNEMENT RAPIDE D'UN EXTRAIT PROTEIQUE ACELLULAIRE DE GLANDES SERICIGENES : ETUDES PRELIMINAIRES DES INTERACTIONS ADN-PROTEINES EN AMONT DU GENE DE P25

J.R. DREVET* & P.M. COUBLE

Université Claude Bernard, Lyon I, Centre de Génétique moléculaire et cellulaire, UMR 106 du
CNRS, 42, boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

*L'expression territorialisée et coordonnée des gènes de la soie dans les cellules de la glande séricigène de **Bombyx mori** constitue un modèle intéressant pour la compréhension de la régulation temporelle, spaciale et hormonale de l'expression des gènes. Des extraits protéiques de cellules de la région postérieure de la glande séricigène, transcriptionnellement actifs, ont été préparés et rapidement fractionnés afin d'identifier les protéines se liant à l'ADN pouvant rendre compte de l'expression sélective des gènes des protéines de la soie (P25/fibroïne). Deux interactions ADN-protéines, présentes dans une fraction chromatographique élue à faible salinité, ont été mises en évidence dans le domaine du promoteur de P25. Des études préliminaires ont été réalisées afin d'optimiser les interactions ADN-protéine(s).*

INTRODUCTION

Les cellules utilisent en permanence une partie seulement de l'information génétique codée dans l'ADN. La diversité des types cellulaires est due aux différences dans le sous-ensemble de l'information totale exprimée par des cellules distinctes. De même, le développement et la différenciation sont associés à des changements dans le profil d'expression des gènes à l'intérieur d'une même cellule. Ainsi, les processus par lesquels sont établis ces profils différentiels d'expression sont d'un intérêt primordial pour la croissance et la différenciation des organismes pluricellulaires.

A ce jour, un grand nombre de gènes spécifiques d'un tissu ou d'un stade du développement ont été identifiés. Dans la plupart des systèmes étudiés, l'expression des gènes semble régulée, au moins en partie, au niveau de l'initiation de la transcription (voir Maniatis et coll. (1987) pour des exemples récents et Gruss (1984) et Darnell (1982) pour la revue). Il est maintenant bien établi que le contrôle transcriptionnel de l'expression des gènes spécifiques d'un type cellulaire s'accomplit sous l'action de protéines se liant à des séquences "cibles" de l'ADN, localisées plus communément dans les domaines dits "promoteur" ou "enhancer" (voir Ptashne (1986-1988) et Schlokot et Gruss (1986) pour la revue). L'opinion la plus répandue est que la régulation de la transcription à partir d'un promoteur donné implique l'activité concertée de protéines multiples.

* Correspondance : Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, The University of Calgary, Calgary, Alberta T2N 4N1, Canada.

Bien que de nombreux systèmes et de nombreux gènes aient été étudiés afin de comprendre les mécanismes de contrôle de la transcription au niveau de l'intensité et sur les plans temporel et spatial, aucun d'eux ne permet une approche aussi complète des voies de régulation utilisées que le modèle de la glande séricigène de *Bombyx mori*. En fait, la plupart des systèmes étudiés concernent des cellules en culture et n'ont donc aucun "passé" de développement.

Les points suivants exposent brièvement les principales caractéristiques du modèle de la glande séricigène de *Bombyx mori* et montrent que c'est un modèle unique et puissant pour la compréhension des mécanismes de l'expression des gènes. La glande séricigène de *Bombyx mori* (voir Fig. 1b) est un organe strictement limité à la production d'un ensemble de protéines qui constituent le fil de soie. Au cours des périodes sécrétrices, qui coïncident avec les inter-mues larvaires, la production massive de P25 et de fibroïne, les deux sous-unités liées par pont disulfure de la protéine principale de soie, résulte de l'expression intense de leurs gènes respectifs dans le sécréteur (PSG, voir Fig. 1b). La transcription de ces deux gènes uniques (par génome haploïde) se fait de manière intense et strictement coordonnée. En effet, l'accumulation de chaque transcrit est identique au cours de la phase d'activité sécrétrice (Couble et coll., 1983) et l'activité des deux gènes est ponctuée par le cycle du développement larvaire de l'insecte (les gènes sont exprimés au cours des périodes d'inter-mue et restent silencieux pendant les mues). De plus, l'activité de ces deux gènes est strictement limitée aux cellules du sécréteur (Couble et coll., 1987).

Un autre aspect intéressant de ce système biologique tient au fait que les cellules du réservoir de la glande séricigène (MSG, voir Fig. 1b), qui constitue une partie du même organe, produisent, en même temps que les cellules postérieures, un ensemble de protéines (appelées sérécines) et subissent les mêmes phénomènes au cours du développement larvaire (Michaillie et coll., 1989).

Ainsi, la concertation étroite de l'expression des gènes de P25 et de fibroïne dans les cellules du sécréteur et la restriction de l'expression des gènes de la soie à deux territoires différents d'un même organe suggèrent qu'il existe un niveau de coordination des gènes dans l'ensemble de cet organe.

Enfin, depuis de nombreuses années on sait qu'un contrôle hormonal (partiellement assuré par des ecdystéroïdes) gouverne étroitement le développement larvaire du ver à soie et agit directement sur l'expression des gènes des protéines de la soie (Shigematsu et Moriyama, 1970).

La glande séricigène de *Bombyx mori* se présente donc comme un modèle complet pour l'étude des mécanismes de la spécificité tissulaire, temporelle et hormonale de l'expression des gènes de classe II.

Il y a quelques années, nous avons démontré que les gènes de P25, de fibroïne et de sérécine I présentaient des homologies de séquences dans leurs régions flanquantes en 5' (Couble et coll., 1985). Ceci laissait suggérer que la coordination et la restriction de l'expression des gènes de la soie pouvaient être gouvernées par des facteurs (protéines) agissant en trans et interagissant avec des séquences d'ADN communes à ces gènes ou spécifiques de chaque gène. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons entrepris l'analyse des interactions ADN-protéines dans des extraits protéiques de cellules de la glande séricigène de *Bombyx mori*. Nous présentons ici la préparation et le fractionnement d'extraits protéiques élaborés à partir de cellules du sécréteur, et les études préliminaires effectuées avec le domaine du promoteur de P25 par retardement sur gel (Bandshift) afin d'identifier des protéines pouvant agir comme facteurs de régulation de la transcription.

MATERIELS ET METHODES

Matériels

Les endonucléases de restriction, l'ADN-polymérase I (fragment de Klenow), la phosphatase d'intestin de veau, la polynucléotide-kinase T4 et la protéinase K ont été obtenus auprès de Boehringer Mannheim. L'ADN synthétique poly(dI.dC) et le PMSF (fluorure de phényl-méthylsulfonyl) proviennent de chez Sigma. L'héparine-sépharose provient de Pharmacia. Les isotopes radioactifs ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ et le $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$) ($> 5000 \text{ Ci/mme}$) sont commercialisés par Amersham Corp.

Animaux :

Les vers à soie sont des hybrides des souches européennes (200 × 300) de *Bombyx mori* élevés à l'Unité nationale séricicole (La Mulatière, Lyon) à 22 °C avec des feuilles de mûrier fraîches fournies quatre fois par jour.

Méthodes

Préparation des extraits cellulaires :

Les extraits de protéiques acellulaires sont préparés à partir de cellules du sécréteur suivant la méthode initialement décrite par Tsuda et coll. (1981) avec les modifications suivantes. Les larves de vers à soie (120, entre le premier et le deuxième jour du cinquième âge larvaire) sont disséquées et les sécréteurs (PSG, voir Fig. 1b) sont prélevés et congelés immédiatement dans de l'azote liquide avant stockage à -80 °C. Les glandes séricigènes sont rapidement réchauffées à 0 °C par lavage dans un tampon A contenant : 40 mM Tris-HCl (pH 7,9), 5 mM MgCl₂, sucrose à 12 %, glycérol à 25 %, 0,5 mM PMSF. Les glandes séricigènes sont ensuite hachées avec des ciseaux et homogénéisées dans un broyeur "Dounce" dans 10 ml du tampon A supplémenté en DTT (dithiothréitol) 3 mM. Le broyat est précipité par addition d'un dixième de volume de (NH₄)₂SO₄ saturé en remuant doucement. Le broyat est ensuite centrifugé à 45 000 tours/minute pendant 4 heures dans un rotor 50,2 Ti (Beckmann) à 0 °C et le surnageant est précipité par addition de (NH₄)₂SO₄ solide (0,33 g/ml). Après dissolution complète, la solution est centrifugée pendant 30 minutes à 30 000 tours/minute dans un rotor 50,2 Ti (Beckmann) à 0 °C. Le culot est resuspendu dans 1/20 du volume initial du tampon de dialyse contenant : 20 mM HEPES [acide sulfonique N-2-hydroxyéthyl-pipérazine-N-2-éthane]-NaOH (pH 7,9), 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 2 mM DTT, 17 % de glycérol, 0,5 mM PMSF, 0,15 mM de spermidine et 0,15 mM de spermine. Après dialyse pendant 5 heures à 4 °C, le dialysat est centrifugé à 30 000 tours/minute à 0 °C pendant 30 minutes dans un rotor 50 Ti (Beckmann). Le surnageant est finalement aliquoté et congelé dans de l'azote liquide. Le contenu en protéines est déterminé suivant la méthode de Lowry et coll. (1951) en utilisant de la sérumalbumine bovine comme étalon. Les extraits sont ajustés entre 20 et 30 mg de protéines/ml.

Fractionnement des extraits de cellules entières :

La chromatographie sur héparine-sépharose des extraits protéiques acellulaires est réalisée comme suit. Toutes les opérations sont effectuées à 4 °C. Dix ml d'extrait brut ajusté à 5 mg/ml sont appliqués sur une colonne héparine-sépharose de 2 ml équilibrée dans un tampon H contenant 0,1 M KCl (le tampon H est composé de 20 mM HEPES pH 7,9, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF et 20 % glycérol. La colonne est rincée avec 6 ml de tampon H contenant 0,1 M KCl et 5 volumes avec du tampon H plus 0,4 M KCl suivi de 5 volumes de tampon H plus 1,0 M KCl. Les fractions protéiques (500 µl) à chaque élution sont regroupées et les fractions éluées avec 0,4 et 1,0 M KCl sont dialysées pendant cinq heures contre le tampon H (faible salinité) et rapidement congelées dans l'azote liquide avant stockage à -80 °C.

Sondes ADN :

Les fragments d'ADN utilisés comme matrices dans les essais de transcription "run-off" *in vitro* et les sondes utilisées dans les expériences de retardement de migration sont présentés dans la figure 2. Tous les fragments d'ADN ont été sous-clonés dans de l'ADN plasmidique pUC18 et contrôlés par séquençage rapide des nucléotides sur de l'ADN double brin suivant la méthode décrite par Chen et coll. (1985). Les inserts ont été excisés des vecteurs plasmidiques, marqués en 5' avec l'ATP [γ -32P] en utilisant la polynucléotidique-kinase T4, puis purifiés sur une colonne Elutip-d pré-conditionnée suivant les conditions spécifiées par Schleicher et Schuell.

Expériences de transcription *in vitro* "run off" :

Les essais "run off" *in vitro* sont effectués dans un tampon de 25 µl composé de 12 mM HEPES pH 7,9, 7 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,2 mM EDTA 1,3 mM DTT, du glycérol à 10 %, 10 mM de créatine-phosphate, 500 µM de GTP et CTP, 50 µM d'ATP, 5 µCi [α -32P]UTP, 8 à 15 µl d'extrait protéique (soit 200 à 600 µg de protéines) et 0,1 à 1,0 µg d'ADN matrice calibré. L'incubation est

réalisée pendant 45 à 60 minutes à 30 °C, la synthèse d'ARN est alors arrêtée par addition de 6 volumes d'une solution composée de 2,5 M d'acétate d'ammonium, 1 % SDS, 25 µg/100 µl d'ARNt entraîneur et une unité d'inhibiteur d'activité RNases (Boehringer Mannheim). Les ARN marqués sont extraits au phénol/chloroforme (1/1), précipités à l'éthanol, dénaturés à la chaleur pendant 5 minutes à 95 °C dans de la formamide à 95 % et déposés sur un gel d'acrylamide dénaturant à 6 % (19/1:acrylamide/bis-acrylamide). Les gels sont séchés et exposés pendant une nuit à -70 °C contre un film autoradiographique (Kodak X-AR 5). Les fragments de restriction Hinf I de l'ADN plasmidique pEMBL8 marqués radioactivement en 5' sont utilisés comme marqueurs de taille.

Tests de retardement de migration :

Les fragments marqués (0,1 à 1 ng) sont incubés dans un extrait protéique total ou dans une fraction d'extrait protéique (25 µg de protéines sauf indication contraire) issu des cellules du sécréteur. Les complexes protéines-ADN sont ensuite séparés sur gels de polyacrylamide natifs à faible force ionique (Fried et Crothers, 1981 ; Garner et Revzin, 1981). L'incubation des sondes avec les extraits protéiques est effectuée à 0 °C pendant 20 minutes dans un volume final de 25 µl composé de 12 mM HEPES NaOH (pH 7,9), 60 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 4 mM Tris-HCl, 0,6 mM DTT, glycérol à 12 % et en présence de quantités optimales (3 à 10 µg dans une réaction de 25 µl) d'ADN non spécifiques [sperme de hareng ou pBR322 ou poly(dI.dC)-(dI.dC)]. Les conditions optimales des interactions protéines-ADN sont déterminées pour chaque sonde en changeant les concentrations en protéines, en compétiteurs non spécifiques et en ADN marqués dans le mélange de réaction. Après 30 minutes de pré-électrophorèse (30 mA), les échantillons sont chargés sur un gel natif d'acrylamide à 5 % (19/1) pendant une durée appropriée (déterminée par la longueur de chaque sonde) à 15 volts/cm. Le gel est ensuite séché et exposé contre un film autoradiographique pendant 12 heures à -70 °C.

La nature protéique des facteurs liés à l'ADN est testée par digestion des extraits par la protéinase K (20 µg, 15 minutes à 10 °C) ou par la trypsine (50 ng, 15 minutes à 10 °C) ainsi que par un traitement à la chaleur avant incubation avec les sondes marquées dans les conditions standards.

Pour les expériences de "protein-clipping", les facteurs complexés sont digérés par addition de 5, 10 ou 25 ng de trypsine après la période d'incubation. Les incubations sont ensuite poursuivies pendant 10 minutes à 0 °C et les échantillons sont chargés sur un gel non dénaturant à 5 % suivant la méthode décrite plus haut.

Analyse par électrophorèse bi-dimensionnelle des extraits protéiques fractionnés :

Les protocoles utilisés pour la préparation des échantillons protéiques et pour l'électrophorèse suivent essentiellement la procédure décrite par O'Farrel (1975). Les protéines sont précipitées par l'acétone (2 volumes, 30 minutes, deux fois à -20 °C) et resuspendues dans un tampon de chargement composé de 9,5 M urée, 6 % Triton X-100, 2 % ampholites (amplitude du pH 3,5 à 9,5) [Pharmacia]. Dix à 150 µg de protéines par échantillon sont déposés sur des gels d'électrofocalisation cylindriques (150 × 1 mm) contenant 4 % d'acrylamide (28,4/1,6), 9,2 M d'urée, 2 % de triton X-100, 4 % d'ampholites. La focalisation est réalisée à 25 °C pour 14 600 volts/heure. Après équilibrage pendant 5 minutes dans un tampon contenant 0,25 M de Tris-HCl (pH 8,0), 2 % de SDS, 10 % de sucrose, les gels sont congelés et stockés à -70 °C ou chargés directement en deuxième dimension sur des gels de séparation d'acrylamide à 10 %. Les électrophorèses sont effectuées à une température constante de 1 °C dans un tampon 0,25 M Tris-HCl 0,25 M (pH 8,3), 0,192 M glycine, 0,1 % SDS. Les conditions de migration sont de 80 mA pendant 2,5 heures. Les protéines séparées sont visualisées après coloration à l'AgNO₃ suivant la procédure décrite par Morrissey (1981). Le bruit de fond est réduit par immersion des gels pendant 30 secondes dans le réducteur de "Farmer" (Heukeshoven et Dernick, 1983).

RESULTATS ET DISCUSSION

La glande séricigène de *Bombyx mori* présente des possibilités expérimentales qui n'ont de contrepartie dans aucun autre modèle étudié. Les propriétés qui rendent ce système biologique intéressant peuvent être résumées comme suit :

- La glande séricigène, deuxième organe par la taille chez le ver à soie, est un épithélium sécréteur simple composé d'une seule paroi cellulaire. De ce fait, comme pour les cultures cellulaires, nous avons, au niveau de l'organe, l'avantage d'une population d'un type cellulaire unique.

- L'organe est organisé en deux territoires faciles à isoler (voir Fig. 1b), tous deux sont spécialisés dans la production d'un nombre limité de protéines qui n'ont aucune relation physico-chimique.

- Dans chaque partie sécrétrice de l'organe, les cellules sont identiques et croissent de façon synchrone pendant le développement larvaire.

- Le nombre de cellules est fixe du début à la fin de la vie larvaire (Fayard, 1978). La croissance s'effectue par endoploïdie (18 à 19 cycles endo-mitotiques) qui conduit à des cellules sécrétrices géantes ($0,4 \times 0,3 \times 0,3$ mm) (Perdrix-Guillot, 1974).

Préparation des extraits de cellules entières :

Les cellules de la partie postérieure de la glande séricigène (PSG, voir Fig. 1b) sont excisées sur des larves du cinquième âge (au deuxième jour) et traitées suivant la méthode décrite dans "Matériels et méthodes". Cet âge a été choisi sur la base d'essais sur des animaux au cinquième âge plus jeunes ou plus vieux car il correspond au début de l'activité des cellules de la glande séricigène au dernier âge larvaire (voir Fig. 1c). Puisque l'accumulation des ARNm de P25, de la fibroïne et de la sérine 1 est exponentielle au cours de la phase sécrétrice (Couble et coll., 1983), cet âge coïncide avec une période où des facteurs agissant en trans et spécifiques des gènes de la soie, s'ils existent, doivent être présents dans de fortes concentrations dans les cellules de la glande séricigène. En outre, les glandes séricigènes excisées au début de la dernière période sécrétrice nous permettent d'éviter la présence de grandes quantités de fibroïne – la plus grande protéine de la soie (370 kilodaltons) – qui nuit à la préparation des extraits protéiques en raison d'obstacles mécaniques au cours du processus d'homogénéisation.

L'intensité et le moment du broyage, les précipitations au sulfate d'ammonium, les vitesses d'ultracentrifugation et les temps de dialyse ont été optimisés afin de maximaliser la récupération des protéines cellulaires, d'éviter la contamination par l'ADN et la dénaturation des échantillons protéiques. Habituellement, en utilisant le protocole décrit ci-dessus, les extraits protéiques de cellules entières préparés avec des lots de 120 glandes séricigènes nous permettent d'obtenir de 40 à 60 mg de protéines.

Qualité des extraits protéiques préparés à partir de cellules du sécréteur :

Le critère choisi pour évaluer la qualité des extraits protéiques bruts est leur aptitude à transcrire *in vitro* des matrices tronquées de fibroïne et de P25 dans les essais "run off". Comme le montre la figure 3a, nous avons pu, en utilisant une matrice de fibroïne, détecter un transcrit marqué de 546 pb, dimension escomptée pour cette matrice calibrée (voir Fig. 2). Cette bande n'est pas présente lorsque l'essai est effectué en présence d' α -amanitine, inhibiteur spécifique de l'activité de la polymérase II. Ces résultats montrent que la matrice de fibroïne est transcrite de manière efficace et exacte dans les extraits de cellules de sécréteur fraîchement préparés.

La matrice calibrée de P25 (voir Fig. 2) a également été utilisée dans des expériences de transcription "run off" similaires. Les résultats obtenus sont surprenants (voir Fig. 3b). Des produits intenses résultant de l'activité de la polymérase II ont été identifiés mais avec des tailles disproportionnées par rapport à l'ADN calibré utilisé comme matrice (voir Fig. 2), situant le site initiateur de la transcription de P25 approximativement à 130 pb en amont du site cap déterminé précédemment par des expériences de "primer extension" (Couble et coll., 1985). Ce point précis ne sera pas discuté ici, des expériences supplémentaires ont montré que le choix de ces sites d'initiation anormaux est dû à des obstacles conformationnels lorsque sont utilisées des matrices linéaires, à cause de structures secondaires particulières dans la région du promoteur de P25 (Couble et coll., 1985 ; Drevet et Couble, 1990) et probablement aussi à cause des interactions protéines-ADN que nous avons mises en évidence dans cette région (Drevet, 1989 ; Drevet et coll., 1991, soumis). De tels produits de polymérase II artéfactuels, lorsque l'on utilise des ADN linéaires comme matrices, ont déjà été observés.

Les résultats de cette première série d'expériences montrent qu'on peut obtenir une transcription *in vitro* intense et au moins exacte (pour la matrice linéaire de fibroïne) dans les extraits de protéines

brutes des cellules du sécréteur. Ces essais ne nous renseignent pas sur la présence ou l'absence de facteurs spécifiques agissant en "trans" dans nos extraits ; ils fournissent cependant la preuve quant à la qualité des préparations protéiques qui semblent contenir la plupart des facteurs (sinon tous) requis pour les phénomènes transcriptionnels.

Analyse des interactions ADN-protéines dans les extraits bruts de protéines avec le domaine du promoteur de P25 :

Des expériences ont été réalisées afin de vérifier s'il existe une (ou plusieurs) interaction(s) ADN-protéines dans nos extraits protéiques. Dans une première série d'expériences, des extraits protéiques non-fractionnés ont été utilisés comme source de protéines et mis à incuber, suivant la méthode décrite dans "Matériel et Méthodes", avec une sonde qui contient 400 pb de la séquence 5'-flanquante du gène de P25 (de -18 à -424) (sonde P₁, voir Fig. 2). Dans la figure 4, nous présentons les résultats de ces expériences réalisées avec trois extraits protéiques préparés à partir de trois lots différents de vers à soie. Des bandes retardées multiples ont été obtenues. Bien que l'intensité des complexes retardés diffère de l'extrait A à l'extrait C, nous n'avons pas pu détecter de différences qualitatives avec les différents extraits. Ceci témoigne de la reproductibilité de la préparation des extraits protéiques. Néanmoins, le nombre élevé (au moins 6 à 8 complexes), la faible intensité (les bandes retardées représentent au total moins de 3 % de la sonde utilisée dans la réaction) et la migration relative identique de ces complexes nous ont conduits à fractionner l'extrait de cellules entières afin de simplifier l'analyse des expériences de retardement de migration.

Fractionnement de l'extrait protéique acellulaire :

Parmi les différents types de fractionnement réalisés, la chromatographie sur héparine-sépharose a été choisie car elle permet une séparation efficace et rapide des facteurs protéiques se liant au domaine du promoteur du gène de P25.

Habituellement, la distribution des protéines éluées est de 65 % dans la fraction éluee avec 0,1 M KCl, 15 % dans la deuxième fraction (0,4 M KCl) et 3 % dans la dernière (1,0 M KCl). L'analyse SDS-PAGE bi-dimensionnelle du contenu en protéines de chaque fraction a été réalisée afin d'évaluer la partition réalisée (Fig. 5a). Cette analyse révèle :

- la complexité des extraits protéiques issus des cellules du sécréteur en raison des nombreuses espèces protéiques repérées ;
- l'efficacité de la partition réalisée, comme en témoigne le fait que seuls quelques spots protéiques sont communs aux trois fractions.

Comme le montre la figure 5b, les essais de retardement sur gel ont été effectués pour chaque fraction. De plus, afin de réduire davantage la complexité du spectre des bandes retardées, la sonde P₁ (-162 à -18, voir Fig. 2) a été utilisée au lieu de la sonde P₀. Il faut noter que cette nouvelle sonde contient strictement la région à forte homologie entre les domaines des promoteurs de P25 et de la fibroïne (voir Fig. 2) (Couble et coll., 1985). Plusieurs bandes retardées (au moins trois) sont détectées de façon systématique dans la première fraction. Ces bandes correspondent à deux complexes ayant des migrations relatives voisines appelés A et B, ainsi qu'un complexe peu intense ayant une migration plus faible (appelé AB). Des études supplémentaires, effectuées par ailleurs, au moyen d'expériences de compétitions et par empreintes à la DNase I ont montré que les complexes A et B sont indépendants et concernent différentes régions du domaine du promoteur de P25 et que le complexe AB est dû à l'interaction des deux complexes A et B. De plus, des comparaisons avec les interactions ADN-protéines sur l'enhancer de la fibroïne et l'analyse de la distribution cellulaire de ces facteurs dans la glande séricigène ont été entreprises et sont encore en cours d'analyse (Drevet, 1989 ; Drevet et Couble, 1990 ; Drevet et coll., 1991, soumis).

Contrairement aux deux complexes majeurs obtenus dans la fraction 0,1 M KCl, les fractions 0,4 et 1,0 M KCl ne révèlent que très peu de protéines affines de la sonde P₁ de P25. On n'a observé dans certains extraits de la fraction 0,4 M KCl qu'un seul complexe ayant une migration identique au complexe A. Les expériences de "footprinting" ont montré que ce complexe implique la même séquence d'ADN sur la sonde P₁ que celle observée pour le complexe A dans la fraction de 0,1 M KCl (données non présentées). Ce complexe est vraisemblablement dû à un ou des facteur(s) n'ayant pas

été complètement séparé(s), donnant la bande retardée A dans la fraction à 0,1 M KCl au cours de la chromatographie sur héparine-sépharose.

Aucun complexe reproductible ne peut être détecté dans la fraction éluée avec 1,0 M KCl, même lorsque les incubations sont effectuées avec de grandes quantités d'extraits protéiques.

Ainsi, les facteurs protéiques qui interagissent avec les séquences ADN du promoteur de P25 sont présents dans la première fraction chromatographique (0,1 M KCl) en héparine-sépharose de nos extraits acellulaires. Cette partition semble être particulière à notre système puisque la plupart des fractionnements chromatographiques réalisés à ce jour afin d'isoler des protéines interagissantes spécifiquement à l'ADN, à partir d'extraits protéiques acellulaires ou de noyaux ont montré que les protéines affines de l'ADN sont habituellement récupérées dans les fractions salines éluées entre 0,3 et 0,6 M. Pour cette raison, la restriction des protéines interagissant avec l'ADN du promoteur de P25 à la seule fraction 0,1 M KCl présente plusieurs aspects intéressants. En premier lieu, cette fraction contient une concentration faible de protéines d'affinité non spécifique pour l'ADN (par exemple, des protéines basiques telles que les histones) qui sont, dans leur majorité, éluées dans les fractions 0,4 et 1,0 M KCl. En conséquence, nous avons pu réduire de 4 à 6 fois la concentration de compétiteur "ADN non spécifique" utilisé dans les expériences de retardement de migration avec la fraction 0,1 M KCl par rapport à l'extrait brut ou même par rapport aux fractions 0,4 et 1,0 M KCl (pour une quantité égale de protéines utilisées). En second lieu, il semble que la fraction 0,1 M KCl soit exempte d'activité exonucléasique rencontrée dans certains extraits bruts (présenté dans la Fig. 6c, puits 1 à 4). Cette activité entraîne la disparition totale de la sonde après une période d'incubation de 10 minutes à 0 °C. Pour finir, la fraction éluée à faible force ionique ne nécessite pas de dialyse avant d'être utilisée dans les essais de retardement de migration ou dans des fractionnements ultérieurs.

Optimisation des interactions protéines-ADN sur les séquences du promoteur de P25 :

Dans une première expérience, afin d'optimiser les interactions protéines-ADN, (voir Fig. 6a), des concentrations croissantes d'extrait protéique (de 1 à 80 µg) ont été incubées avec une quantité fixe de la sonde P₁. Les résultats de cette première série d'expériences montrent qu'il n'est pas possible, même avec de grandes quantités de protéines, de déplacer la totalité de la sonde vers une forme complexée. Les essais suivants (Fig. 6b), pour lesquels une quantité fixe d'extrait protéique a été incubée avec des concentrations décroissantes de la sonde P₁, confirment ce point : le rapport ADN lié/ADN libre reste inchangé même avec de faibles concentrations de la sonde. Ceci n'est pas dû à la présence d'un excès de protéines non spécifiques qui pourraient faire concurrence pour l'occupation du domaine de liaison, puisque nous avons montré que le rapport ADN lié sur ADN libre n'est pas modifié, même avec de fortes concentrations d'ADN compétiteur non spécifique (voir Fig. 6d, puits 11 à 14). Ceci reflète vraisemblablement un problème d'accessibilité des deux sites dû aux structures secondaires que nous avons mises en évidence dans cette région. En effet, le domaine contenu dans la sonde P₁ couvre des séquences palindromiques dont nous pensons qu'elles peuvent former une structure en boucle stable (Couble et coll., 1985). Nous pouvons faire l'hypothèse que cette structure particulière peut être adoptée spontanément au cours de l'incubation de la sonde avec l'extrait protéique, empêchant partiellement la sonde d'interagir avec le(s) facteur(s) spécifique(s) A et B.

En outre, la différence d'intensité des bandes retardées A et B suggère que les complexes A et B font intervenir différent(s) facteur(s) protéique(s). Ces différences d'intensité des complexes retardés pourrait être en relation avec des différences d'abondance ou/et d'affinité du (des) facteur(s) pour leur séquence cible. De plus, nous avons également noté que l'intensité des bandes retardées change de façon non linéaire lorsque l'on utilise des concentrations croissantes d'extrait protéique, ce qui suggère des interactions coopératives entre les facteurs protéiques donnant les complexes A et B (ceci est illustré dans la Fig. 6, entre les conditions expérimentales de 5 et 10 µg de protéines, puits 4 et 5). Ceci est aussi confirmé par le fait que l'analyse au scanner et l'interprétation statistique (en "Scatchard") des complexes retardés ne nous ont pas permis de découvrir une relation linéaire entre les ADN liés et les ADN non complexés (données non présentées).

Les concentrations des autres composants dans la réaction de retardement de migration (KCl, EDTA, MgCl₂ et d'ADN compétiteurs non spécifiques) ainsi que les paramètres physiques (températures et durée d'incubation) ont été optimisés.

a) Sans ADN compétiteur non spécifique, la sonde saturée de protéines n'entre pas dans le gel (voir Fig. 6c, puits 10). L'addition de 1 µg de poly(dI.dC)-(dI.dC) (équivalent à 1 000 fois la masse d'ADN froid) est nécessaire pour déplacer les protéines de la sonde marquée. Ce type d'ADN synthétique a très peu d'affinité avec les facteurs protéiques que nous avons suivis, aucune compétition n'étant observée sur les bandes retardées même avec des concentrations croissantes (jusqu'à 10 µg/essai) (voir Fig. 6c, puits 12 à 13). Ce n'est pas le cas des ADN-compétiteurs à plus grande complexité (par exemple, l'ADN de sperme de saumon soniqué ou les fragments de restriction de l'ADN plasmidique pBR322) qui concurrencent fortement les complexes protéines-ADN retardés spécifiques lorsqu'ils sont utilisés dans des concentrations identiques (1 à 2 µg/essai) (voir Fig. 6c, puits 8 et 9). Nous avons observé par ailleurs qu'un excédent molaire d'un facteur 10 de la sonde froide I est suffisant pour éliminer complètement les bandes retardées (données non présentées) (Drevet et coll., 1991, soumis), cette compétition efficace des ADN non spécifiques suggère que les séquences cibles de ces facteurs protéiques sont courtes et qu'elles peuvent être statistiquement présentes dans d'autres ADNs.

b) Les complexes sont stables à 4 °C et l'équilibre est atteint dans les cinq premières minutes de l'incubation. L'intensité des bandes retardées diminue quand les réactions sont réalisées à des températures élevées (au-dessus de 5 °C) ou pendant plus de 20 minutes à 4 °C (non présenté). Cette diminution des intensités des bandes retardées est très vraisemblablement due aux activités nucléasiques et/ou aux contaminations par des protéases.

c) Les complexes présentent une sensibilité faible à la présence d'ions divalents Ca^{2+} et Mg^{2+} , puisque la chélation réalisée par addition d'un excédent d'EDTA dans le mélange de réaction (jusqu'à 10 mM de la concentration finale) n'a aucun effet sur les complexes retardés (voir Fig. 6d).

Les conditions optimales, telles qu'elles ont été définies dans "Matériels et Méthodes", nous donnent habituellement un rapport d'ADN lié sur ADN libre compris entre 0,4 et 0,5 avec la fraction héparine-sépharose 0,1 M KCl. Compte tenu du fait que même après un premier fractionnement l'extrait est relativement brut puisque de nombreuses autres protéines sont présentes dans la fraction écoulée (plus de 65 % des protéines cellulaires totales), ces rapports élevés suggèrent que les facteurs mis en évidence par ces dosages sont relativement abondants dans de tels extraits.

d) Pour caractériser davantage les complexes A et B, des traitements protéolytiques et dénaturant par la chaleur ont été effectués sur les complexes individuels obtenus avec les sous-sondes P1a et P1b (issues de la coupure secondaire avec Sac II de la sonde P1 initiale ; Drevet et Couble, soumis). Comme le montre la figure 7a, le traitement à la trypsine ou à la protéinase K de l'extrait avant l'incubation se traduit par la disparition des produits retardés. De plus, les traitements thermiques de l'extrait entraînent une perte rapide de son aptitude à donner des complexes avec les sondes P1a et P1b. Ces expériences confirment la nature protéique des interactions mises en évidence dans le domaine du promoteur de P25. Les clivages protéolytiques partiels (Schreiber et coll., 1988) effectués après l'incubation ont révélé que le complexe B est déplacé vers deux sous-complexes B' et B'' à migration plus faible (voir Fig. 7b). Un tel phénomène après les clivages protéolytiques partiels n'apparaît pas dans le complexe A. Ceci confirme la différence entre le complexe A et le complexe B et suggère que le complexe B pourrait se composer de différents polypeptides ou qu'il est possible de séparer le domaine de liaison (protégé par l'ADN) d'autres régions (domaine activateur, par exemple) de la protéine complexée.

La mise au point d'un système *in vitro* soluble dépendant de l'ADN pour la RNA-polymérase II est depuis longtemps un objectif majeur pour l'étude de la régulation des gènes eucaryotiques. Au cours des dix dernières années, des extraits de cellules entières (par exemple, des extraits de cellules HeLa) ont été utilisés de manière extensive pour transcrire *in vitro* des gènes viraux ainsi que des gènes de mammifères (Weil et coll., 1979 ; Manley et coll., 1980a-b). L'existence d'un tel système soluble a permis l'étude de facteurs régulateurs contrôlant le taux d'initiation d'un grand nombre de gènes. Cependant, l'utilisation de ce type de système hétérologue ne reflète pas vraiment totalement la régulation de l'activité de la polymérase II à l'intérieur d'une cellule eucaryote, plus particulièrement peu d'informations peuvent être obtenues concernant les spécificités temporelles et spatiales d'expression.

Nous présentons ici la préparation et le fractionnement rapide d'un système acellulaire homologue qui peut être utilisé dans les essais de transcription *in vitro* ainsi que dans les expériences

de retardement sur gel. Cet extrait protéique est construit à partir des cellules du sécréteur de la glande séricigène de *Bombyx mori* qui, ainsi que nous l'avons fait remarqué dans cette étude, constitue un système intéressant pour la compréhension des mécanismes de régulation temporelle, spatiale et hormonale des gènes des protéines de la soie. A notre avis, aucun autre système développé à ce jour ne permet une approche aussi complète des mécanismes de régulation des gènes dans les cellules eucaryotes.

L'identification des éléments agissant *en cis* et *en trans* jouant un rôle dans la régulation de l'expression des gènes de la glande séricigène est en cours. La caractérisation des interactions ADN-protéines sur le promoteur du gène de P25 (complexes A et B et complexes en amont) font l'objet d'une étude extensive, de même que les comparaisons des interactions ADN-protéines avec l'enhancer du gène de la fibroïne (Tsuda et coll., 1986 ; Suzuki et Suzuki, 1988) et la région du promoteur du gène de la séricine 1, respectivement, pour expliquer la stricte coordination existant entre les gènes de P25 et de la fibroïne et la restriction de l'expression des gènes de P25/fibroïne et des gènes de séricines dans différentes parties d'un même tissu (Drevet, 1989 ; Drevet et Couble, 1990 ; Drevet et coll., 1991, soumis). En outre, les résultats *in vitro* seront complétés par des expériences *in vivo* sur des vers transgéniques de *Bombyx mori* et également dans un contexte hétérologue à l'aide de drosophiles transgéniques (*Drosophila melanogaster*), puisque nous avons pu démontré au laboratoire que des montages du gène de P25 injectés dans les embryons de *Drosophila* sont exprimés correctement et que l'expression est limitée à la partie antérieure de la glande salivaire de *Drosophila* – équivalent ontogénique de la glande séricigène de *Bombyx mori* (Bello et Couble, 1990).

EFFECT OF GIBBERELLIC ACID ON THE ECONOMIC PARAMETERS OF THE SILKWORM, THE PURE MYSORE BREED OF *BOMBYX MORI* L.

S.B. MAGADUM* & M.A. HOOLI**

Department of Zoology, Karnatak University, Dharwad 570 003, India.

Effect of topical application of the plant growth hormone, gibberellic acid (GA₃) on the pre-cocooning and post-cocooning parameters of the polyvoltine silkworm were studied. The repeated applications with 100 and 300 ng/ml solutions of GA₃ at the 48th hr after ecdysis to IV and V instar larvae increased the silk output by 26.0 and 25.5 per cent and fecundity by 60 and 103 per cent, respectively.

Keywords : Gibberellic acid, cocoon, cocoon shell, fecundity, *B. mori*.

INTRODUCTION

It is reported that injection of the plant growth hormone, gibberellic acid (GA₃) to IV instar nymphs shortened the nymphal period and increased the mortality rate in the grasshoppers, *Locusta migratoria migratoria* and *Schistocera gregaria* (Carlisle *et al.*, 1963), feeding of GA₃ induced sexual maturity in *S. gregaria* (Ellis and Carlisle, 1965), feeding or dietary supplementation of GA₃ increased the larval and pupal periods, emergence percentage and decreased the pupal weight, longevity, fecundity and hatching in the Lepidoptera, *Spodoptera littoralis* (Salama and El-Sharaby, 1972), increased the larval duration, larval weight and decreased the fecundity and hatching in the ball worm, *Heliothis virescens* (Guerra, 1970), and dietary supplementation of higher dosages of GA₃ decreased the fecundity and egg viability and lower dosages increased the longevity and egg viability in the grasshopper, *Aulocara elliotti* (Newmann, 1980, 1982). It has also been reported that feeding of mulberry leaves sprayed with GA₃ or spraying GA₃ on 2nd and 3rd day larvae of IV instar increased the larval and cocoon weights in the silkworm, *Bombyx mori* (Kamada and Ito, 1984). These reports suggest that the treatment with GA₃ either to the host plants or the larvae has varied effects on growth, development and reproduction in different insects. However, the reports on the effect of GA₃ on the silkworm, *B. mori*, are limited only to the larval weight and cocoon weight (Kamada and Ito, 1984). Hence the present investigation reports the effect of GA₃ on various economic parameters of the tropical silkworm, the Pure Mysore breed of *B. mori*.

MATERIALS AND METHODS

The polyvoltine silkworms were reared following the improved method of silkworm rearing (Krishnaswamy, 1978). The worms were maintained on fresh mulberry leaves. Third (III), fourth (IV) and fifth (V) instar larvae were grouped into three different experimental groups. Each group was

* Present address : Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.

** Address for correspondence.

further divided into three sub-groups, each consisting of 20 worms of five replications as shown in Table I.

Table I. Plan of treatment with GA₃ to the silkworm larvae.

Tableau I. Plan du traitement avec du GA₃ des larves de vers à soie.

Groups	Treatment and dose ng/ml	No. of silkworms utilized for the treatment	Time of application after ecdysis	Application in instars			Total quantity of GA ₃ applied
				III	IV	V	
<i>Groupes</i>	<i>Traitement et dose ng/ml</i>	<i>Nombre de vers à soie utilisés pour le traitement</i>	<i>Temps d'application après ecdysis</i>	<i>Application aux âges</i>			<i>Quantité totale de GA₃ appliquée</i>
				III	IV	V	
1	GA ₃ 100	100 (20 × 5)	36th hr	+	+	+	1.2 µg
	200	" "	"	+	+	+	2.4 µg
	300	" "	"	+	+	+	3.6 µg
	Distilled water treated controls	" "	"	+	+	+	
	<i>Témoins traités à l'eau distillée</i>						
2	GA ₃ 100	100 (20 × 5)	48th hr	-	+	+	0.8 µg
	200	" "	"	-	+	+	1.6 µg
	300	" "	"	-	+	+	2.4 µg
	Distilled water treated controls	" "	"	-	+	+	
	<i>Témoins traités à l'eau distillée</i>						
3	GA ₃ 100	100 (20 × 5)	72nd hr	-	-	+	0.4 µg
	200	" "	"	-	-	+	0.8 µg
	300	" "	"	-	-	+	1.2 µg
	Distilled water treated controls	" "	"	-	-	+	
	<i>Témoins traités à l'eau distillée</i>						
4	Untreated controls	" "	-	-	-	-	
	<i>Témoins non traités</i>						

(+) indicates treatment / *Traitement effectué.*

(-) indicates no treatment / *Absence de traitement.*

The known quantity of gibberellic acid, obtained from the commercial firm, M/S. Phylaxia, Budapest, Hungary, was first dissolved in a small quantity of acetone and then diluted to 100, 200 and

300 ng/ml solution in distilled water although it is slightly soluble in water. The dilution was done in distilled water keeping in view of its easy and practical use in sericulture. The topical application was made with a small sterilized cotton ball. Each sub-group in groups 1, 2 and 3 was topically applied with one of the 3 dosages of GA₃ as shown in Table I. In each application a total of 4 ml solution was used to treat 100 worms. Distilled water treated controls were maintained for each experimental group and for all the experimental groups a common untreated control, group 4, was maintained. After the treatment, pre-cocooning and post-cocooning parameters were recorded. The mean values are shown in Tables II, III and IV. Each mean value is the average of 10 worms, 2 from each replication. The experiments were conducted twice to conclude the results.

The data collected were subjected to one-way analysis of variance test to find out the significance between the parameters of the experimental groups and the corresponding parameters of the untreated controls (Raghava Rao, 1983). The per cent values of cocooning and moth emergence percentages, male and female cocoon shell ratio were transformed into sine angular values for statistical analysis. The per cent index was calculated for each parameter of the experimental groups over the corresponding parameter of the untreated controls and the results of the parameters studied are given in Tables II, III and IV.

RESULTS AND DISCUSSION

In the present study distilled water is used as a vehicle for GA₃ application although insect cuticle is known to be hydrophobic. Auxins, the plant hormones of which GA₃ is one, are suggested to act primarily to bring about softening and enlargement of the cell wall which then permits a passive osmotic uptake of water in plant tissues (Leopold, 1964). It is not known whether the plant hormones have a similar softening effect on the larval cuticle of *B. mori*. The results obtained after treatment with GA₃ in the present study suggest that GA₃ might have possibly penetrated the soft untanned larval cuticle of *B. mori*. However, this view needs to be confirmed by further study.

The data on the effect of GA₃ on pre-cocooning and post-cocooning parameters studied are summarised in Tables II, III and IV.

The results of the present study show that the larval duration is significantly decreased in all the larval groups treated with GA₃ when compared with that of the untreated controls, although the feeding of GA₃ is reported to increase the larval duration in the Lepidopterans, *S. litura* (Salama and El-Sharabi, 1972) and *H. virescens* (Guerra, 1970). However, the results of the present study are comparable to those reported in other insects (Carlisle *et al.*, 1963). It is not known whether the larval duration is dose-dependent as in the case of egg viability in *A. ellioti* (Newmann, 1980). The decreased larval duration obtained in the present study might be due to the increased synthesis and release of molting hormone which might have influenced early pupation in *B. mori*, since the plant hormones are reported to alter the rate of molting hormone synthesis in insects (Newmann, 1982).

The larval weight is significantly increased in all the GA₃ treated groups except in group 3, when compared with that of the untreated controls. These results are in agreement with those reported for the Japanese race of *B. mori* (Kamada and Ito, 1984). The increased larval weight might be due to the influence of plant hormones on appetite, nutrition and absorption of the plant material, as suggested by Newmann (1982).

The treatment with GA₃, in general, increased the cocoon weight and cocoon shell weight in both sexes. However, a significant increase in cocoon weight and cocoon shell weight occurred in females in group 1 larvae (Table II) treated with 100 and 300 ng GA₃, in group 2 larvae (Table III) treated with 100 and 200 ng GA₃. The treatment with a single application of GA₃ in V instar (group 3, Table IV) had no significant effect on the cocoon weight and cocoon shell weight in both sexes. The results of the present study therefore suggest that the repeated applications with GA₃ in III, IV and V instars or in IV and V instars, in general, had better effects on the cocoon weight and cocoon shell weight than a single application with GA₃ in V instar. These results are comparable to those reported after treatment with another plant hormone, indole-3-acetic acid in the same race (Magadum and Hooli, 1989).

The increase/decrease in cocoon shell ratio is given in Tables II, III and IV. The fecundity increased significantly in all the GA₃ treated larval groups when compared with that of the untreated

Table II. Group 1. Effect of repeated applications with GA₃ at 36th hr after ecdysis to III, IV and V instar larvae of *B. mori*.Tableau II. Groupe 1. Effet des applications répétées de GA₃ 36 heures après l'ecdysis sur les larves de *B. mori* aux 3e, 4e et 5e âges.

Treatment, dose ng/ml	Total larval duration (hr)	Larval weight (g)	Silk gland weight (g)	Fecundity no.	Cocooning percentage	Moth emergence percentage
<i>Traitement, dose ng/ml</i>	<i>Durée larvaire totale (hr)</i>	<i>Poids larvaire (g)</i>	<i>Poids de la glande séricigène (g)</i>	<i>Fécondité (nbre.)</i>	<i>Pourcentage de filage</i>	<i>Pourcentage d'émergence</i>
GA ₃ 100	646*	1.879*	0.396	347*	90.00* (73.9)** (93)	92.0* (73.9)** (95)
GA ₃ 200	646*	1.801*	0.386	396*	85.0* (68.4)** (88)	90.0* (71.87)** (93)
GA ₃ 300	646*	1.818*	0.362	390*	81.6* (64.2)** (84)	93.0* (75.08)** (96)
Distilled water treated controls <i>Témoins traités à l'eau distillée</i>	656 (100)	1.609 (103)	0.365 (102)	209 (98)	95.0 (77.4)** (98)	96.0 (78.16)** (99)
Untreated controls <i>Témoins non traités</i>	656 (100)	1.564 (100)	0.356 (100)	214 (100)	97.0 (80.9)** (100)	97.0 (80.39)** (100)
SEM ±	1.860	0.043	0.015	9.917	1.428	1.407
CD at 5 %	5.385	0.123	0.042	28.72	4.138	4.075

* Significant increase/decrease at 5 % / *Augmentation/diminution significative à 5 %.*** Angular transformed values / *Transformées angulaires.*SEM : Standard error mean / *Ecart type moyen.*CD : Critical difference / *Intervalle de confiance.*NS : Non significant / *Non significatif.*Per cent increase/decrease in the parameters of GA₃ treated groups over the corresponding parameters of the untreated controls in parentheses.*Le pourcentage d'augmentation/diminution des paramètres chez les groupes traités avec GA₃ par rapport aux paramètres correspondants des témoins non traités est indiqué entre parenthèses.*

Table II. (continued) / *Tableau II. (suite).*

Treatment, dose ng/ml	Cocoon parameters / <i>Paramètres des cocons</i>					
	Female / <i>Femelle</i>			Male / <i>Mâle</i>		
	Cocoon weight (g)	Cocoon shell weight (g)	Cocoon shell ratio (%)	Cocoon weight (g)	Cocoon shell weight (g)	Cocoon shell ratio (%)
<i>Traitement, Dose ng/ml</i>	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Poids de la coque (g)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Poids de la coque (g)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>
GA ₃ 100	0.921* (117)	0.118* (121)	13.05 (20.96)** (105)	0.722 (115)	0.112 (117)	15.56 (23.21)** (105)
GA ₃ 200	0.929* (118)	0.117* (120)	12.57 (20.54)** (101)	0.717 (114)	0.112 (117)	15.66 (23.3)** (106)
GA ₃ 300	0.875* (111)	0.110* (113)	12.67 (20.71)** (102)	0.677 (107)	0.103 (108)	15.24 (22.94)** (103)
Distilled water treated controls <i>Témoins traités à l'eau distillée</i>	0.854 (109)	0.106 (109)	12.31 (20.61)** (99)	0.617 (98)	0.094 (99)	15.25 (22.95)** (103)
Untreated controls <i>Témoins non traités</i>	0.783 (100)	0.097 (100)	12.38 (20.55)** (100)	0.628 (100)	0.095 (100)	14.78 (22.53)** (100)
SEM ±	0.028	0.004	NS	NS	NS	NS
CD at 5 %	0.082	0.012				

* Significant increase/decrease at 5 % / *Augmentation/diminution significative à 5 %.*** Angular transformed values / *Transformées angulaires.*SEM : Standard error mean / *Ecart type moyen.*CD : Critical difference / *Intervalle de confiance.*NS : Non significant / *Non significatif.*Per cent increase/decrease in the parameters of GA₃ treated groups over the corresponding parameters of the untreated controls in parentheses.*Le pourcentage d'augmentation/diminution des paramètres chez les groupes traités avec GA₃ par rapport aux paramètres correspondants des témoins non traités est indiqué entre parenthèses.*

Table III. Group 2. Effect of repeated applications with GA₃ at 48th hr after ecdysis to IV and V instar larvae of *B. mori*.

Tableau III. Groupe 2. Effet des applications répétées de GA₃ 48 heures après l'ecdysis sur des larves de *B. mori* aux 4^e et 5^e âges.

Treatment, dose ng/ml	Total larval duration (hr)	Larval weight (g)	Silk gland weight (g)	Fecundity no.	Cocooning percentage	Moth emergence percentage
<i>Traitement, dose ng/ml</i>	<i>Durée larvaire totale (hr)</i>	<i>Poids larvaire (g)</i>	<i>Poids de la glande séricigène (g)</i>	<i>Fécondité (nbre.)</i>	<i>Pourcentage de filage</i>	<i>Pourcentage d'émergence</i>
GA ₃ 100	622*	1.720*	0.362	344*	95.0* (77.52)*	85.0* (67.76)**
	(95)	(109)	(101)	(160)	(98)	(87)
GA ₃ 200	622*	1.822*	0.400*	354*	90.6* (72.21)**	88.0* (69.89)**
	(95)	(116)	(112)	(164)	(93)	(90)
GA ₃ 300	622*	1.811*	0.436*	437*	91.0* (72.67)**	89.9* (71.62)**
	(95)	(115)	(122)	(203)	(94)	(93)
Distilled water treated controls <i>Témoins traités à l'eau distillée</i>	656	1.609	0.365	209	95.0 (77.44)**	96.0 (78.16)**
	(100)	(103)	(102)	(97)	(98)	(99)
Untreated controls <i>Témoins non traités</i>	656	1.564	0.356	215	97.0 (80.92)**	97.0 (80.39)**
	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)
SEM ±	2.413	0.041	0.014	18.83	1.142	1.841
CD at 5 %	6.99	0.119	0.042	54.54	3.308	5.331

* Significant increase/decrease at 5 % / *Augmentation/diminution significative à 5 %.*

** Angular transformed values / *Transformées angulaires.*

SEM : Standard error mean / *Ecart type moyen.*

CD : Critical difference / *Intervalle de confiance.*

Per cent increase/decrease in the parameters of GA₃ treated groups over the corresponding parameters of the untreated controls in parentheses.

Le pourcentage d'augmentation/diminution des paramètres chez les groupes traités avec GA₃ par rapport aux paramètres correspondants des témoins non traités est indiqué entre parenthèses.

Table III. (continued) / *Tableau III. (suite).*

Treatment, dose ng/ml	Cocoon parameters / <i>Paramètres des cocons</i>					
	Female / <i>Femelle</i>			Male / <i>Mâle</i>		
	Cocoon weight (g)	Cocoon shell weight (g)	Cocoon shell ratio (%)	Cocoon weight (g)	Cocoon shell weight (g)	Cocoon shell ratio (%)
<i>Traitement, Dose ng/ml</i>	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Poids de la coque (g)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Poids de la coque (g)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>
GA ₃ 100	0.906*	0.123*	13.51* (21.55)**	0.728*	0.119*	16.44* (23.89)**
	(115)	(127)	(109)	(115)	(125)	(111)
GA ₃ 200	0.862	0.115*	13.36* (21.41)**	0.713*	0.118*	16.55* (23.98)**
	(110)	(118)	(108)	(113)	(124)	(112)
GA ₃ 300	0.935*	0.124*	13.29* (21.36)**	0.706	0.118*	16.64* (24.05)**
	(119)	(127)	(107)	(112)	(124)	(113)
Distilled water treated controls <i>Témoins traités à l'eau distillée</i>	0.854	0.106	12.31 (20.61)**	0.617	0.094	15.25 (22.95)**
	(109)	(109)	(99)	(99)	(99)	(103)
Untreated controls <i>Témoins non traités</i>	0.783	0.097	12.38 (20.55)**	0.628	0.095	14.78 (22.53)**
	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)
SEM ±	0.029	0.004	0.236	0.028	0.005	0.364
CD at 5 %	0.83	0.011	0.684	0.081	0.014	1.055

* Significant increase/decrease at 5 % / *Augmentation/diminution significative à 5 %.*** Angular transformed values / *Transformées angulaires.*SEM : Standard error mean / *Ecart type moyen.*CD : Critical difference / *Intervalle de confiance.*NS : Non significant / *Non significatif.*Per cent increase/decrease in the parameters of GA₃ treated groups over the corresponding parameters of the untreated controls in parentheses.*Le pourcentage d'augmentation/diminution des paramètres chez les groupes traités au GA₃ par rapport aux paramètres correspondants des témoins non traités est indiqué entre parenthèses.*

Table IV. Group 3. Effect of a single application with GA₃ at 72nd hr after ecdysis to V instar larvae of *B. mori*.

Tableau IV. Groupe 3. Effet d'une seule application de GA₃ 36 heures après l'ecdysis sur les larves de B. mori au 5e âge.

Treatment, dose ng/ml	Total larval duration (hr) in V instar	Larval weight (g)	Silk gland weight (g)	Fecundity no.	Cocooning percentage	Moth emergence percentage
<i>Traitement, dose ng/ml</i>	<i>Durée larvaire totale (hr) au 5e âge</i>	<i>Poids larvaire (g)</i>	<i>Poids de la glande séricigène (g)</i>	<i>Fécondité (nbre.)</i>	<i>Pourcentage de filage</i>	<i>Pourcentage d'émergence</i>
GA ₃ 100	192*	1.623	0.400	324*	82.5* (65.35)**	91.0* (72.82)**
	(82)	(103)	(112)	(162)	(85)	(94)
GA ₃ 200	192*	1.608	0.399	355*	84.4* (67.24)**	92.0* (73.90)**
	(82)	(102)	(112)	(177)	(87)	(95)
GA ₃ 300	192*	1.548	0.413	331*	83.3* (66.0)**	93.0* (75.08)**
	(82)	(99)	(116)	(165)	(86)	(96)
Distilled water treated controls <i>Témoins traités à l'eau distillée</i>	234	1.609	0.365	208	95.0 (77.44)**	96.0 (77.96)**
	(100)	(103)	(102)	(104)	(98)	(99)
Untreated controls <i>Témoins non traités</i>	234	1.564	0.356	200	97.0 (80.92)**	97.0 (80.39)**
	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)
SEM ±	1.825	0.043	0.020	15.811	2.275	0.998
CD at 5 %	5.285	0.124	0.058	45.79	6.585	2.891

* Significant increase/decrease at 5 % / *Augmentation/diminution significative à 5 %.*

** Angular transformed values / *Transformées angulaires.*

SEM : Standard error mean / *Ecart type moyen.*

CD : Critical difference / *Intervalle de confiance.*

NS : Non significant / *Non significatif.*

Per cent increase/decrease in the parameters of GA₃ treated groups over the corresponding parameters of the untreated controls in parentheses.

Le pourcentage d'augmentation/diminution des paramètres chez les groupes traités avec GA₃ par rapport aux paramètres correspondants des témoins non traités est indiqué entre parenthèses.

Table IV. (continued) / *Tableau IV. (suite).*

Treatment, dose ng/ml	Cocoon parameters / <i>Paramètres des cocons</i>					
	Female / <i>Femelle</i>			Male / <i>Mâle</i>		
	Cocoon weight (g)	Cocoon shell weight (g)	Cocoon shell ratio (%)	Cocoon weight (g)	Cocoon shell weight (g)	Cocoon shell ratio (%)
<i>Traitement, Dose ng/ml</i>	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Poids de la coque (g)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Poids de la coque (g)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>
GA ₃ 100	0.821 (104)	0.109 (112)	13.25 (21.31)** (107)	0.648 (100)	0.101 (106)	15.52 (23.15)** (105)
GA ₃ 200	0.809 (103)	0.108 (111)	13.33 (21.38)** (107)	0.635 (98)	0.101 (106)	15.84 (23.59)** (107)
GA ₃ 300	0.801 (102)	0.104 (107)	13.01 (21.04)** (105)	0.590 (91)	0.095 (100)	16.03 (23.55)** (108)
Distilled water treated controls <i>Témoins traités à l'eau distillée</i>	0.854 (109)	0.104 (107)	12.31 (21.61)** (99)	0.617 (95)	0.094 (99)	15.25 (22.95)** (103)
Untreated controls <i>Témoins non traités</i>	0.783 (100)	0.097 (100)	12.38 (20.55)** (100)	0.648 (100)	0.095 (100)	14.78 (22.53)** (100)
SEM ± CD at 5 %	NS	NS	NS	NS	NS	NS

* Significant increase/decrease at 5 % / *Augmentation/diminution significative à 5 %.*** Angular transformed values / *Transformées angulaires.*SEM : Standard error mean / *Ecart type moyen.*CD : Critical difference / *Intervalle de confiance.*NS : Non significant / *Non significatif.*Per cent increase/decrease in the parameters of GA₃ treated groups over the corresponding parameters of the untreated controls in parentheses.*Le pourcentage d'augmentation/diminution des paramètres chez les groupes traités avec GA₃ par rapport aux paramètres correspondants des témoins non traités est indiqué entre parenthèses.*

controls. However, a maximum increase in fecundity (103 %) occurred in group 2 larvae (Table III) treated with 300 ng GA₃. The results therefore suggest that the fecundity could be increased by more than 100 per cent with the treatment of 300 ng GA₃.

The cocooning and moth emergence percentages significantly decreased in all the GA₃ treated larval groups when compared with that of the untreated controls. These results suggest that the mortality rate of larvae and pupae increased after treatment with GA₃. Similar results are reported after treatment with indole-3-acetic acid in the same race of *B. mori* (Magadum and Hooli, 1989).

There was no significant difference in the parameters of the distilled water treated controls when compared with the corresponding parameters of the untreated controls.

The results of the present study suggest that the repeated applications with 100 and 300 ng GA₃ at the 48th hr after ecdysis to IV and V instar larvae increased the silk output by 26 and 25.5 per cent (average of both sexes) and fecundity by 60 and 103 per cent, respectively. Even after taking into consideration the decreased cocooning percentage, the increase in silk output was 23 per cent in 200 ng GA₃ treated larvae and 18 per cent in 300 ng GA₃ treated larvae. Therefore it is suggested that the repeated applications with GA₃ at the above dose level and time in IV and V instars may be utilized to increase the silk yield and fecundity in the Pure Mysore breed of *B. mori*.

ACKNOWLEDGEMENTS

The first author (S.B.M.) is grateful to the Member Secretary, Central Silk Board, Government of India, Bangalore, for granting study leave. Our thanks are also due to Prof. V.B. Nadkarni, Department of Zoology, Karnatak University, Dharwad, for his encouragement and to Dr R. Govindan, University of Agricultural Sciences, Dharwad, for providing facilities.

REFERENCES

- CARLISLE D.B., OSBORNE D.J., ELLIS P.E., MOORHOUSE J.E. (1963), Reciprocal effects of insect and plant growth substances. *Nature*, 200, 1230.
- ELLIS P.E., CARLISLE D.B. (1965), Desert locusts : sexual maturation delayed by feeding on senescent vegetation. *Science*, 149, 546-547.
- GUERRA A.A. (1970), Effect of biologically active substances in the diet on development and reproduction of *Heliothis* spp. *J. Econ. Entomol.*, 63, 1518-1521.
- KAMADA M., ITO S. (1984), Growth promoting effect of plant hormones on silkworms. *J. Agri. Chem. Soc. Jpn.*, 58, 779-784.
- KRISHNASWAMY S. (1978), New technology of silkworm rearing. *Bulletin CSRTI Mysore*, 2, 1-24.
- LEOPOLD A.C. (1964), Plant hormones. *In* The hormones (G. Pincus, Ed.). Academic Press, New York, IV, 1-51.
- MAGADUM S.B., HOOLI M.A. (1989), Effect of indole-3-acetic acid on the polyvoltine silkworm, the Pure Mysore breed of *Bombyx mori* L. *Sericologia*, 29(4), 507-517.
- NEWMANN S.V. (1980), Regulation of grasshopper fecundity, longevity and egg viability by plant growth hormones. *Experientia*, 36, 130-131.
- NEWMANN S.V. (1982), Plant growth hormones affect grasshopper growth and reproduction. *Proceed. 5th International Symp. on Insect Plant Relationships*. (J.H. Visser and A.K. Miller, Eds.) Pudoc. Wageningen, Netherlands, 57-62.
- RAGHAVARAO D. (1983), Statistical techniques in agriculture and biological research. Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi.
- SALAMA H.S., EL-SHARABY A.H. (1972), Gibberellic acid and 3-sistosterol as sterilant of the cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* Boisduval. *Experientia*, 28, 413-414.

EFFET DE L'ACIDE GIBBERELLIQUE SUR LES PARAMETRES ECONOMIQUES DE LA SOUCHE PURE MYSORE DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L.

S.B. MAGADUM & M.A. HOOLI

Department of Zoology, Karnatak University, Dharwad 570 003, Inde.

On a étudié l'effet de l'application topique d'acide gibberellique (GA₃), hormone de croissance végétale, sur les paramètres pré et post-cocons du ver à soie polyvoltin. Des applications répétées de solutions de 100 et 300 ng/ml de GA₃ 48 heures après l'ecdysis au quatrième et au cinquième âges larvaires permettent d'augmenter respectivement le rendement en soie de 26.0 et 25.5 % et la fécondité de 60 et 103 %.

INTRODUCTION

Il a été observé que l'injection d'acide gibberellique (GA₃), hormone de croissance végétale, sur les larves du quatrième âge réduisait la période larvaire et augmentait le taux de mortalité des sauterelles *Locusta migratoria migratoria* et *Schistocera gregaria* (Carlisle et coll., 1963), que le nourrissage avec le GA₃ induisait la maturité sexuelle chez *S. gregaria* (Ellis et Carlisle, 1965), que le nourrissage ou un complément de nourrissage avec du GA₃ augmentaient les durées larvaires et pupales, le pourcentage d'éclosion et diminuaient le poids de la chrysalide, la longévité, la fécondité et le pourcentage d'éclosion chez le lépidoptère *Spodoptera littoralis* (Salama et El-Sharaby, 1972), augmentaient la durée larvaire et le poids larvaire et diminuaient la fécondité et l'éclosion chez *Heliothis virescens* (Guerra, 1970) et qu'à fortes doses le GA₃ augmentait la fécondité et la viabilité des oeufs, tandis qu'à faibles doses le GA₃ augmentait la longévité et la viabilité des oeufs de la sauterelle *Aulocara ellioti* (Newmann, 1980, 1982). On a également observé que le nourrissage avec des feuilles de mûriers sur lesquelles du GA₃ avait été préalablement vaporisé, ou que la vaporisation de GA₃ sur des larves aux deuxième et troisième jours du 4^e âge larvaire, augmentait le poids larvaire et le poids du cocon chez le ver à soie *Bombyx mori* (Kamada et Ito, 1984). Ces observations suggèrent que le traitement au GA₃ sur la plante nourricière ou sur la larve a des effets différents sur la croissance, le développement et la reproduction suivant les insectes. Cependant, les observations sur l'effet du GA₃ chez le ver à soie *Bombyx mori* se limitent à la durée larvaire et au poids du cocon (Kamada et Ito, 1984). Cette étude présente donc l'effet du GA₃ sur divers paramètres économiques de la souche tropicale Pure Mysore du ver à soie *Bombyx mori*.

MATERIELS ET METHODES

Les vers à soie polyvoltins ont été élevés suivant la méthode améliorée d'élevage des vers à soie (Krishnaswamy, 1978). Les larves sont nourries sur des feuilles fraîches. Les larves des troisième (III), quatrième (IV) et cinquième (V) âges sont réparties en trois groupes expérimentaux. Chaque groupe est ensuite divisé en trois sous-groupes composés de 5 réplicats de 20 larves chacun, comme le montre le tableau I.

Une quantité déterminée d'acide gibberellique, acheté chez la société commerciale M/S Phylaxia (Budapest, Hongrie), est d'abord dissoute dans une petite quantité d'acétone puis diluée dans des solutions de 100, 200 et 300 ng/ml dans de l'eau distillée bien qu'il soit peu soluble dans l'eau. La

dilution est faite dans l'eau distillée en raison de son caractère pratique et de sa facilité d'utilisation en sériciculture. L'application topique est pratiquée avec une petite boule de coton stérilisée. On applique l'une des trois doses de GA₃ à chaque sous-groupe des groupes 1, 2 et 3, comme le montre le tableau I. Pour chaque application, on utilise une solution totale de 4 ml pour 100 vers. A chaque groupe expérimental correspond un groupe de témoins traités à l'eau distillée et à l'ensemble des groupes expérimentaux correspond un groupe témoin non traité commun, le groupe 4. Après le traitement, on relève les paramètres pré et post-cocons. Les valeurs moyennes sont présentées dans les tableaux II, III et IV. Chaque valeur moyenne est la moyenne de 10 larves, 2 de chaque réplicat. Les expériences sont réalisées deux fois avant la conclusion des résultats.

Les données collectées sont soumises au test de l'analyse de variance unidimensionnelle pour évaluer la signification des écarts entre les paramètres des groupes traités et ceux des témoins non traités (Raghava Rao, 1983). Les valeurs des pourcentages de filage et d'émergence des papillons, de richesse soyeuse des mâles et des femelles sont transformées en valeurs angulaires pour l'analyse statistique. L'indice de pourcentage est calculé pour chaque paramètre des groupes traités par rapport aux témoins non traités ; les résultats des paramètres étudiés sont donnés dans les tableaux II, III et IV.

RESULTATS ET DISCUSSION

Dans cette étude, l'eau distillée est utilisée comme vecteur d'application du GA₃ bien que la cuticule de l'insecte soit hydrophobe. On a suggéré que les auxines, groupe d'hormones végétales auquel appartient le GA₃, servaient principalement à provoquer l'assouplissement et l'agrandissement de la paroi cellulaire, permettant de ce fait une absorption osmotique et passive de l'eau dans les tissus végétaux (Leopold, 1964). On ne sait pas si les hormones végétales ont un effet d'assouplissement similaire sur la cuticule larvaire de *B. mori*. Les résultats obtenus dans cette étude après traitement au GA₃ suggèrent que le GA₃ pourrait avoir pénétré la cuticule larvaire souple et non tannée de *B. mori*. Cependant, il est nécessaire de confirmer cette hypothèse par d'autres études.

Les données concernant l'effet du GA₃ sur les paramètres pré et post-cocons étudiés sont résumées dans les tableaux II, III et IV.

Les résultats de cette étude montrent que la durée larvaire diminue de manière significative chez tous les groupes traités au GA₃ par rapport aux témoins non traités, bien qu'il ait été observé que le nourrissage avec du GA₃ augmentait la durée larvaire des lépidoptères *S. litura* (Salama et El-Sharabi, 1972) et *H. virescens* (Guerra, 1970). Cependant, les résultats obtenus ici sont comparables aux résultats observés chez d'autres insectes (Carlisle et coll., 1963). On ignore si la durée larvaire est dose-dépendante, comme c'est le cas chez *A. ellioti* pour la viabilité des oeufs (Newmann, 1980). La diminution de la durée larvaire obtenue ici pourrait être due à la synthèse et à la libération accrues de l'hormone de mue qui pourrait avoir influencé la pupation précoce chez *B. mori*, puisqu'il a été observé que les hormones végétales modifiaient le taux de synthèse de l'hormone de mue chez les insectes (Newmann, 1982).

Le poids larvaire diminue de manière significative chez tous les groupes traités au GA₃, sauf chez le groupe 3, par rapport aux témoins non traités. Ces résultats corroborent les résultats observés chez la race japonaise de *B. mori* (Kamada et Ito, 1984). L'augmentation du poids larvaire pourrait être due à l'influence des hormones végétales sur l'appétit, la nutrition et l'absorption du matériel végétal, comme l'a suggéré Newmann (1982).

En général, le traitement au GA₃ permet d'augmenter le poids du cocon et le poids de la coque chez les deux sexes. Cependant, on observe une augmentation significative du poids du cocon et du poids de la coque chez les femelles du groupe 1 (Tableau II) traitées avec 100 et 300 ng de GA₃ et chez les femelles du groupe 2 (Tableau III) traitées avec 100 et 200 ng de GA₃. Le traitement en une seule application de GA₃ au cinquième âge (groupe 3, Tableau IV) n'a d'effet significatif sur le poids du cocon et le poids de la coque chez aucun des deux sexes. Les résultats présentés ici suggèrent donc que des applications répétées de GA₃ aux troisième, quatrième et cinquième âges larvaires ou aux quatrième et cinquième âge ont en général de meilleurs effets sur le poids du cocon et le poids de la coque qu'une seule application de GA₃ au cinquième âge. Ces résultats sont similaires aux résultats obtenus après traitement avec une autre hormone végétale, l'acide 3-indol-acétique, chez la même race (Magadum et Hooli, 1989).

L'augmentation et/ou la diminution de la richesse soyeuse sont présentés dans les tableaux II, III et IV. La fécondité diminue de manière significative chez tous les groupes traités au GA₃ par rapport aux témoins non traités. Cependant, une augmentation maximale de la fécondité (103 %) apparaît chez les larves du groupe 2 (Tableau III) traitées avec 300 ng de GA₃. Ces résultats suggèrent donc que l'on pourrait augmenter la fécondité de plus de 100 % par traitement avec 300 ng de GA₃.

Les pourcentages de filage et d'émergence diminuent de manière significative chez tous les groupes traités au GA₃ par rapport aux témoins non traités. Ces résultats suggèrent que le taux de mortalité des larves et des chrysalides augmente après traitement au GA₃. Des résultats similaires ont été observés après traitement à l'acide 3-indol-acétique chez la même race de *B. mori* (Magadum et Hooli, 1989).

Il n'y a pas de différence significative entre les paramètres des témoins traités à l'eau distillée et les paramètres correspondant des témoins non traités.

Les résultats présentés ici suggèrent que des applications répétées de 100 et 300 ng de GA₃ 48 heures après l'ecdysis aux larves du 4^e et du 5^e âge permettent d'augmenter respectivement le rendement en soie de 26 et 25.5. % (moyennes des deux sexes) et la fécondité de 60 et 103 %. Même en tenant compte de la réduction du pourcentage de filage, l'augmentation du rendement en soie est de 23 % chez les larves traitées avec 200 ng de GA₃ et de 18 % chez les larves traitées avec 300 ng de GA₃. Il est donc suggéré que des applications répétées de GA₃ aux doses et moments mentionnés ci-dessus aux larves du 4^e et du 5^e âge peuvent être utilisées pour augmenter le rendement en soie chez la souche Pure Mysore de *Bombyx mori*.

A FEW OBSERVATIONS ON THE HOST-PARASITE INTERACTION BETWEEN THE UZIFLY, *EXORISTA SORBILLANS* (WIEDEMANN) (DIPTERA : TACHINIDAE) AND ITS HOST, *BOMBYX MORI* L. (LEPIDOPTERA : BOMBYCIDAE)

R. GOVINDARAJU* & B. SARATCHANDRA**

* Central Sericultural Research and Training Institute, Research Extension Centre, 88-B, Main Road, Denkanikota - 635 102, Dharmapuri District, Tamil Nadu, India.

** Regional Sericultural Research Station, Kodathi, Carmelaram PO, Bangalore - 560 035, India.

The development of the uzifly, Exorista sorbillans, in relation to the larval instar of its host, B. mori, at which it was infested and its body weight at the time of uzi maggot emergence, was studied. The maggot duration of E. sorbillans was significantly reduced (above 1 %) when they infested later instars of B. mori larvae compared to those which infested earlier instars. A high positive correlation was observed between the weight of the silkworm and the weight of the uzi maggot as on the day of uzi maggot emergence which was reflected in the later stages of E. sorbillans till fly emergence. The correlation between the maggot weight and pupation rate, pupal weight and emergence percentage was also positive and high.

Keywords : uzifly, *Exorista sorbillans*, silkworm, *Bombyx mori*, maggot, larva, pupa, pupation rate, fly emergence.

INTRODUCTION

The uzifly, *Exorista sorbillans* (Wiedemann), being a serious pest of the silkworm, *Bombyx mori* L., has attracted considerable attention of the sericulturists. Darwin pointed out that not only competition, but also co-operation in nature is important in natural selection (Odum, 1975), which indicates that a close relation exists between the parasite and its host. For an effective control of any parasite, or to protect the host from the parasite, it is obligatory to study the host-parasite interaction. Krishnaswamy *et al.* (1964), Prasad *et al.* (1985), Kumar *et al.* (1986), Oshiki and Nakazawa (1987) and Srikanth *et al.* (1988) have already made some studies on the host-parasite interaction between *B. mori* and *E. sorbillans*. A few more observations made on the relation between the larval instar of *B. mori* at which infestation occurred and the growth and development of *E. sorbillans* infesting the larva are presented in the following account.

MATERIAL AND METHODS

Uzi maggots were collected from the seed cocoon market at Denkanikota of Dharmapuri District (Tamil Nadu, India) and were kept in glass jars containing a little sand at the bottom. The mouth of the jar was covered with a muslin cloth and the maggots were allowed to pupate in the jar. The pupae on the 10th day were transferred to nylon netted cages for emergence of the flies.

Table I. Development of uzi maggots infesting different instars of silkworms.

Tableau I. Développement des asticots uzi infestant le ver à soie à différents âges larvaires.

Silkworm race/ hybrid	Instar of silkworm at infestation	Duration of uzi maggot (hrs)	Weight of 10 uzi infested silkworms at the time of uzi maggot emergence (g)	Weight of 10 uzi maggots at the time of emergence from their host (g)	Pupation rate of uzi maggots (%)	Weight of 10 uzi pupae (g)	Adult fly emergence (%)
<i>Race de ver à soie ou hybride</i>	<i>Age larvaire du ver à soie au moment de l'infestation</i>	<i>Durée larvaire uzi (hr)</i>	<i>Poids de 10 vers à soie infestés par la mouche uzi à émergence des asticots uzi (g)</i>	<i>Poids de 10 asticots uzi au moment de l'émergence de leur hôte (g)</i>	<i>Taux de pupaison des asticots uzi (%)</i>	<i>Poids de 10 pupes uzi (g)</i>	<i>Emergence des mouches uzi (%)</i>
Pure Mysore	III	200.4	4.63	0.89	73.3	0.80	82.8
	IV	198.7	9.47	1.06	84.2	0.96	92.0
	V	175.9	20.53	1.27	95.9	1.14	94.4
Pure Mysore × NB ₄ D ₂	III	183.77	5.76	1.04	82.3	0.95	87.6
	IV	171.6	12.77	1.22	85.5	1.10	93.2
	V	161.5	32.55	1.47	96.1	1.33	96.4
NB ₄ D ₂	III	175.9	5.62	1.19	84.0	1.08	93.7
	IV	167.4	13.41	1.39	86.7	1.28	94.0
	V	163.4	35.63	1.50	96.8	1.43	97.2

The flies were fed with a 10 % glucose solution through cotton soaked in the solution. They were allowed to mate and on the fourth day after mating, silkworms which just entered 3rd, 4th and 5th instars were kept in the cages separately and the uzi flies were allowed to lay eggs on them. The silkworms were then taken out, examined under a magnifying lens and only one egg was allowed to remain on the body of each silkworm while the rest were removed using a fine brush. On the third day after egg laying, the infested worms were separated on the basis of black scars left by the uzi maggots penetrating into the body of the silkworm. Such infested silkworms were reared separately instarwise and racewise as per the standard rearing techniques using mulberry leaves of Kanva-2 variety. Silkworms of Pure Mysore, Pure Mysore $\times$ NB4D2 and NB4D2 races were taken for this study and the rearing was conducted in three replications, each with 50 worms. Three trials were conducted from October to December 1988, when the temperature ranged between 19-26 °C and the relative humidity from 65-85 % inside the rearing house. The data on the uzi maggot duration, weight of uzi infested worms on the day of emergence of uzi maggots, weight of uzi maggots, weight of uzi pupae, pupation rate of uzi maggots, adult fly emergence etc., were recorded and presented in Table I. The data were statistically analysed and presented in Tables II, III and IV.

RESULTS AND DISCUSSION

The available data indicate that there is a direct relation between the development of the parasite, *E. sorbillans*, and the larval instar of its host, *B. mori*, at which it was infested. The maggot period of *E. sorbillans* prolonged significantly (above 1 % level) when it infested the early instars of silkworms, compared to those which infested later instars. This was explained by Oshiki and Nakazawa (1987) who stated that the growth and development of *E. sorbillans* were synchronised with the metamorphosis of *B. mori* and that the endocrine system of the parasite might be inhibited due to the presence of a high level of juvenile hormone during the early instar of the host. Silkworms infested at the fifth instar were larger in size and heavier when compared to those infested during earlier instars as weighed on the day of emergence of uzi maggots from the silkworms. Uzi maggots obtained from silkworms of larger size were also larger and showed better pupation and higher pupal weight thereby resulting in a better adult fly emergence. A high positive correlation was observed between the weight of the infested silkworm and the weight of uzi maggots; the weight of the uzi maggots and their pupation rate (%); the weight of uzi pupae and their emergence percentage etc. Similar results were obtained with all the silkworm races used in this study. These results strengthen the idea of Thangavelu *et al.* (1985) who opined that the uzi fly prefers to lay eggs on larger worms due to better food availability. Patil and Govindan (1984) also reported that the development of *E. sorbillans* maggots and its duration in the eri silkworm relied on the food availability depending on the larval instar and the density of maggots per individual host larva. Similarly, Kumar *et al.* (1986) recorded a significant decrease in the length of maggot development period, maggot recovery percentage, pupal weight, pupal size, emergence percentage and fecundity in *E. sorbillans* as the host becomes more heavily parasitised, which also indicates the development of the parasite in terms of food material. Prasad *et al.* (1985) also made a similar study but it was in terms of host mortality which was 100 % when the infestation was in the first two instars of the silkworm. Krishnaswamy *et al.* (1964) and Srikanth *et al.* (1988) reported a reduction in cocoon yield and yield parameters. The latter have also reported that unparasitized silkworms of late fifth instar ate more food than the parasitized silkworms and that the parasitized silkworms in the last two days of their larval stage showed increased digestibility. The authors have also stated that the increased digestibility was to overcome the nutritional stress due to parasitization. Chapman (1971) also reported that a parasitic insect avoids excessive oviposition on its host to avoid competition between its offsprings. But Sriharan *et al.* (1971) felt that the uzi fly prefers older silkworms due to their sluggishness which allows them to comfortably lay eggs.

The larva of *E. sorbillans* being an obligatory parasite, requiring a host to complete its life-cycle, the parasite desires that the host should survive until the completion of its parasitic stage. The earlier literature also indicates that uzi fly infestation in the early instars of silkworms as well as heavy parasitisation result in the death of the host following the mortality of the parasite. Infestation to late age silkworms ensured a better maggot development which has ultimately resulted in better uzi fly emergence. Thus, the present observations explain the preference of uzi fly to lay eggs only on late

Table II. Statistical analysis showing the correlation between the weights of uzi maggots and infested silkworms.

Tableau II. Analyse statistique montrant la corrélation entre le poids des asticots uzi et le poids des vers à soie infestés.

Silkworm race/ hybrid	Instar of silkworm	Weight of 10 uzi maggots (g) x	Weight of 10 uzi infested silkworms (g) y	Correlation coefficient r	SD σx	SD σy	Regression equation (score form)	Standard error of estimate
<i>Race de ver à soie ou hybride</i>	<i>Age larvaire du ver à soie</i>	<i>Poids de 10 asticots uzi (g) x</i>	<i>Poids de 10 vers à soie infestés par uzi (g) y</i>	<i>Coefficient de corrélation r</i>	<i>Ecart type σx</i>	<i>Ecart type σy</i>	<i>Equation de régression (formulation)</i>	<i>Ecart type de l'estimation</i>
Pure Mysore	III	0.89	4.63	0.44	0.06976	0.21500	$\bar{x}=0.1428 y + 0.2288$ $\bar{y}=1.3561 x + 3.4231$	$\sigma \text{ est } x=0.06264$ $\sigma \text{ est } y=0.19307$
	IV	1.06	9.47	0.66	0.04203	0.06952	$\bar{x}=0.3990 y - 2.7185$ $\bar{y}=1.09168 x + 8.3128$	$\sigma \text{ est } x=0.03158$ $\sigma \text{ est } y=0.05223$
	V	1.27	20.53	0.84	0.04726	0.88070	$\bar{x}=0.04508 y + 0.3445$ $\bar{y}=15.6536 x + 0.6499$	$\sigma \text{ est } x=0.02564$ $\sigma \text{ est } y=0.4779$
Pure Mysore $\times$ NB ₄ D ₂	III	1.04	5.76	0.79	0.02160	0.36810	$\bar{x}=0.04636 y + 0.773$ $\bar{y}=13.4629 x - 8.2414$	$\sigma \text{ est } x=0.01324$ $\sigma \text{ est } y=0.2257$
	IV	1.22	12.77	1.00	0.01414	0.33000	$\bar{x}=0.001837 y + 1.1965$ $\bar{y}=544.5 x - 651.52$	$\sigma \text{ est } x=0$ $\sigma \text{ est } y=0$
	V	1.47	32.55	0.59	0.02887	0.41520	$\bar{x}=0.04102 y + 0.1348$ $\bar{y}=8.4852 x + 20.0767$	$\sigma \text{ est } x=0.02331$ $\sigma \text{ est } y=0.3352$
NB ₄ D ₂	III	1.19	5.62	0.84	0.03109	0.35330	$\bar{x}=0.07392 y + 0.7746$ $\bar{y}=9.5456 x - 5.7392$	$\sigma \text{ est } x=0.01687$ $\sigma \text{ est } y=0.1917$
	IV	1.39	13.41	0.97	0.01414	0.29810	$\bar{x}=0.04601 y + 0.7730$ $\bar{y}=20.45 x - 15.0149$	$\sigma \text{ est } x=0.003438$ $\sigma \text{ est } y=0.07247$
	V	1.5	35.63	0.66	0.02887	1.69970	$\bar{x}=0.01121 y + 1.1006$ $\bar{y}=38.857 x - 22.66$	$\sigma \text{ est } x=0.02169$ $\sigma \text{ est } y=1.2769$

Table III. Statistical analysis showing the correlation between the weight of the uzi maggot and the rate of pupation.

Tableau III. Analyse statistique montrant la corrélation entre le poids des asticots uzi et le taux de pupaison.

Silkworm race/ hybrid	Instar of silkworm	Weight of 10 uzi maggots (g) x	Pupation rate (%) y	Correlation coefficient r	SD σ x	SD σ y	Regression equation (score form)	Standard error of estimate
<i>Race de ver à soie ou hybride</i>	<i>Age larvaire du ver à à soie</i>	<i>Poids de 10 asticots uzi (g) x</i>	<i>Taux de pupaison (%) y</i>	<i>Coefficient de corrélation r</i>	<i>Ecart type σ x</i>	<i>Ecart type σ y</i>	<i>Equation de régression (formulation)</i>	<i>Ecart type de l'estimation</i>
Pure Mysore	III	0.89	73.3	0.77	0.06976	1.03441	$\bar{x}=0.05193 y - 2.9165$ $\bar{y}=11.4177 x + 63.1383$	$\sigma \text{ est } x=0.63804$ $\sigma \text{ est } y=0.6600$
	IV	1.06	84.2	0.71	0.04203	0.69520	$\bar{x}=0.04293 y - 2.5547$ $\bar{y}=11.7438 x + 71.7516$	$\sigma \text{ est } x=0.02960$ $\sigma \text{ est } y=0.4896$
	V	1.27	95.9	1.00	0.04726	0.54470	$\bar{x}=0.08676 y - 7.0503$ $\bar{y}=11.5256 x + 81.2625$	$\sigma \text{ est } x=0$ $\sigma \text{ est } y=0$
Pure Mysore $\times$ NB ₄ D ₂	III	1.04	82.3	0.81	0.02160	0.97470	$\bar{x}=0.01795 y - 0.4373$ $\bar{y}=36.5513 x + 44.2867$	$\sigma \text{ est } x=0.01267$ $\sigma \text{ est } y=0.5716$
	IV	1.22	85.5	0.86	0.01414	1.28190	$\bar{x}=0.009486 y + 0.4089$ $\bar{y}=77.9656 x - 9.6180$	$\sigma \text{ est } x=0.007216$ $\sigma \text{ est } y=0.6542$
	V	1.47	96.1	0.52	0.02887	0.42030	$\bar{x}=0.03572 y - 1.9627$ $\bar{y}=7.5704 x + 84.9716$	$\sigma \text{ est } x=0.02466$ $\sigma \text{ est } y=0.3590$
NB ₄ D ₂	III	1.19	84.0	0.82	0.03109	0.28870	$\bar{x}=0.08831 y - 6.2277$ $\bar{y}=7.6145 x + 74.9388$	$\sigma \text{ est } x=0.0178$ $\sigma \text{ est } y=0.1652$
	IV	1.39	86.7	0.80	0.01414	0.47260	$\bar{x}=0.02394 y - 0.6852$ $\bar{y}=26.7383 x + 49.5337$	$\sigma \text{ est } x=0.008484$ $\sigma \text{ est } y=0.2836$
	V	1.50	96.8	0.53	0.02887	0.41230	$\bar{x}=0.03711 y - 2.0924$ $\bar{y}=7.5690 x + 85.4464$	$\sigma \text{ est } x=0.02448$ $\sigma \text{ est } y=0.3496$

Table IV. Statistical analysis showing the correlation between the weights of uzi pupae and fly emergence.

Tableau IV. Analyse statistique montrant la corrélation entre le poids des pupes uzi et l'émergence des mouches.

Silkworm race/ hybrid	Instar of silkworm	Weight of 10 uzi pupae (g) x	% of uzi fly emergence y	Correlation coefficient r	SD σx	SD σy	Regression equation (score form)	Standard error of estimate
<i>Race de ver à soie ou hybride</i>	<i>Age larvaire du ver à à soie</i>	<i>Poids de 10 pupes uzi (g) x</i>	<i>% d'émergence des mouches uzi y</i>	<i>Coefficient de corrélation r</i>	<i>Ecart type σx</i>	<i>Ecart type σy</i>	<i>Equation de régression (formulation)</i>	<i>Ecart type de l'estimation</i>
Pure Mysore	III	0.8	82.8	0.53	0.05716	2.32809	$\bar{x}=0.01301 y - 0.2772$ $\bar{y}=21.5866 x + 65.5308$	$\sigma \text{ est } x=0.04847$ $\sigma \text{ est } y=1.9742$
	IV	0.96	92.0	0.64	0.4203	1.93046	$\bar{x}=0.01393 y - 0.3216$ $\bar{y}=29.3955 x + 63.78$	$\sigma \text{ est } x=0.0323$ $\sigma \text{ est } y=1.4833$
	V	1.14	94.4	0.34	0.04203	1.6031	$\bar{x}=0.008914 y + 0.2985$ $\bar{y}=12.9682 x + 79.6162$	$\sigma \text{ est } x=0.03953$ $\sigma \text{ est } y=1.5076$
Pure Mysore $\times$ NB ₄ D ₂	III	0.95	87.6	0.98	0.04123	0.4203	$\bar{x}=0.09614 y - 7.4719$ $\bar{y}=9.99 x + 78.1094$	$\sigma \text{ est } x=0.008205$ $\sigma \text{ est } y=0.08364$
	IV	1.10	93.2	0.99	0.02944	0.8813	$\bar{x}=0.03307 y - 1.9821$ $\bar{y}=29.6361 x + 60.6003$	$\sigma \text{ est } x=0.004153$ $\sigma \text{ est } y=0.1243$
	V	1.33	96.4	0.76	0.02944	0.6976	$\bar{x}=0.03207 y - 1.7616$ $\bar{y}=18.0087 x + 72.4484$	$\sigma \text{ est } x=0.01913$ $\sigma \text{ est } y=0.4534$
NB ₄ D ₂	III	1.08	93.7	0.94	0.01732	0.4726	$\bar{x}=0.03445 y - 2.1479$ $\bar{y}=25.6492 x + 65.9989$	$\sigma \text{ est } x=0.005909$ $\sigma \text{ est } y=0.1612$
	IV	1.28	94.0	0.78	0.01732	0.9629	$\bar{x}=0.01404 y - 0.03924$ $\bar{y}=43.3503 x + 38.5116$	$\sigma \text{ est } x=0.01084$ $\sigma \text{ est } y=0.6024$
	V	1.43	97.2	0.31	0.07746	0.5888	$\bar{x}=0.04078 y - 2.5340$ $\bar{y}=2.3564 x + 93.8303$	$\sigma \text{ est } x=0.07364$ $\sigma \text{ est } y=0.5598$

age worms and laying of fewer eggs on each host individual to ensure the survival of the host till the completion of the parasitic stage of the uzifly for better growth, development and multiplication of its own progeny.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the Central Silk Board, Bangalore, for the facilities and assistance for promotion of sericultural research.

REFERENCES

- CHAPMAN R.F. (1982), The insects : structure and function. The English Language Book Society, London, 819.
- KRISHNASWAMY S., JOLLY M.S., DATTA R.K. (1964), A study on the fly infestation of the larvae and cocoons of *B. mori* L. Indian J. Seric., 3, 7-12.
- KUMAR P., JOLLY M.S., REDDY V.V. (1986), The effects of the number of maggots per host on the developmental stages of *Tricholyga bombycis* Beck., an endoparasite of *Bombyx mori* L. Sericologia, 26, 519-528.
- ODUME P. (1975), Ecology. University Georgia, 244.
- OSHIKI T., NAKAZAWA K. (1987), Growth and development of *Exorista sorbillans* in the larva of *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn., 56, 494-499.
- PATIL G.M., GOVINDAN R. (1984), Biology of uzifly, *Exorista sorbillans* (Wiedemann) (Diptera : Tachinidae) on Eri silkworm, *Samia cynthia ricini* Boisduval. Indian J. Seric., 23, 32-37.
- PRASAD N.R., SRINIVASA REDDY Y., KRISHNAMURTHY N.B. (1985), Studies on physiological interaction between silkworm (*Bombyx mori*) and its endoparasite, Uzifly (*Exorista sorbillans*). Sericologia, 25, 511-523.
- SRIHARAN T.P., SAMSON M.V., KRISHNASWAMY S., DATTA R.K. (1971), *Tricholyga bombycis* Beck., a tachinid parasite of silkworm (*Bombyx mori* L.). 1. Rearing and reproduction of the parasite. Indian J. Seric., 10, 14-22.
- SRIKANTH J., BASAPPA H., LINGAPPA S. (1988), Effect of uzifly parasitization on food consumption and growth of the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. Insect Sci. Applic., 9, 373-376.
- THANGAVELU K., BHAGAWATI A.K., CHAKRABORTY A.K. (1985), Uzifly menace in mugaculture. Indian Silk (July), 7-10.

QUELQUES OBSERVATIONS SUR L'INTERACTION PARASITE-HOTE ENTRE LA MOUCHE UZI *EXORISTA* *SORBILLANS* (WIEDEMANN) (DIPTERA : TACHINIDAE) ET SON HOTE *BOMBYX MORI* L. (LEPIDOPTERA : BOMBYCIDAE)

R. GOVINDARAJU* & B. SARATCHANDRA**

* Central Sericultural Research and Training Institute, Research Extension Centre, 88-B, Main Road, Denkanikota - 635 102, Dharmapuri District, Tamil Nadu, Inde.

** Regional Sericultural Research Station, Kodathi, Carmelaram PO, Bangalore - 560 035, Inde.

On a étudié le développement de la mouche uzi Exorista sorbillans en fonction de l'âge larvaire auquel elle infeste son hôte, Bombyx mori, et du poids du corps au moment de l'émergence des asticots uzi. La durée larvaire d'Exorista sorbillans est significativement plus faible (au-dessus du seuil de 1 %) quand elle infeste les derniers âges larvaires de B. mori que lorsque les asticots infestent les premiers âges. On observe une corrélation fortement positive entre le poids du ver à soie et le poids des asticots uzi ainsi qu'avec la date d'émergence qui se reflète aux derniers stades d'Exorista sorbillans jusqu'à l'émergence des mouches. Les corrélations entre le poids des asticots et le taux de pupaison, le poids des pupes et le pourcentage d'émergence sont également positives et élevées.

INTRODUCTION

La mouche uzi *Exorista sorbillans* (Wiedemann) étant un parasite très répandu du ver à soie *Bombyx mori*, les sériciculteurs attachent beaucoup d'importance à son étude. Darwin a établi que non seulement la compétition mais aussi la coopération joue un rôle important dans la sélection naturelle (Odum, 1975), ce qui indique qu'il existe une relation étroite entre le parasite et son hôte. Pour lutter de manière efficace contre un parasite donné ou pour préserver l'hôte du parasite, il est nécessaire d'étudier l'interaction hôte-parasite. Krishnaswamy et coll. (1964), Prasad et coll. (1985), Kumar et coll. (1986), Oshiki et Nakazawa (1987) et Srikanth et coll. (1988) ont déjà réalisé des études sur l'interaction hôte-parasite entre *B. mori* et *E. sorbillans*. Quelques observations supplémentaires portant sur la relation entre l'âge larvaire de *B. mori* au moment de l'infestation et la croissance et le développement d'*Exorista sorbillans* sont présentées dans cet article.

MATERIELS ET METHODES

Les asticots uzi ont été achetés au marché aux cocons pour grainage de Denkanikota dans le District de Dharmapuri (Tamil Nadu, Inde). Ils ont été placés dans des bocaux contenant un peu de sable. L'ouverture du bocal est recouverte d'un tissu en mousseline et la pupaison des asticots s'effectue dans le bocal. Les pupes du 10^e jour sont placées dans des cages couvertes d'un filet en nylon pour l'émergence des mouches. Les mouches sont alimentées avec un coton imbibé d'une solution de glucose à 10 %. Quatre jours après l'accouplement, des vers à soie entrant aux 3^e, 4^e et 5^e âges sont introduits dans les cages afin que les mouches uzi pondent leurs oeufs sur eux. Les vers à soie sont ensuite prélevés et examinés à la loupe. On laisse un seul oeuf par ver à soie, les autres

oeufs étant ôtés à l'aide d'une brosse fine. Trois jours après la ponte, on isole les vers infestés repérés par des cicatrices noires marquant la pénétration des asticots dans le corps de la larve. Les vers à soie ainsi infestés sont répartis en fonction de leur âge et de leur race et élevés suivant les techniques d'élevage standard sur des feuilles de mûrier de la variété Kanva-2. Les vers à soie des races Pure Mysore, Pure Mysore $\times$ NB4D2 et NB4D2 sont utilisés dans cette étude et l'élevage est conduit en trois réplicats de 50 vers chacun. Trois tests ont été effectués d'octobre à décembre 1988 à une température de 19-26 °C et une humidité relative de 65-85 % à l'intérieur de la pièce d'élevage. Les données sur la période larvaire chez uzi, le poids des larves de vers à soie infestées par la mouche uzi au moment de l'émergence des asticots uzi, le poids des asticots, le poids des pupes uzi, le taux de pupaison des asticots uzi, l'émergence des adultes, etc., ont été relevés et sont présentés dans le tableau I. Les données ont été analysées statistiquement et sont présentées dans les tableaux II, III et IV.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données obtenues indiquent qu'il existe une relation directe entre le développement du parasite *E. sorbillans* et l'âge larvaire de son hôte *B. mori* au moment de l'infestation. La durée de vie larvaire d'*Exorista sorbillans* est supérieure de manière significative (au-dessus du seuil de 1 %) lorsqu'elle infeste les premiers âges à celle des asticots infestant les derniers âges. Ceci a été expliqué par Oshiki et Nakazawa (1987) qui ont établi que la croissance et le développement d'*Exorista sorbillans* sont synchronisés avec la métamorphose de *B. mori* et que le système endocrinien du parasite pourrait être inhibé par la présence d'un taux élevé d'hormone juvénile chez l'hôte au début de sa période larvaire. Les vers à soie infestés au cinquième âge sont plus grands et plus lourds que les vers à soie infestés aux premiers âges, comme le montrent les données sur le poids des larves à l'émergence des asticots uzi. Les asticots uzi issus des vers à soie les plus gros sont également plus grands, ont une meilleure pupaison et une pupe plus lourde et donnent un taux d'émergence des adultes plus élevé. On observe une corrélation positive forte entre le poids du ver à soie infesté et le poids des asticots uzi, entre le poids des asticots uzi et leur taux de pupaison (%), entre le poids des pupes uzi et leur pourcentage d'émergence, etc. Les mêmes résultats sont obtenus pour toutes les races de vers à soie utilisées dans cette étude. Ces résultats confirment l'hypothèse de Thangavelu et coll. (1985) selon laquelle la mouche uzi pond préférentiellement ses oeufs sur des vers à soie plus gros, offrant donc une réserve de nourriture plus importante. Patil et Govindan (1984) ont également observé que le développement des asticots d'*Exorista sorbillans* et leur durée chez le ver à soie est fonction de la quantité de nourriture disponible, compte tenu de l'âge larvaire et de la densité d'asticots par individu hôte. De même, Kumar et coll. (1986) ont noté une diminution significative de la durée du développement des asticots, du pourcentage d'obtention d'asticots, du poids des pupes, du taux d'émergence et de la fécondité chez *Exorista sorbillans* à mesure que l'infestation de l'hôte augmente ; ceci montre là encore que le développement du parasite est lié à la nourriture. Prasad et coll. (1985) ont également réalisé une étude similaire mais portant sur la mortalité de l'hôte ; celle-ci est de 100 % lorsque l'infestation a lieu aux deux premiers âges du ver à soie. Krishnaswamy et coll. (1964) et Srikanth et coll. (1988) ont observé une diminution du rendement en cocons et des paramètres du cocon. Ils ont également observé que les vers à soie non infestés de la fin du cinquième âge mangent davantage que les vers à soie infestés et que les vers à soie infestés aux deux derniers jours de leur stade larvaire présentent une digestibilité accrue. Ils ont également avancé que cette digestibilité accrue permettait aux vers à soie parasités de surmonter le stress nutritionnel dû à l'infestation. Chapman (1971) a également noté qu'un insecte parasite évite une oviposition excessive sur son hôte afin d'éviter une compétition chez sa progéniture. Cependant, Sriharan et coll. (1971) pensent que la mouche uzi préfère les vers à soie âgés car ils sont plus mous et lui permettent de pondre ses oeufs confortablement.

Les asticots d'*Exorista sorbillans* étant des endoparasites pour lesquels il est nécessaire que l'hôte termine son cycle vital, il est préférable pour ce parasite que l'hôte survive jusqu'à la fin de son stade parasitique. Les résultats antérieurs indiquent également que l'infestation des vers à soie aux premiers âges par la mouche uzi et un taux d'infestation important entraînent la mort de l'hôte puis la mort du parasite. L'infestation aux derniers âges du ver à soie assure à l'asticot un meilleur

développement et, à la fin du cycle pupal, une meilleure émergence des mouches. Ces observations expliquent donc pourquoi la mouche uzi pond préférentiellement ses oeufs sur des larves du dernier âge uniquement et pourquoi elle pond moins d'oeufs sur chaque individu hôte, cela lui permettant d'assurer la survie de son hôte jusqu'à la fin du stade parasitique et une meilleure croissance, un meilleur développement et une meilleure reproduction de sa propre progéniture.

POLLEN GERMINATION AND POLLEN TUBE GROWTH OF MULBERRY AS INFLUENCED BY TRIAZOLE COMPOUNDS

V.M. SREEDHAR, M.P. SHREE & G. BORAIAH

Department of Sericulture, Bangalore University, Central College Campus, Prasanna Kumar Block, Bangalore - 560 009, India.

*The influence of triazole compounds (triadimefon and uniconazole) on the pollen germination and pollen tube growth of mulberry (*Morus* cv. kajli) was studied. The lower concentrations of triadimefon (50 ppm) and uniconazole (1 ppm) significantly enhanced the pollen germination (%) and length of the pollen tube, while the higher concentrations were inhibitory. Interestingly, the tips of the pollen tubes showed characteristic swelling which was not seen in the control set.*

Keywords : Mulberry, pollen germination, triadimefon, uniconazole, triazole.

INTRODUCTION

Triadimefon and uniconazole belong to a group of chemicals called "Triazole Compounds", which constitutes the largest and most important group of systemic compounds developed for the control of fungal diseases of plants and animals. The triazoles also contain compounds which are released as plant growth regulators. However, these compounds have exhibited both plant growth regulating and fungicidal activity in varying degrees (Fletcher, 1985 ; Fletcher *et al.*, 1986). The growth regulating properties of the triazole compounds are largely attributed to their interference with the isoprenoid pathway (Buchenauer and Rohner, 1981) which blocks the gibberellin biosynthesis in plants (Ali *et al.*, 1979). Their fungitoxic properties are due to inhibition of ergosterol biosynthesis in fungi (Ragsdale, 1977). The plant growth regulating properties of the triazoles include inhibition of shoot growth, causing a reduction in internodal distance (Steffens *et al.*, 1985 ; Lecain *et al.*, 1986), increased weight, thickness and length of roots (Fletcher *et al.*, 1988), protects plants from water stress, chilling and ozone injury (Fletcher and Hofstra, 1985). However, the influence of triazoles on pollen germination and development has not been so far studied. Hence, the present investigation was carried out on the pollen of mulberry plant. Mulberry is a highly heterozygous plant and the principal method of propagation is through cuttings. Like in any other crop, improvement of mulberry can be brought about by conventional hybridisation and polyploidy breeding. When these triazoles are applied on mulberry plants for improving their growth and development, there is every possibility of pollen coming in contact with these chemicals directly or indirectly. Therefore, it was thought worthwhile to study the effect (harmful or beneficial) of these triazoles on pollen germination and pollen tube growth.

MATERIALS AND METHODS

The pollen grain germination and pollen tube growth were studied in mulberry plant, *Morus*, cv. kajli. The pollen was collected from the mature anthers of male flowers during the early hours of the day (between 9.00 and 9.30 a.m.). The medium consisting of 1 % sucrose solution containing 250 ppm of boric acid and 150 ppm calcium chloride was chosen (Padmanaban, 1977). To this medium, triadimefon and uniconazole were added in requisite quantities so as to get 50, 100 and 200 ppm

concentrations of triadimefon and 1, 10 and 50 ppm of uniconazole. For control, no chemical was added. The pollen grains were placed in these media separately, in cavity slides. They were incubated in BOD incubator at 24 °C and 90-95 % relative humidity. The pollen germination (%) and the length of the pollen tube (μm) were measured at two hourly intervals up to the sixth hour using a pre-calibrated microscope. The data collected were statistically analysed using Fischer's method of 'Analysis of Variance' (Sundararaj *et al.*, 1972).

RESULTS

Observations made on the pollen germination and pollen tube growth (length) as influenced by triadimefon and uniconazole are given in Tables I and II. The lower concentrations of triadimefon and uniconazole significantly enhanced pollen germination (Table I) while the higher concentrations were inhibitory. The maximum percentage of germination was observed in 50 ppm triadimefon (21.83 %) (Fig. 2), followed by 1 ppm uniconazole (16.67 %) (Fig. 3). This was significantly higher compared to the control (14.22 %) (Fig. 1). The higher concentrations of triadimefon (200 ppm) and uniconazole (10 and 50 ppm) inhibited pollen germination. Also, there was a marked influence of

Table I. Effect of triadimefon and uniconazole on pollen germination (%) in *Morus* cv. kajli.

Tableau I. Effet du triadimefon et de l'uniconazole sur le pourcentage de germination du pollen chez Morus var. kajli.

Sl no.	Chemical Agent chimique	Concentration (ppm) Concentration (ppm)	Pollen germination (%)		
			After 2 hours	After 4 hours	After 6 hours
			Germination du pollen (%)		
			Après 2 heures	Après 4 heures	Après 6 heures
1	Triadimefon	50	11.62	16.72	21.83
2		100	9.20	11.94	17.27
3		200	3.43	5.68	8.13
4	Uniconazole	1	5.43	12.30	16.67
5		10	5.88	10.74	12.51
6		50	3.05	6.67	9.43
7	Control / Témoin		5.84	11.28	14.22
8	Grand mean / Moyenne totale		6.35	10.76	13.87
9	Significance / Signification		**	**	**
10	SEM / Ecart type moyen		0.28	0.41	0.66
11	CD 1 %		1.14	1.71	2.86
12	CD 5 %		0.85	1.25	2.04
13	CV %		7.53	6.52	8.261

triazole compounds on the pollen tube growth (Table II). The lower concentrations of triadimefon and uniconazole significantly enhanced the pollen tube growth, while they were highly inhibitory at higher concentrations. The maximum length of the pollen tube was observed in 50 ppm triadimefon (24.16 μm) followed by 1 ppm uniconazole (23.19 μm) which was significantly higher than the control (19.30 μm).

Apart from these normal pollen germinations an unusual feature was observed in the triadimefon and uniconazole treated pollen grains. The treated pollen grains showed swelling of the pollen tubes at their tip. The swelling of the pollen tube tip was prominent in the case of uniconazole treated pollen tube grains (Fig. 2 and 3).

Table II. Effect of triadimefon and uniconazole on the length of the pollen tube in *Morus* cv. Kajli.

Tableau II. Effet du triadimefon et de l'uniconazole sur la longueur du tube pollinique chez Morus var. Kajli.

Sl no.	Chemical	Concentration (ppm)	Length of pollen tube (μm)		
			After 2 hours	After 4 hours	After 6 hours
			Longueur du tube pollinique (μm)		
<i>N° de série</i>	<i>Agent chimique</i>	<i>Concentration (ppm)</i>	<i>Après 2 heures</i>	<i>Après 4 heures</i>	<i>Après 6 heures</i>
1	Triadimefon	50	6.44	20.80	24.16
2		100	5.71	16.57	17.08
3		200	3.65	9.63	15.94
4	Uniconazole	1	11.53	20.01	23.19
5		10	8.69	14.73	17.57
6		50	4.69	8.08	9.23
7	Control / Témoin		12.34	17.30	19.30
8	Grand mean / Moyenne totale		7.62	15.308	18.07
9	Significance / Signification		**	**	**
10	SEM / Ecart type moyen		0.34	0.30	0.22
11	CD 1 %		1.48	1.30	0.95
12	CD 5 %		1.05	0.93	0.68
13	CV %		7.77	3.41	2.12

DISCUSSION

The information on the effect of triazole compounds on the growth of pollen grain is very meagre (Davis *et al.*, 1989). In the present study, an attempt was made to know the influence of triadimefon and uniconazole on pollen grain. Much remains to be done in the field of the effect of various triazole compounds on the pollen growth. Earlier workers have paid attention to study the effect of growth regulators like indolebutyric acid, gibberellic acid, kinetin and abscisic acid, on pollen germination

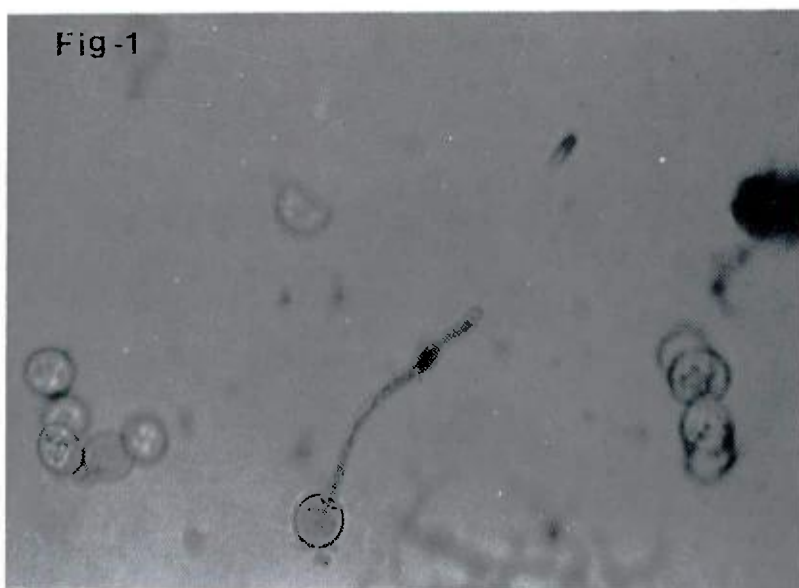


Fig. 1 : Influence of triadimefon and uniconazole on pollen tube growth - Control.

Fig. 1 : Influence du triadimefon et de l'uniconazole sur la croissance du tube pollinique - Témoin.

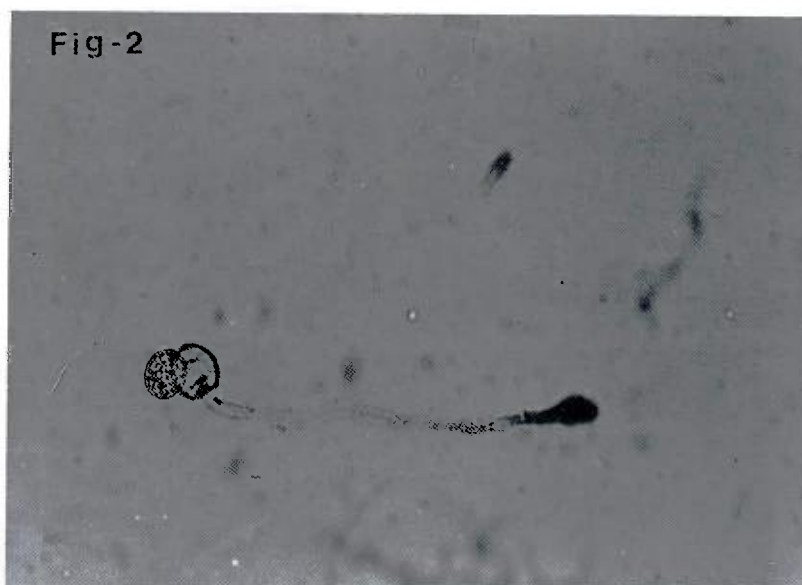


Fig. 2 : Influence of triadimefon and uniconazole on pollen tube growth - Treated with triadimefon.

Fig. 2 : Influence du triadimefon et de l'uniconazole sur la croissance du tube pollinique - Traitement au triadimefon.

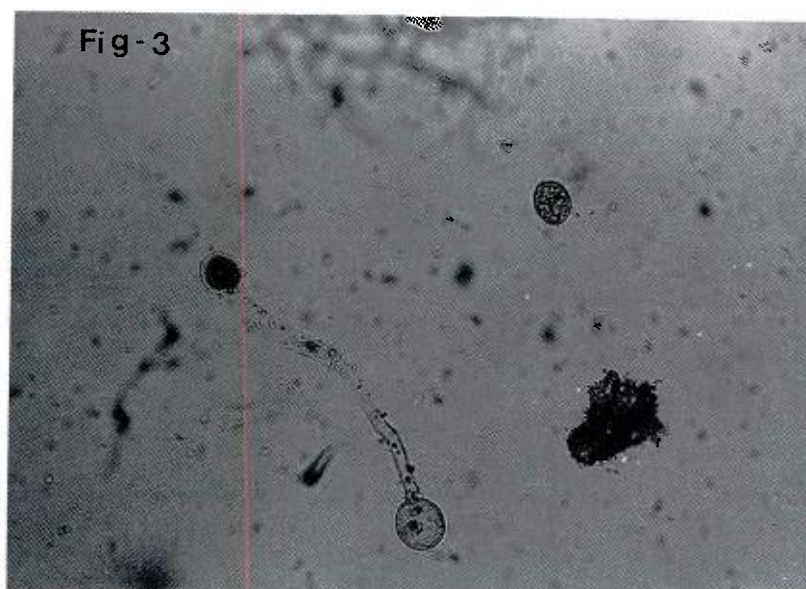


Fig. 3 : Influence of triadimefon and uniconazole on pollen tube growth - Treated with uniconazole.

Fig. 3 : Influence du triadimefon et de l'uniconazole sur la croissance du tube pollinique - Traitement à l'uniconazole.

and tube growth of various cultivated and tree species (Kato, 1955 ; Kazama and Katsuma, 1974 ; Malik and Chabra, 1978 ; Kumar *et al.*, 1982).

There is a conspicuous absence of any type of literature on the effect of various triazoles on pollen growth. Triazole compounds are known to interfere with the isoprenoid pathway (Fletcher, 1985) which generates the important plant, fungal, insect and animal hormones and they are also known to behave as growth regulators (Fletcher, 1985). Hence, there is every possibility of these compounds to behave in a similar way as those of plant hormones, which bring about beneficial effects on pollen germination and tube growth. Thus, it may be assumed that the enhanced pollen germination and pollen tube growth due to triazole treatment to be one of the reasons to increase the yield of certain crops as observed by Thomas and Burts (1983) using paclobutrazol in *Pyrus communis* L. ; Curry and Williams (1983) reported a similar increase in yield by paclobutrazol in 'Delicious' apples ; Frost and Kretschman (1987) using ancymidol, a growth retardant, in *Lycopersicon esculentum* mill. The unusual feature of swollen tube tip was reported in *Carica papaya* by Eng and Rao (1968) and also in oil palm by Rao and Eng (1967).

The standardised sucrose medium (Padmanaban, 1977) can be supplemented with triadimefon (50 ppm) or uniconazole (1 ppm) to get a promoting effect in the germination as well as pollen tube growth in mulberry (*Morus* cv. kajli).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr R.A. Fletcher, Ontario Agricultural College, Canada, for providing the free samples of triadimefon and uniconazole and for giving suggestions during this study.

REFERENCES

- ALI A., HALL R., FLETCHER R.A. (1979), Inhibition of fungal growth by plant growth retardants. *Can. J. Bot.*, 57, 458-460.
- BUCHENAUER H., ROHNER E. (1981), Effect of triadimefon and triadimenol on various plant species as well as on gibberellin content and sterol metabolism in shoots of barley seedlings. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 15, 58-70.
- CURRY E.A., WILLIAMS M.W. (1983), Promalin or GA₃ increases pedicel and fruit length and leaf size of 'Delicious' apples treated with paclobutrazol. *HortScience*, 18, 214-215.
- DAVIS T.D., STEFFENS G.L., SANKHLA N. (1988), Triazole plant growth regulators. *Hort. Rev.*, 10, 63-105.
- ENG L.L., RAO A.N. (1968), Pollen germination and formation of callose plugs in papaya pollen tubes. *Curr. Sci.*, 37, 690-697.
- FLETCHER R.A., HOFSTRA G. (1985), Triadimefon: A plant multiprotectant. *Plant Cell Physiol.*, 26, 775-780.
- FLETCHER R.A. (1985), Plant growth regulating properties of sterol-inhibiting fungicides. *In* Hormonal regulation of plant growth and development. S.S. Purohit, ed. Agro-Botanical Publishers, Bikaner, India. 103-113.
- FLETCHER R.A., HOFSTRA G., GAO J. (1986), Comparative fungitoxic and plant growth regulating properties of triazole derivatives. *Plant Cell Physiol.*, 27, 367-371.
- FLETCHER R.A., ASARE-BOAMAH N.K., KRIEG L.C., HOFSTRA G., DUMBROFF E.B. (1988) Triadimefon stimulates rooting in bean hypocotyl. *Physiol. Plant*, 73, 401-405.
- FROST D.J., KRETCHMAN D.W. (1987), Use of growth retardants to improve ripening uniformity and yield of processing tomatoes. *HortScience*, 22, 422-423.
- KATO Y. (1955), Response of plant cell to GA₃. *Bot. Gazette*, 117, 16-24.
- KAZAMA H., KATSUMA N. (1974), Auxin-Gibberellin relationship in their effect on hypocotyl elongation of light grown cucumber. Effect of GA₃ penetration on IAA induced elongation. *Plant Cell Physiol.*, 25, 158-166.
- KUMAR A.V., PRASAD S.V., RAO R. (1982), Influence of growth regulators on germination of pollen of three tree species. *Indian J. Plant Physiol.*, 25, 158-166.
- LECAIN D.R., SCHEKEL K.A., WAMPLE R.L. (1986), Growth retarding effects of paclobutrazol on weeping fig. *HortScience*, 21, 1150-1152.
- MALIK C.P., CHABRA N. (1978), Groundnut pollen germination and its control mechanisms. *From Physiology of sexual reproduction in flowering plants*. C.P. Malik ed., 31-38.
- PADMANABAN D. (1977), The male gametophyte germination of pollen grains. *A manual of plant development*. School of Biological Sciences, Madurai University, Madurai - 625 021, India. 10-11.
- RAGSDALE N.N. (1977), Inhibitors of lipid synthesis. *In* Antifungal Compounds. M.R. Siegel and H.D. Sisler eds., Marcel Dekker, Inc., New York. Vol. II, 333-363.
- RAO A.N., ENG L.L. (1967), Pollen germination in oil palm, *Eluci quineensis* Jacq. *Curr. Sci.*, 36, 641-643.
- STEFFENS G.L., BYUN J.K., WANG S.Y. (1985), Controlling plant via the gibberellin biosynthesis system. I. Growth parameter alterations in apple seedlings. *Physiol. Plant*, 63, 163-168.
- SUNDARARAJ N., NAGARAJU S., VENKATA RAMU M.N., JAGANNATH M.K. (1972), Design and analysis of field experiments. University of Agricultural Sciences, Hebbal, Bangalore - 560 024, India.
- THOMAS R.J., BURTS F.C. (1983), Increased yield and suppression of shoot growth and mite populations of 'd' Anjou. *HortScience*, 18, 212-214.

INFLUENCE DES COMPOSES TRIAZOLES SUR LA GERMINATION DU POLLEN ET LA CROISSANCE DU TUBE POLLINIQUE CHEZ LE MURIER

V.M. SREEDHAR, M.P. SHREE & G. BORAIAH

Department of Sericulture, Bangalore University, Central College Campus, Prasanna Kumar Block, Bangalore - 560 009, Inde.

*On a étudié l'influence des composés à base de triazoles (triadimefon et uniconazole) sur la germination du pollen et la croissance du tube pollinique chez le mûrier (*Morus* cv. kajli). Des concentrations faibles de triadimefon (50 ppm) et d'uniconazole (1 ppm) augmentent significativement la germination du pollen (%) et la longueur du tube pollinique, tandis que des concentrations fortes sont inhibitrices. Il est intéressant de noter que les extrémités des tubes polliniques présentent un gonflement caractéristique qui n'apparaît pas chez le groupe témoin.*

INTRODUCTION

Le triadimefon et l'uniconazole appartiennent à un groupe de substances chimiques appelées "Composés triazoles", qui forme le groupe le plus grand et le plus important des composés systémiques mis au point pour la lutte contre les maladies fongiques des animaux et des plantes. Les triazoles contiennent également des composés qui agissent comme régulateurs de croissance des végétaux. Cependant, ces composés présentent à la fois des propriétés de régulation de croissance des plantes et une activité fongicide à différents degrés (Fletcher, 1985 ; Fletcher et coll., 1986). Les propriétés de régulation de la croissance des composés à base de triazole sont principalement attribuées à leur interférence avec la voie métabolique des isoprénoides (Buchenauer et Rohner, 1981) qui bloque la biosynthèse de la gibberelle chez les végétaux (Ali et coll., 1979). Leurs propriétés fongitoxiques sont dues à l'inhibition de la biosynthèse des ergostérols chez les champignons (Ragsdale, 1977). Les propriétés de régulation de la croissance des triazoles chez les végétaux incluent l'inhibition de la croissance des pousses, qui entraîne une réduction de la distance internodale (Steffens et coll., 1985 ; Lecain et coll., 1986), une augmentation du poids, de l'épaisseur et de la longueur des racines (Fletcher et coll., 1988) et protège les végétaux du manque d'eau, du froid et des dommages dus à l'ozone (Fletcher et Hofstra, 1985). Cependant, l'influence des triazoles sur la germination et le développement du pollen n'a pas encore été étudiée. On a donc entrepris cette étude qui porte sur le pollen du mûrier. Le mûrier est une plante fortement hétérozygote et sa reproduction se fait principalement par le bouturage. Comme tout autre culture, celle du mûrier peut être améliorée par l'hybridation conventionnelle et la sélection de polyploïdes. Au cours de l'application des triazoles sur les plants de mûrier afin d'améliorer leur croissance et leur développement, il existe un risque important de contact, direct ou indirect, du pollen avec ces substances chimiques. Il est donc apparu intéressant d'étudier l'effet (nocif ou bénéfique) de ces triazoles sur la germination du pollen et la croissance du tube pollinique.

MATERIELS ET METHODES

On a étudié la germination des grains de pollen et la croissance du tube pollinique chez le mûrier *Morus*, cv. kajli. Le pollen est prélevé sur les anthères matures des fleurs mâles dans la matinée (entre

9 h 00 et 9 h 30). On a choisi un milieu composé d'une solution de sucrose à 1 % contenant 250 ppm d'acide borique et 150 ppm de chlorure de calcium (Padmanaban, 1977). On a ajouté à ce milieu les quantités de triadimefon et d'uniconazole requises pour obtenir des concentrations de 50, 100 et 200 ppm de triadimefon et de 1, 10 et 50 ppm d'uniconazole. Pour le témoin, aucun produit chimique n'est ajouté. Les grains de pollen sont placés dans ces milieux séparément sur des lames creuses. Ils sont incubés dans un incubateur BOD à 24 °C et 90 à 95 % d'humidité relative. La germination du pollen (%) et la longueur du tube pollinique (μm) sont mesurées toutes les deux heures jusqu'à la sixième heure à l'aide d'un microscope étalonné. Les données relevées sont analysées statistiquement selon la méthode de Fischer d'analyse de variance (Sundararaj et coll., 1972).

RESULTATS

Les observations faites concernant l'influence du triadimefon et de l'uniconazole sur la germination du pollen et la croissance du tube pollinique (longueur) sont présentées dans les tableaux I et II. Les concentrations faibles de triadimefon et d'uniconazole augmentent significativement la germination du pollen (tableau I), tandis que les concentrations fortes sont inhibitrices. Le pourcentage maximal de germination apparaît avec le triadimefon à 50 ppm (21,83 %) (Fig. 2), suivi par l'uniconazole à 1 ppm (16,67 %) (Fig. 3). Ces résultats sont nettement supérieurs à ceux du témoin (14,22 %) (Fig. 1). Les concentrations plus fortes de triadimefon (200 ppm) et d'uniconazole (10 et 50 ppm) inhibent la germination du pollen. De plus, on observe une influence marquée des composés à base de triazole sur la croissance du tube pollinique (tableau II). Les concentrations faibles de triadimefon et d'uniconazole accélèrent significativement la croissance du tube pollinique, tandis qu'elles sont inhibitrices à des concentrations plus élevées. On observe que la longueur du tube pollinique est maximale avec 50 ppm de triadimefon (24,16 μm) suivi d'uniconazole à 1 ppm (23,19 μm), ces résultats étant significativement supérieurs à ceux du témoin (19,30 μm).

Outre ces germinations polliniques normales, un fait inhabituel a été observé chez les grains de pollen traités au triadimefon et à l'uniconazole. Les grains de pollen traités présentent une hypertrophie à l'extrémité du tube pollinique. Cette hypertrophie est proéminente chez les grains de pollen traités à l'uniconazole (Fig. 2 et 3).

DISCUSSION

La documentation sur l'effet des composés du triazole sur la croissance des grains de pollen est très rare (Davis et coll., 1989). Dans la présente étude, on a tenté de déterminer l'influence du triadimefon et de l'uniconazole sur les grains de pollen. Il reste encore beaucoup à faire dans le domaine de l'effet des différents composés à base de triazole sur la croissance du pollen. Des chercheurs se sont attachés à l'étude de l'effet des régulateurs de croissance tels que l'acide indolbutyrique, l'acide gibberellique et l'acide abscisique sur la germination du pollen et la croissance du tube de divers espèces cultivées et arboricoles (Kato, 1955 ; Kazama et Katsuma, 1974 ; Malik et Chabra, 1978 ; Kumar et coll., 1982).

Il existe d'importantes lacunes sur l'effet de divers triazoles sur la croissance pollinique. On sait que les composés à base de triazole interfèrent avec la voie des isoprénoides (Fletcher, 1985) qui génèrent les principales hormones de végétaux, de champignons, d'insectes et d'animaux et qu'ils agissent comme régulateurs de croissance (Fletcher, 1985). Il est donc tout à fait possible que ces composés agissent de manière similaire à celle des hormones végétales qui induisent les effets bénéfiques sur la germination du pollen et la croissance du tube. On peut donc supposer que l'accélération de la germination du pollen et de la croissance du tube pollinique par traitement au triazole soit l'une des raisons de l'augmentation du rendement chez certaines cultures, comme l'ont observé Thomas et Burtis (1983) avec le paclobutrazol chez *Pyrus communis* L. ; Curry et Williams (1983) ont observé une augmentation similaire du rendement par le paclobutrazol chez les pommes "Delicious" ; de même, Frost et Kretschman (1987) avec l'ancymidol, retardateur de croissance, chez le millet de *Lycopersicon esculentum*. L'hypertrophie anormale de l'extrémité du tube a été observée chez *Carica papaya* par Eng et Rao (1968) ainsi que chez l'éléis de Guinée par Rao et Eng (1967).

Le milieu à base de sucrose standardisé (Padmanaban, 1977) peut être complété avec du triadimefon (50 ppm) ou de l'uniconazole (1 ppm) afin d'obtenir un effet bénéfique tant sur la germination que sur la croissance du tube pollinique chez le mûrier (*Morus* cv. kajli).

HISTOPATHOLOGICAL AND HISTOCHEMICAL CHANGES IN MULBERRY (*MORUS ALBA* L.) POWDERY MILDEW DUE TO INFECTION BY *PHYLLACTINIA CORYLEA* (PERS) KARST.

G.C. VIJAYAKUMAR

Department of Botany, College of B.S. & H., University of Agricultural Sciences,
Bangalore - 560 065, India.

The histopathological and histochemical changes were studied in the leaves of Morus alba L. (Mulberry) using Mysore local and Kanva-2 (M5) varieties infected with Phyllactinia corylea (Pers) Karst. which causes powdery mildew disease. The healthy M5 plant has unlobed, thicker and larger leaves of better quality than the traditional Mysore local. The mesophyll of the infected leaf becomes hypertrophied and causes increased leaf thickness at medium infection followed by the gradual decrease in size at severe infection leading to hyperplasia of the mesophyll. The effect was more pronounced in the Mysore local than in M5. The starch grains were larger in the healthy leaves of M5 variety and their degradation due to infection was less than that in the Mysore local. Similarly, the M5 variety also had larger proteinoplasts than Mysore local in the healthy leaves. The proteinoplasts gradually decreased in size with the progression of the disease and in severe infection stage there was complete degradation of proteins in both varieties. However, the RNA content decreased slightly as compared to healthy ones.

Keywords : *Morus alba* L., histopathology, histochemistry, hypertrophy, hyperplasia.

INTRODUCTION

The powdery mildew of *Morus alba* L. (Mulberry) is a common disease caused by *Phyllactinia corylea* (Pers) Karst. This disease causes severe damage to the leaves and feeding such leaves causes adverse effects on silkworms (Anonymous, 1927 ; Yokoyama, 1962 ; Noamani *et al.*, 1970). The earlier studies have shown that feeding such leaves to silkworms led to reduced size and lessened weight of cocoons, and other characteristics such as the silk producing ratio and length of reeled silk were decreased (Sullia and Padma, 1987).

The present study describes the histopathological and histochemical changes in the mulberry leaf tissues due to infection by *Phyllactinia corylea* (Pers) Karst.

MATERIALS AND METHODS

The two cultivars were collected from the fields of Gandhi Krishi Vignana Kendra, University of Agricultural Sciences, Bangalore - 560 065. The M5 variety is a cultivated middle-sized tree characterised by large, thick, unlobed leaves, whereas Mysore local has thin, small dissected leaves with two to five lobes. The variety M5 gives higher yield of better quality leaves than the traditional local.

To know the degree of histopathological and histochemical changes due to *Phyllactinia corylea* (Pers) Karst. infection, leaf samples of both varieties were studied. The healthy, medium and severely infected leaves were fixed in Carnoy's B (Ethyl alcohol 6 parts + chloroform 3 parts + acetic acid one

part) for one hour. The materials were dehydrated in ethyl alcohol-n-butanol series, embedded in paraffin wax of 58 °C and serial sections of 7 µm were subjected to histochemical procedures.

The insoluble polysaccharides were tested by periodic acid Schiff's reagent method of Jensen (1962), proteins by mercuric bromophenol blue method of Mazia *et al.* (1953) and nucleic acids by toluidine blue method of Feder and O'Brien (1968).

RESULTS AND DISCUSSION

Histopathology :

The mulberry leaf is dorsoventrally differentiated with rectangular palisade chlorenchyma, next to the epidermis. Below the palisade tissue there are irregular isodiametric spongy cells with large intercellular spaces. The number of chloroplasts is higher in the palisade chlorenchyma than in the spongy chlorenchyma. Small vascular bundles are distributed regularly throughout the lamina/leaf on either side of the large central mid-vein. The tissues near the vascular bundle are well differentiated with an outer epidermis, cortex, phloem and xylem.

The histological changes occurred in the infected leaves are compared to the healthy ones in Table I. The tissues of healthy leaves of local and M5 variety showed that the M5 variety has thicker leaves than the local. The length of palisade cells and diameter of spongy cells of M5 variety are greater than those of local variety. The presence of pathogen in the plant showed that histopathological changes led to accelerate differentiation in the leaf tissues. In the medium infection the leaf exhibited hypertrophy of tissues leading to increased leaf thickness.

Table I. Some histological characters of healthy and diseased leaves of *Morus alba* L.

Tableau I. Quelques caractères histologiques des feuilles saines et malades de *Morus alba* L.

Tissues	Variety	Healthy	Medium infection	Severe infection
<i>Tissus</i>	<i>Variété</i>	<i>Feuilles saines</i>	<i>Infestation moyenne</i>	<i>Infestation forte</i>
Leaf thickness	Local	124.8	144.4**	144.0**
<i>Epaisseur de la feuille</i>	M5	141.6	125.2**	128.8**
Thickness of palisade parenchyma	Local	40.0	72.4**	52.4**
<i>Epaisseur du parenchyme palissadique</i>	M5	56.8	54.0**	46.4**
Length of the palisade cells	Local	34.8	53.2**	41.2**
<i>Longueur des cellules palissadiques</i>	M5	39.6	38.4 ^{NS}	45.2**
Diameter of spongy cells	Local	9.6	14.0**	11.6*
<i>Diamètre des cellules spongieuses</i>	M5	10.8	8.4*	7.2**

(size in µm) / (taille en µm)

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

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

NS : non significant / Non significatif.

The thickness of palisade layer, the length of palisade cells and the diameter of spongy cells are higher in local than in M₅ variety (Table I). This disease pronounced hypertrophy and hyperplasia as the common feature leading to lack of complete differentiation of the mesophyll in severe infection. The tissue size increased at medium infection level followed by a gradual decrease at severe infection. The hypertrophy and hyperplasia may be because of the production of indole-acetic acid as reported in the leaves of *Camellia* infected by the pathogen *Exobasidium camelliae* var. *Gracilies shirai* (Wolf and Wolf, 1952). The occurrence of pathogen in leaves suggests that the fungus produced a translocatable substance that caused the structural alterations or stimulates the host to produce some compound (Stuehling *et al.*, 1981). The epidermal and cortical cells of the lamina near the vascular bundle degenerate and become necrotic.

Table II. Changes in size of starch granules in Mysore local and M₅ varieties.

Tableau II. Modification de la taille des grains d'amidon chez les variétés Mysore Local et M₅.

Tissues	Variety	Healthy	Medium infection	Severe infection
<i>Tissus</i>	<i>Variété</i>	<i>Feuilles saines</i>	<i>Infestation moyenne</i>	<i>Infestation forte</i>
In palisade cells	Local	3.2	1.5*	NS
<i>Cellules palissadiques</i>	M ₅	5.2	3.6*	2.0 ^{NS}
In spongy cells	Local	1.6	1.2 ^{NS}	NS
<i>Cellules spongieuses</i>	M ₅	1.8	1.2 ^{NS}	1.0 ^{NS}

In μm / En μm .

Histochemistry :

Distinct histochemical changes due to infection are compared with healthy (Tables II, III and IV). The size of starch grains in palisade and spongy cells of healthy leaf in both varieties decreased gradually as the disease progressed. The size of starch grains in palisade and spongy cells of severe infection of M₅ variety measured 2.0 μm and 1.0 μm , respectively, while in local variety very minute degenerating granules were left behind. With the progress of the disease the degradation was more severe in the local variety than in the M₅ variety (Table II). The gradual and complete loss of polysaccharide grains from medium to severe infection showed that the synthesized polysaccharides were probably utilized by the pathogen. The earlier reports on cowpea (Krishna Murthy *et al.*, 1985) and on groundnut (Sindhan and Jaglan, 1987) are in conformity with the present findings.

In the healthy leaf of both varieties the proteinoplasts in palisade and spongy cells were numerous. The changes due to infection are compared with healthy and presented in Table III. The size of proteinoplasts was reduced gradually and ultimately complete degeneration was seen in severe infection in both varieties.

Table III. Changes in size of proteinoplasts in Mysore local and M5 varieties.

Tableau III. Modification de la taille des protéinoplastes chez les variétés Mysore Local et M5.

Tissues	Variety	Healthy	Medium infection	Severe infection
<i>Tissus</i>	<i>Variété</i>	<i>Feuilles saines</i>	<i>Infestation moyenne</i>	<i>Infestation forte</i>
In palisade cells	Local	3.6	2.6 ^{NS}	NS
<i>Cellules palissadiques</i>	M5	4.8	1.0 ^{NS}	NS
In spongy cells	Local	3.4	1.0 ^{NS}	NS
<i>Cellules spongieuses</i>	M5	3.6	1.0 ^{NS}	NS

In μm / En μm .

Table IV. Changes in the nuclear size in Mysore local and M5 varieties.

Tableau IV. Modification de la taille du noyau chez les variétés Mysore Local et M5.

Tissues	Variety	Healthy	Medium infection	Severe infection
<i>Tissus</i>	<i>Variété</i>	<i>Feuilles saines</i>	<i>Infestation moyenne</i>	<i>Infestation forte</i>
In palisade cells	Local	4.0	4.0 ^{NS}	3.2 ^{NS}
<i>Cellules palissadiques</i>	M5	4.0	3.8 ^{NS}	3.8 ^{NS}
In spongy cells	Local	3.4	4.0 ^{NS}	3.8 ^{NS}
<i>Cellules spongieuses</i>	M5	4.0	3.6 ^{NS}	3.8 ^{NS}

In μm / En μm .* Significant at 5 % level / *Significatif au seuil de 5 %*.NS : Non significant / *Non significatif*.

The RNA content was rich in the healthy leaves of both varieties. The nuclei stained deeply. Due to infection there was a slight change in the nuclear size in both varieties as compared to healthy and it is presented in Table IV. There was a slight change in the RNA content but complete degeneration of proteinoplasts. It may be because of the inhibition of protein synthesis by some toxic substances.

Earlier reports on tobacco plants reveal that the pathogenesis-related proteins (PRS) induced during hypersensitivity to infection resulting in particular changes in the pattern of the soluble proteins (Van Loon, 1983). Due to complete lack of proteins in the mildewed leaves the silkworms may get reduced in size and perform poorly (Sullia and Padma, 1987). The action of hormone and the toxins deserve more attention in the future.

ACKNOWLEDGMENTS

The author is thankful to Dr Shyamsundar Joshi for reviewing the manuscript and Drs Venkatasubbaiah and Balakrishna Gowda for helpful suggestions.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1927), Annual report of the mycologist for the period ending 30th June 1926.
- FEDER N., O'BRIEN T.P. (1968), Plant microtechnique. Some principles and new methods. American J. Bot., 55, 123-142.
- JENSEN W.A. (1962), Botanical Histochemistry. San Francisco.
- KRISHNA MURTHY E., SHYAMASUNDAR J., ANIL KUMAR T.B. (1985), Histopathological and histochemical changes in cowpea due to infection by *Xanthomonas campestris* pv. *vignicola*. Zbl. Mikrobiol., 140, 425-430.
- MAZIA D., BREWER P.A., ANDALFERT M. (1953), The cytochemical staining and measurement of proteins with mercuric bromophenol blue. Biol. Bull., 104, 57-67.
- NOAMANI K.R., MUKERJEE P.K., KRISHNA SWAMY S. (1970), Studies on the effect of feeding mildew affected mulberry leaves. Indian J. Seric., 9, 49-52.
- SINDHAN G.S., JAGLAN B.S. (1987), Role of phenolic compounds and carbohydrates in resistance of groundnut to tikka leaf spot. Indian J. Mycol. Pl. Pathology, 17(2), 141-144.
- STUEHLING B.A., NELSON P.E. (1981), Histopathology of the apical leaves of a susceptible chrysanthemum cultivar infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. American Phytopathology, 71, 1152-1155.
- SULLIA S.B., PADMA S.D. (1987), Acceptance of mildew affected mulberry leaves by silkworm (*Bombyx mori* L.) and its effects on cocoon characteristics. Sericologia, 27(4), 693-696.
- VANLOON L.C. (1983), The induction of pathogenesis-related proteins by pathogens and specific chemicals. Neth. J. Pl. Path., 89, 265-273.
- WOLF F.T., WOLF F.A. (1952), Pathology of Camellia leaves infected by *Exobasidium camelliae* var. *Gracilies shirai*. American Phytopathology, 42, 147-149.
- YOKOYAMA T. (1962), Synthesized science of sericulture. 1st ed., Central Silk Board, Bombay.

MODIFICATIONS HISTOPATHOLOGIQUES ET HISTOCHIMIQUES CHEZ LE MURIER (*MORUS ALBA* L.) ATTEINT PAR L'OÏDIUM CAUSE PAR *PHYLLACTINIA CORYLEA* (PERS) KARST.

G.C. VIJAYAKUMAR

Department of Botany, College of B.S. & H., University of Agricultural Sciences,
Bangalore - 560 065, Inde.

On a étudié les modifications histopathologiques et histochimiques des feuilles de *Morus alba* L. (mûrier) sur les variétés Mysore local et Kanva-2 (M5) infestées par *Phyllactinia corylea* (Pers) Karst. qui provoque l'oïdium. La plante saine de M5 a des feuilles non lobées, plus épaisses, plus grandes et de meilleure qualité que la variété traditionnelle Mysore local. Le mésophylle de la feuille infestée s'hypertrophie et provoque un épaississement de la feuille, puis une diminution progressive de la taille au stade maximal de l'infestation, entraînant l'hyperplasie du mésophylle. L'effet est plus marqué chez Mysore local que chez M5. Les grains d'amidon sont plus grands chez les feuilles saines de la variété M5 et elles se détériorent moins vite, du fait de l'infestation, que chez les feuilles de Mysore local. Parallèlement, les feuilles saines ont des protéoplastes plus grands chez la variété M5 que chez Mysore local. La taille des protéoplastes diminue progressivement à mesure que la maladie s'intensifie et, au stade maximal de l'infestation, on observe une dégradation totale des protéines chez les deux variétés. Cependant, leur contenu en ARN ne diminue que légèrement par rapport à celui des feuilles saines.

INTRODUCTION

L'oïdium de *Morus alba* L. (mûrier) est une maladie courante qui est provoquée par *Phyllactinia corylea* (Pers) Karst. Cette maladie endommage gravement les feuilles et le nourrissage avec des feuilles malades a des effets négatifs sur les vers à soie (Anonyme, 1927 ; Yokoyama, 1962 ; Noamani et coll., 1970). Des études antérieures ont montré que le fait de nourrir les vers à soie avec des feuilles malades entraînait une diminution de la taille et du poids des cocons ; d'autres caractéristiques, telles que la richesse soyeuse et la longueur de soie dévidée, diminuent également (Sullia et Padma, 1987).

Cette étude décrit les modifications histochimiques et histopathologiques des tissus de la feuille de mûrier infestée par *Phyllactinia corylea* (Pers) Karst.

MATERIELS ET METHODES

Les deux cultivars ont été prélevés dans la plantation de Gandhi Krishi Vignana Kendra, University of Agricultural Sciences, Bangalore - 560 065. La variété M5 est un arbre de taille moyenne caractérisé par des feuilles grandes, épaisses et non lobées, tandis que la variété Mysore local a des feuilles minces, petites et dentelées de deux à cinq lobes. La variété M5 donne un rendement plus élevé et des feuilles de meilleure qualité que la variété locale traditionnelle.

Afin de déterminer le degré des modifications histochimiques et histopathologiques dues à l'infestation par *Phyllactinia corylea* (Pers) Karst., on a étudié des échantillons de feuilles des deux variétés. Les feuilles saines, moyennement et gravement infestées sont fixées dans du Carnoy B (6 volumes d'alcool éthylique + 3 volumes de chloroforme + 1 volume d'acide acétique) pendant une

heure. Les matériels sont ensuite déshydratés par une série d'alcool éthylique-n-butanol puis inclus dans de la paraffine solide à 58 °C ; des coupes sériées de 7 µm sont ensuite soumises aux examens histochemiques.

Les polysaccharyles non solubles sont mis en évidence selon la méthode de Jensen (1962) par le réactif de Schiff à l'acide périodique, les protéines sont mises en évidence d'après la méthode au bleu de bromophénol-acide mercurique de Mazia et coll. (1953) et les acides nucléiques selon la méthode au bleu de toluidine de Feder et O'Brien (1968).

RESULTATS ET DISCUSSION

Histopathologie :

La feuille de murier se différencie, selon l'axe dorso-ventral, par un chlorenchyme palissadique rectangulaire adjacent à l'épiderme. En dessous du tissu palissadique se trouvent des cellules spongieuses isodiamétriques irrégulières ayant de grands espaces intercellulaires. Le nombre de chloroplastes est plus élevé dans le chlorenchyme palissadique que dans le chlorenchyme spongieux. De petits faisceaux vasculaires sont répartis de manière régulière dans tout le limbe, de part et d'autre de la grande nervure centrale. Les tissus situés près du faisceau vasculaire sont bien différenciés en épiderme externe, cortex, phloème et xylème.

Les modifications histologiques des feuilles infestées par rapport aux feuilles saines sont présentées dans le tableau I. Les tissus des feuilles saines des variétés M5 et locale montrent que la variété M5 a des feuilles plus grandes que la variété locale. La longueur des cellules palissadiques et le diamètre des cellules spongieuses de la variété M5 sont plus importants que ceux de la variété locale. La présence de l'agent pathogène dans la plante montre que les modifications histopathologiques accélèrent la différenciation des tissus de la feuille. Au stade moyen de l'infestation, la feuille présente une hypertrophie des tissus qui entraîne un épaississement de la feuille.

L'épaisseur de la couche palissadique, la longueur des cellules palissadiques et le diamètre des cellules spongieuses sont plus élevés chez la variété locale que chez la variété M5 (Tableau I). L'hypertrophie et l'hyperplasie sont les caractéristiques communes à cette maladie et empêchent la différenciation du mésophylle au stade maximal de l'infestation. La taille des tissus augmente au stade moyen de l'infestation puis diminue progressivement jusqu'au stade maximal. L'hypertrophie et l'hyperplasie pourraient être causées par la production d'acide indol-acétique, comme cela a été observé chez les feuilles de camélia infestées par *Exobasidium camelliae* variété *Gracilites shirai* (Wolf et Wolf, 1952). La présence d'agent pathogène dans les feuilles suggère que le champignon produit une substance translocable qui provoque des altérations structurelles ou induit l'hôte à produire un composé (Stuehling et coll., 1981). Les cellules épidermiques et corticales du limbe situées près du faisceau vasculaire dégénèrent et se nécrosent.

Histochemie :

Les modifications histochemiques diverses des feuilles infestées par rapport aux feuilles saines sont présentées dans les tableaux II, III et IV. La taille des grains d'amidon dans les cellules palissadiques et dans les cellules spongieuses des feuilles saines des deux variétés diminue à mesure que la maladie s'intensifie. La taille des grains d'amidon des cellules palissadiques et des cellules spongieuses au stade maximal de l'infestation chez la variété M5 est respectivement de 2,0 µm et 1,0 µm, tandis que chez la variété locale, de minuscules granules dégénérés se trouvent isolés. Avec l'intensification de la maladie, la dégradation est plus importante chez la variété locale que chez la variété M5 (Tableau II). La perte progressive et totale des grains de polysaccharides du stade moyen au stade fort de l'infestation montre que les polysaccharides synthétisés sont probablement utilisés par l'agent pathogène. Des études antérieures sur la dolique (Krishna Murthy et coll., 1985) et l'arachide (Sindhan et Jaglan, 1987) corroborent ces résultats.

Chez les feuilles saines des deux variétés, les protéoplastes des cellules palissadiques et des cellules spongieuses sont très nombreux. Les modifications causées par l'infestation par rapport aux feuilles saines sont présentées dans le tableau III. La taille des protéoplastes diminue progressivement et on observe une dégénérescence complète au stade maximal de l'infestation chez les deux variétés.

Le contenu en ARN est riche chez les feuilles saines des deux variétés. Les noyaux ont une coloration foncée. Du fait de l'infestation, on observe une légère modification de la taille du noyau chez les deux variétés par rapport aux feuilles saines (Tableau IV). On peut noter un léger changement du contenu en ARN et une dégénérescence totale des protéoplastes. Ceci peut être dû à l'inhibition de la synthèse des protéines par des substances toxiques. Des études antérieures sur le tabac révèlent que les protéines liées à la pathogenèse (PRS) induites durant l'hypersensibilité à l'infestation, entraînent des changements spécifiques du spectre des protéines solubles (Van Loon, 1983). L'absence totale de protéines dans les feuilles atteintes de mildiou pourrait causer une diminution de la taille des vers à soie et un mauvais rendement (Sullia et Padma, 1987). L'action de l'hormone et les toxines doivent faire l'objet d'une étude ultérieure.

INFLUENCE OF KENCHU VIRUS INFECTION IN SOME STRAINS OF SILKWORM, *BOMBYX MORI* L., ON DETERIORATION OF COCOON PARAMETERS

R.N. BHASKAR, R. GOVINDAN, M.C. DEVAIAH & R. MUNIRAJAPPA

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

The -log LD₅₀ value for kenchu virus with Pure Mysore (5.425) and NB7 (5.012) strains of Bombyx mori L. was maximum, revealing their high susceptibility, and the hybrid Pure Mysore × NB4D2 exhibited comparatively less -log LD₅₀ (3.910) and the remaining six hybrids with Pure Mysore as maternal parent remained intermediate in susceptibility. The weight of cocoon, cocoon shell and pupa of the experimented silkworm strains reduced with infection compared to that of healthy individuals.

Keywords : *Bombyx mori*, kenchu virus, LD₅₀, deterioration in cocoon traits.

INTRODUCTION

Kenchu disease of silkworm, *Bombyx mori* L., is a widely prevalent flacherie in Karnataka, India (Shyamala, 1978). It is caused by a non-occluded spherical virus measuring 27 ± 2 nm in diameter (Hadimani and Shyamala, 1983). The virus is known to invade the midgut (Prathima, 1990). However, there are no reports on the affection of kenchu virus infection to the silkworm races. Perusal of the documented literature on kenchu virus of *Bombyx mori* L. revealed no information on the deterioration of quantitative traits concerning cocoon among the various breeds. This all the same appears to be very important as it concerns the extent of loss accrued in cocoon parameters due to kenchu virus infection. As such in the present study, we examined the susceptibility of some strains and hybrids of silkworm to kenchu virus in the laboratory, taking into consideration the values of LD₅₀ and mean weight of cocoon, cocoon shell and pupa and the results are reported in this paper.

MATERIALS AND METHODS

The kenchu virus was purified from experimentally infected silkworms by employing the method adopted by Inoue and Ayuzawa (1972) for infectious flacherie virus of silkworm, as modified by Hadimani (1980). For isolation of the virus, experimentally diseased larvae were homogenized in sterile pestle and mortar containing Sorensen's phosphate buffer (0.07 M, pH 7.2), in a ratio of 1:4 (w/v). The homogenized material was kept at 5 °C for 24 hr. Then it was filtered through sterile Whatman no. 1 filter paper. The filtrate was centrifuged at 3,000 rpm for 10 min. The supernatant was again subjected to centrifugation at 15,000 rpm for 15 min. at low temperature. The resultant supernatant was collected and this formed the stock suspension. The virus stock suspension and its ten-fold dilutions (10^{-1} to 10^{-5}) in Sorensen's phosphate buffer (0.07 M, pH 7.2) were smeared separately and uniformly on to the already surface sterilized mulberry leaves with 75 per cent ethyl alcohol followed by air drying. The mulberry leaves thus contaminated were cut to the size of 12 × 10 cm and fed separately to 50 newly hatched silkworm larvae of Pure Mysore (PM), NB7, PM × NB7, PM × NB18, PM × KA, PM × NB4D2, PM × C. Nichi, NB7 × NB18 and NB7 × KA and

the subsequent feeds were of untreated mulberry leaves. Three replications were maintained. Daily larval mortality was recorded and -log LD₅₀ values were arrived at for all silkworm strains employing the method of Reed and Muench (1938) (Bancroft, 1970). Cocoon, pupal and shell weights of surviving individuals were recorded.

RESULTS AND DISCUSSION

The susceptibility of silkworm strains to kenchu virus based on -log LD₅₀ values is presented in Table I. The data on the deterioration of cocoon parameters due to virus infection are shown in Table II.

Table I. Susceptibility of silkworm strains to kenchu virus.

Tableau I. Sensibilité de certaines souches de vers à soie au virus de kenchu.

Sl. no. <i>N° de série</i>	Silkworm strain <i>Souche de ver à soie</i>	-Log LD ₅₀ <i>-Log DL₅₀</i>
1	PM	5.425*
2	NB ₇	5.012*
3	PM × NB ₇	4.804
4	PM × NB ₁₈	4.235
5	PM × NB ₄ D ₂	3.910
6	PM × KA	4.738
7	PM × C. Nichi	4.224
8	NB ₇ × NB ₁₈	4.684
9	NB ₇ × KA	4.265

* Calculated with extrapolation / *Calculé par déduction.*

Among the silkworm strains experimented, Pure Mysore (5.425) and NB₇ (5.012) exhibited maximum -log LD₅₀ values, indicating their high susceptibility to kenchu virus, while their hybrid Pure Mysore × NB₇ (4.804) resulted in a relatively less value (Table I) thereby it was less susceptible than the parental strains. These results are confirmed by the previous observations of Aruga and Watanabe (1964), according to whom the F₁ silkworm hybrids were resistant to the infection of cytoplasmic polyhedrosis virus compared to the parents and Briesse (1982) who observed the F₁ hybrid of two strains of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella*, to be more resistant than its susceptible parent to the granulosis virus infection. Further, the silkworm hybrids involving the most susceptible breed Pure Mysore as maternal parent and other strains as male parents yielded comparatively less -log LD₅₀ value of 3.910 (Pure Mysore × NB₄D₂) to 4.738 (Pure Mysore × KA) than that of Pure Mysore. The F₁ hybrid Pure Mysore × NB₄D₂ has been adjudged as relatively less susceptible to kenchu virus among the different strains tested. Also, it can be speculated that the male parental strains, except NB₇, used currently appear to be less susceptible to the virus as their hybrids showed less -log LD₅₀ values compared to the maternal parent, Pure Mysore. The observed reduction in -log LD₅₀ values of these hybrids may be attributed to the resistant genes contributed by male

parental strains. The fact that F₁ hybrid is resistant to infection compared to the parents became apparent currently even with NB7 × NB18 and NB7 × KA as their -log LD₅₀ values were less (4.684 and 4.265) than that of NB7 (5.012).

Table II. Effect of kenchu virus infection on the cocoon parameters of silkworm strains.

Tableau II. Effet de l'infestation par le virus de kenchu sur les paramètres du cocon des souches de vers à soie étudiées.

Silkworm strain	Mean cocoon weight (g)		Mean pupal weight (g)		Mean cocoon shell weight (g)	
	Healthy	Infected	Healthy	Infected	Healthy	Infected
	<i>Poids moyen du cocon (g)</i>		<i>Poids moyen de la chrysalide (g)</i>		<i>Poids moyen de la coque (g)</i>	
<i>Souche de ver à soie</i>	<i>Sain</i>	<i>Infesté</i>	<i>Sain</i>	<i>Infesté</i>	<i>Sain</i>	<i>Infesté</i>
PM	0.803*	0.613*	0.607*	0.528*	0.073*	0.055*
NB7	1.520	1.072	1.250	0.882	0.250	0.180
PM × NB7	1.381	1.231	1.102	0.902	0.277	0.161
PM × NB18	1.428	1.227	1.177	1.045	0.243	0.162
PM × NB4D2	1.312	1.187	1.111	1.026	0.185	0.145
PM × KA	1.472	1.212	1.135	0.942	0.283	0.235
PM × C. Nichi	1.128	1.046	0.990	0.906	0.135	0.120
NB7 × NB18	1.449	1.382	1.181	1.095	0.264	0.255
NB7 × KA	1.439	1.231	1.234	0.999	0.200	0.184

* The mean is the overall average of values pertaining to all the viral dilutions for each parameter under each silkworm strain.

* *La moyenne est calculée à partir des valeurs globales moyennes de l'ensemble des dilutions virales pour chaque paramètre de chaque souche de ver à soie.*

It is obvious from Table II that kenchu virus infection caused reduction in weights of cocoon, cocoon shell and pupa compared to uninfected control among all these strains. Nevertheless, the reduction was more conspicuous in the susceptible strains, viz. Pure Mysore and NB7. Reduction in cocoon parameters due to nuclear polyhedrosis virus infection reported previously (Satish and Govindan, 1986) corroborate the present observations. Even, Abul-Nasar *et al.* (1979) also obtained pupae of lighter weight from nuclear polyhedrosis virus infected larvae of *Spodoptera littoralis*.

REFERENCES

- ABUL-NASAR S.E., AMMAR E.D., ADUL-ELAS M. (1979), Effects of nuclear polyhedrosis virus on various developmental stages of the cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.). Zeitschrift fur Angewandte Entomologie, 88, 181-187.
- ARUGA H., WATANABE H. (1964), Resistance to per os infection with cytoplasmic polyhedrosis virus in the silkworm, *Bombyx mori* (Linnaeus). J. Insect Pathol., 6, 387-394.
- BANCROFT H. (1970). Introduction to biostatistics. A Hoeber-Harper international edition, Inc., Tokyo, 198-205.
- BRIESE D.T. (1982), Genetic basis for resistance to a granulosis virus in the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella*. J. Invertebr. Pathol., 28, 121-126.
- HADIMANI A.K. (1980), Studies on the nature of kenchu disease of silkworm, *Bombyx mori* Linnaeus, in Karnataka. M.Sc. (Agri.) thesis submitted to UAS, Bangalore, 153.
- HADIMANI A.K., SHYAMALA M.B. (1983), On the nature of 'kenchu' disease of the silkworm, *Bombyx mori* L., in Karnataka. National Semi. Silk Res. & Dev., Central Silk Board, Bangalore, Abts. 21.
- INOUE H., AYUZAWA C. (1972), Fluorescent antibody study of infectious flacherie of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Invertebr. Pathol., 19, 227-230.
- PRATHIMA R.R. (1990), Site of infection of kenchu virus and racial susceptibility of silkworm, *Bombyx mori* L. M. Sc. (Seri.) thesis, UAS, Bangalore, 104.
- SATISH G., GOVINDAN R. (1986), Effect of nuclear polyhedrosis virus infection during fifth instar in silkworm, *Bombyx mori* L. Sericologia, 26, 195-199.
- SHYAMALA M.B. (1978), Flacherie in Karnataka. All India Symposium on Sericultural Sciences, UAS, Bangalore, 36.

INFLUENCE DU VIRUS DE KENCHU SUR LA DETERIORATION DES PARAMETRES DU COCON CHEZ CERTAINES SOUCHES DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L.

R.N. BHASKAR, R. GOVINDAN, M.C. DEVAIAH & R. MUNIRAJAPPA

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

La valeur de la DL₅₀ pour le virus de kenchu chez les souches Pure Mysore (5,425) et NB7 (5,012) de Bombyx mori est maximum, ce qui démontre leur forte sensibilité ; l'hybride Pure Mysore × NB4D2 présente comparativement une valeur de DL₅₀ plus faible (3,910) et les six autres hybrides, ayant Pure Mysore comme parent maternel, présentent une sensibilité intermédiaire. Le poids du cocon, de la coque soyeuse et de la chrysalide des souches de vers à soie testées est plus faible lorsqu'il y a infestation que chez les individus sains.

INTRODUCTION

La maladie de Kenchu du ver à soie *Bombyx mori* L. est une flacherie largement répandue dans le Karnataka, Inde (Shyamala, 1978). Elle est causée par un virus sphérique non occlus mesurant 27 ± 2 nm de diamètre (Hadimani et Shyamala, 1983). On sait que le virus pénètre dans l'intestin (Prathima, 1990). Cependant, il n'existe aucune étude sur la manière dont l'infestation par le virus de Kenchu affecte les races de vers à soie. La lecture des publications sur le virus de Kenchu de *Bombyx mori* L. ne donne aucune information sur la détérioration des traits quantitatifs concernant le cocon chez les diverses souches. Toutefois, ce sujet semble très important puisque qu'il concerne l'étendue des pertes cumulées dans les paramètres du cocon du fait de l'infestation par le virus de kenchu. Dans la présente étude, nous avons observé en laboratoire la sensibilité de certaines souches et de certains hybrides du ver à soie au virus de kenchu, en tenant compte des valeurs de la DL₅₀ et du poids du cocon, de la coque soyeuse et de la chrysalide. Les résultats sont décrits dans cet article.

MATERIELS ET METHODES

Le virus de kenchu est purifié à partir de vers à soie infestés en laboratoire suivant la méthode d'Inoue et Ayuzawa (1972) pour le virus de la flacherie infectieuse du ver à soie et modifiée par Hadimani (1980). Pour l'isolement du virus, des larves infestées en laboratoire sont broyées avec un pilon stérile dans un mortier contenant le tampon phosphate de Sorensen (0,07 M, pH 7,2) dans un rapport de 1:4 (w/v). Le broyat est conservé à 5 °C pendant 24 heures puis filtré à travers un papier filtre Whatman n° 1. Le filtrat est centrifugé à 3 000 tours/minute pendant 10 minutes. Le surnageant est à nouveau centrifugé à 15 000 tours/minute pendant 15 minutes à basse température. Le surnageant obtenu est prélevé et utilisé comme suspension-mère. La suspension-mère du virus et les dilutions de facteur 10 (10^{-1} à 10^{-5}) dans le tampon phosphate de Sorensen (0,07 M, pH 7,2) sont appliquées séparément et uniformément sur des feuilles de mûrier dont la surface a été préalablement stérilisée avec 75 % d'alcool éthylique puis séchées à l'air. Les feuilles de mûrier ainsi contaminées sont coupées à la dimension de 12 × 10 cm et fournies séparément à 50 larves en sortie d'éclosion de Pure Mysore (PM), NB7, PM × NB7, PM × NB18, PM × KA, PM × NB4D2, PM × C. Nichi, NB7 × NB18 et NB7 × KA ; les larves sont ensuite alimentées avec des feuilles de mûrier non traitées. Trois réplicats sont maintenus. La mortalité larvaire journalière est notée et les valeurs de la DL₅₀ sont calculées

pour toutes les souches de vers à soie selon la méthode de Reed et Muench (1938) (Bancroft, 1970). Les poids du cocon, de la chrysalide et de la coque des individus survivant sont relevés.

RESULTATS ET DISCUSSION

La sensibilité des souches de vers à soie au virus de kenchu, déterminée d'après les valeurs de la DL_{50} , est présentée dans le tableau I. Les données sur la détérioration des paramètres du cocon due à l'infestation virale sont présentées dans le tableau II.

Parmi les souches de vers à soie expérimentées, Pure Mysore (5,425) et NB7 (5,012) présentent les valeurs de DL_{50} maximales, ce qui indique leur forte sensibilité au virus de kenchu, tandis que leur hybride Pure Mysore $\times$ NB7 (4,804) donne une valeur relativement plus faible (Tableau I) et est donc moins sensible que les souches parentales. Ces résultats sont confirmés par les études d'Aruga et Watanabe (1964) qui ont observé que les hybrides F_1 du ver à soie sont plus résistants à l'infestation par le virus de la polyhédrose cytoplasmique que ses parents et par Brise (1982) qui a observé que l'hybride F_1 du papillon de tubercule *Phthorimaea operculella* est plus résistant que ses parents à l'infestation par le virus de la granulose. En outre, les hybrides du ver à soie ayant pour parent maternel la souche Pure Mysore, qui est la plus sensible, et les autres souches comme parent paternel ont une valeur de DL_{50} plus faible que la souche maternelle Pure Mysore. La diminution des valeurs de la DL_{50} observée chez ces hybrides peut être attribuée à des gènes résistants apportés par les souches paternelles. Le fait que l'hybride F_1 soit plus résistant à l'infestation que les parents apparaît même avec NB7 $\times$ NB18 et NB7 $\times$ KA, car leurs valeurs de DL_{50} sont plus faibles (4,684 et 4,265) que celles de NB7 (5,012).

Le tableau II montre clairement que l'infestation par le virus de kenchu cause une diminution des poids du cocon, de la coque soyeuse et de la chrysalide par rapport aux témoins sains chez toutes ces souches. Néanmoins, la réduction est plus évidente chez les souches sensibles, Pure Mysore et NB7. La réduction des paramètres du cocon causée par l'infestation par le virus de la polyhédrose nucléaire observée précédemment (Satish et Govindan, 1986) corrobore les observations présentées ici. De même, Abul-Nasar et coll. (1979) ont également obtenu des chrysalides plus légères chez des larves de *Spodoptera littoralis* infestées par le virus de la polyhédrose nucléaire.

SCREENING OF SOME MULBERRY VARIETIES AGAINST PHLOEOSPORA LEAF SPOT DISEASE OF MULBERRY UNDER KASHMIR CONDITIONS

N.A. MUNSHI, M.A. ZARGAR, T.N. TANKI & A.H. LONE*

Division of Sericulture, SK University of Agricultural Sciences and Technology, Mirgund,
Post Bag no. 23, GPO Srinagar - 190 001, Kashmir, India.

*The degree of tolerance/susceptibility shown by different mulberry varieties towards leaf spot disease caused by *Phloeospora maculans* (Bereng) Allesch, was studied in Kashmir valley in the year 1986. None of the varieties indigenous as well as exotic was found to be completely resistant to the disease, though there was a difference in the degree of intensity of the disease. However, the least PDI (per cent disease intensity) was observed in varieties, namely Ichinose, Obawase and Francee, whereas the maximum susceptibility was observed in the varieties, Shimanuchi, Zugtul and Serpentine.*

Keywords : degree of tolerance, mulberry varieties, leaf spot.

INTRODUCTION

In Kashmir valley a number of improved cultivars of mulberry have been introduced mainly from Japan and Italy ; they are the mainstay of silkworm rearing at present. In addition, a number of varieties of indigenous mulberry is occurring in wild as well as cultivated farms throughout the valley.

Leaf spot disease caused by *Phloeospora maculans* (Bereng) Allesch, first reported from India by Munshi *et al.*, has been observed to be the most common disease of mulberry in the valley of Kashmir. The disease reduced the leaf yield (Munshi *et al.*, 1987) and also adversely affected the rearing quality of the leaves. The disease occurs at its high intensity during the months of June to October. The present study was carried out to screen the mulberry varieties which show maximum tolerance/susceptibility towards this disease in Kashmir.

MATERIALS AND METHODS

The varietal resistance test was conducted under natural infection in field conditions during the peak season of the disease for the years 1986, 1987 and 1988. The varietal resistance was also conducted by artificial inoculation in field conditions. Under natural infection in field conditions ten dwarf plants of the same age group (ten, eleven and twelve years old, respectively) were randomly selected from each variety for recording the disease intensity and, in all, 26 varieties were selected, which include Ichinose, Obawase, Francee, KNG, Enshutakasuke, Chinese White, Sakasukwa, Senmatsu, Chatatul, Goshierami, Kairyerose, Tomieiso, Kasuga, Rokukuyoso, Kokuso 21, Kokuso 20, Kokuso 27, Robeshsernal, Muki, Takewase, Limoncina, Botetul, Ichihci, Serpentine, Zugtul and Shimanuchi. All these varieties are maintained in the mulberry farm of the Basic Seed Station of Jammu and Kashmir Government, Mirgund, Baramulla. From each plant leaves of all the branches

* Asst. Professor of Statistics, SKUAST, Shalimar, Kashmir, India.

were observed for the intensity of the disease. The leaves were grouped into the following six grades on the basis of the number of spots (Croxall *et al.*, 1952) (Fig. 1, photographs taken after leaves have been dechlorinated).

- 0 : No infection
- 1 : 1-5 spots
- 2 : 6-10 spots
- 3 : 11-15 spots
- 4 : 16-20 spots
- 5 : 21-collission

The percentage disease intensity (PDI) was calculated according to the formula (FAO, 1957).

$$\text{PDI} = \frac{\Sigma \text{Numerical values} \times \text{grades}}{\text{Total number of observations}} \times \frac{100}{\text{Maximum value}}$$

The varietal resistance test by artificial inoculation under field conditions was carried out by the method recommended by Kiraly *et al.* (1974). Five plants from each of the 26 varieties mentioned above were randomly selected and inoculated by spraying and rubbing spore suspension and later covered by polythene sheets during the night to induce spore germination and infection. The observations were made as per the method applied in varietal resistance test under natural infection in field conditions.

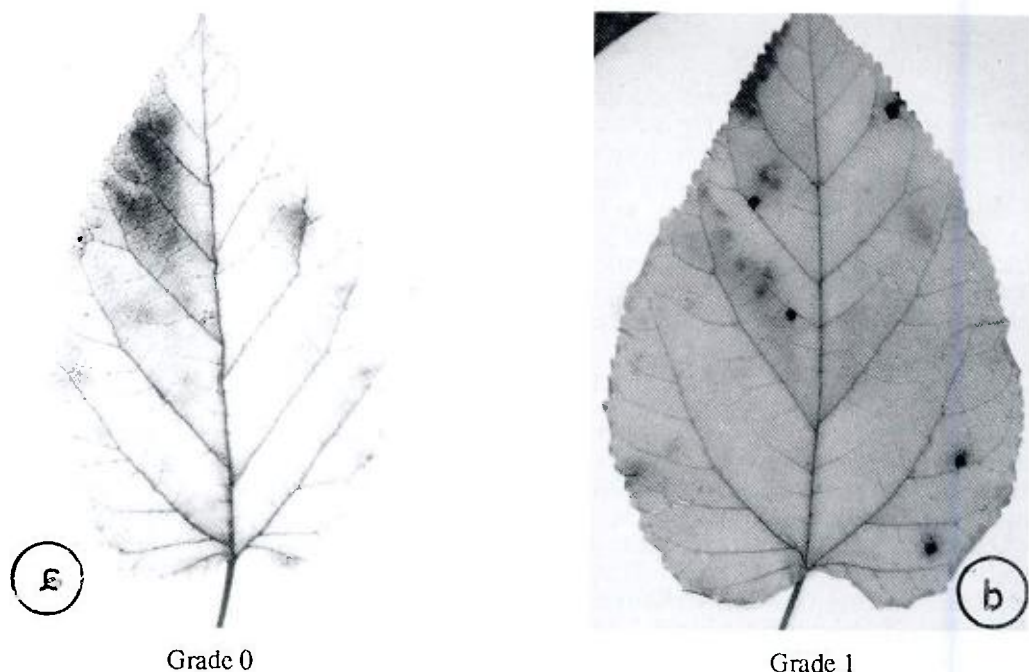
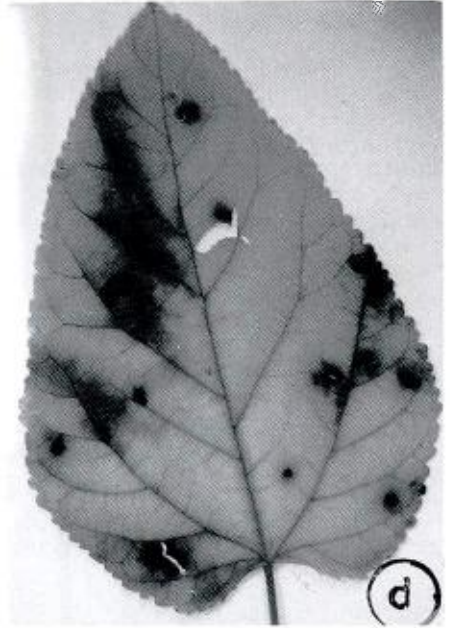


Fig. 1 : Dechlorinated leaves.

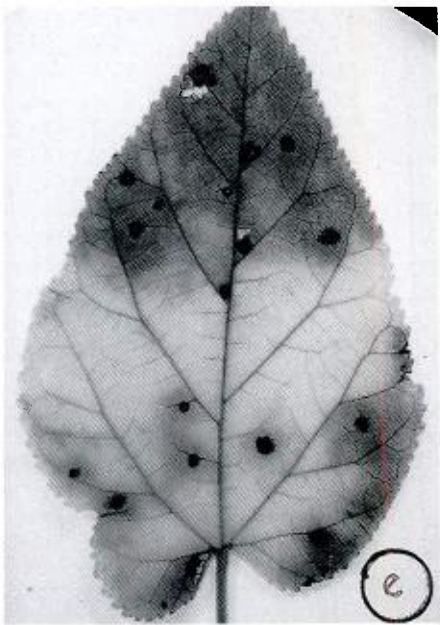
Fig. 1 : Feuilles déchlorinées.



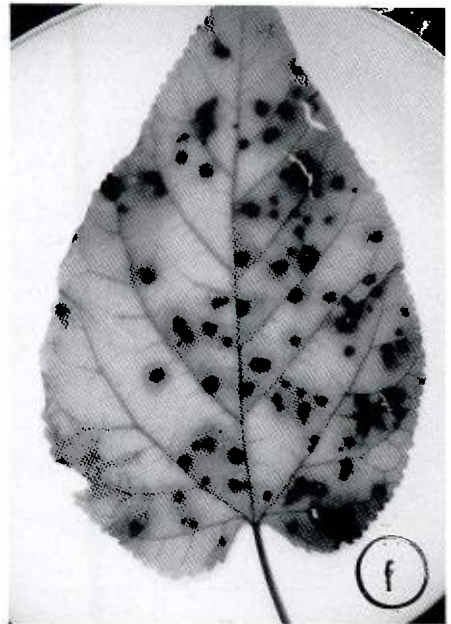
Grade 2



Grade 3



Grade 4



Grade 5

Fig. 1 (Continued) / Fig. 1 (Suite).

Table I. Mean per cent disease intensity of leaf spot disease caused by *Phloeospora maculans* on different varieties of mulberry.

Tableau I. Pourcentage moyen d'intensité de la maladie de la tache provoquée par *Phloeospora maculans* chez différentes variétés de mûriers.

Sl. no.	Variety	Mean PDI			
		1986	1987	1988	inoculated
N° de série	Variété	Intensité moyenne de la maladie			
		1986	1987	1988	par inoculation
1	Ichinose	2.35 (8.56)	8.28 (16.22)	6.49 (14.45)	16.08 (23.60)
2	Obasawe	3.35 (10.18)	16.87 (24.16)	7.88 (16.04)	29.44 (32.82)
3	Francee	3.43 (10.20)	19.68 (26.32)	8.65 (17.0)	23.60 (29.03)
4	KNG	6.85 (14.26)	19.65 (26.12)	28.95 (32.35)	39.3 (38.65)
5	Enshutakasuke	6.78 (14.34)	14.97 (22.48)	9.75 (18.08)	22.35 (28.19)
6	Chinese White	9.58 (17.85)	18.70 (25.57)	14.08 (22.01)	26.7 (31.07)
7	Sakasukwa	16.43 (20.8)	19.60 (26.15)	38.01 (31.85)	31.93 (33.97)
8	Senmetsu	13.35 (20.9)	20.01 (26.17)	15.46 (22.97)	34.58 (35.98)
9	Chatatul	15.23 (22.14)	27.21 (31.35)	19.31 (25.21)	39.24 (38.76)
10	Goshoerami	17.99 (22.53)	31.99 (34.40)	39.87 (38.48)	47.32 (43.43)
11	Kairyoroso	16.55 (23.56)	17.53 (24.63)	27.33 (31.32)	35.88 (36.68)
12	Tomieiso	19.15 (24.96)	40.60 (39.51)	27.66 (31.60)	58.42 (49.86)
13	Kasuga	20.52 (26.48)	32.92 (34.98)	31.16 (33.79)	48.41 (44.08)
14	Rokokuyoso	20.90 (27.17)	25.62 (30.37)	22.95 (28.23)	45.27 (42.27)
15	Kokuso 21	27.81 (31.6)	44.08 (41.60)	29.46 (32.68)	47.82 (43.75)
16	Kokuso 20	31.84 (34.3)	40.86 (39.69)	32.62 (34.80)	51.49 (45.84)
17	Kokuso 27	35.75 (36.56)	25.75 (30.17)	48.18 (43.95)	54.74 (47.74)
18	Robesh Sernal	29.93 (36.6)	34.26 (35.69)	35.58 (36.54)	50.77 (45.45)
19	Muki	35.67 (36.64)	35.20 (36.35)	38.01 (37.92)	53.17 (46.84)
20	Takesawe	44.70 (41.94)	42.46 (40.65)	45.28 (42.26)	59.59 (50.77)
21	Limoncina	51.38 (45.78)	66.95 (55.02)	49.92 (44.96)	73.70 (59.18)
22	Botetul	54.13 (47.32)	47.85 (43.64)	42.93 (40.19)	63.42 (50.86)
23	Ichihai	57.48 (49.4)	54.08 (47.36)	38.53 (38.26)	17.82 (57.52)
24	Serpentine	75.01 (60.52)	83.99 (66.68)	79.11 (62.82)	93.2 (75.0)
25	Zugtul	80.36 (63.92)	65.99 (54.34)	50.75 (53.23)	75.55 (60.37)
26	Shimanuchi	83.36 (66.18)	87.62 (69.17)	67.81 (56.39)	94.78 (76.85)
CD 5 %		(8.77)	(4.86)	(11.01)	(7.05)
CD 1 %		(11.75)	(6.51)	(14.75)	(9.41)

The figures in parentheses indicate angular transformation / Les valeurs entre parenthèses indiquent les transformées angulaires.

RESULTS AND DISCUSSION

The analysis of the results revealed highly significant differences in the severity of the disease amongst these twenty-six varieties both under natural and artificially inoculated conditions and the Bartlett's test of homogeneity of variance (Gomez and Gomez, 1984) shows that the three year data under natural infection in field conditions are homogenous. It is evident from Table I that the variety Ichinose exhibited minimum and the variety Shemanuchi maximum disease intensity. However, two groups of varieties could be identified on the basis of the amount of the disease. One consists of less susceptible varieties like Ichinose, Obawase, Francee, KNG, Enshutakasuke, Chinese White, Sakasukwa, Senmetsu, Chatatul, Goshoeami, Kairyoroso, Tomieiso, Kasuga, Rokokuyoso, Kokuso 21, Kokuso 20, Kokuso 27, Robeshsernal and Muki, and the other comprising highly susceptible ones such as Takewase, Limoncina, Botetul, Ichihei, Serpentine, Zugtul and Shemanuchi.

Thus it is clear from the present study that although all the varieties studied are susceptible to the disease yet Ichinose, Obawase and Francee showed resistant reaction to the disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are highly thankful to Prof. A. Ahmad, Vice Chancellor, Sher-e-Kashmir University of Agricultural Sciences and Technology, for his constant encouragement, to Dr A. Rashid Trag, Senior Scientist, Division of Sericulture, and to Mr Mohd Rafiq, Deputy Director, Sericulture Development Department, J & K Government, for providing the facilities during the present study.

REFERENCES

- CROXALL H.E., GWYNE D.C., JENKINS J.E.E. (1952), The rapid assessment of apple Scab on leaves. *Pl. Path.*, 1, 39-41.
- FAO (1967), FAO Symposium on crop losses. Rome, 2-4th October 1967.
- GOMEZ K.A., GOMEZ A.A. (1984), Statistical procedures for agricultural research. Eds. John Wiley & Sons, Wiley Intersciences Publication, New York.
- MUNSHI N.A., TANKI T.N., ZARGAR M.A., DAS B.C. (1986), New leaf spot disease of mulberry. *Science and Culture*, 52, 238-239.
- MUNSHI N.A., TANKI T.N., ZARGAR M.A., DAS B.C. (1987), Field evaluation of fungicides against leaf spot disease of mulberry in Kashmir. *Indian J. Seric.*, 28(3), 86-89.
- KIRALY Z., KLEMENT Z., SOLYMOSY F., VOROS J. (1974), Methods in plant pathology. Eds. Kiraly Z., Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.

SELECTION DE CERTAINES VARIETES DE MURIER RESISTANTES A LA MALADIE DE LA TACHE PHLOEOSPORA DANS LES CONDITIONS DU CACHEMIRE

N.A. MUNSHI, M.A. ZARGAR, T.N. TANKI & A.H. LONE

Division of Sericulture, SK University of Agricultural Sciences and Technology, Mirgund,
Post Bag no. 23, GPO Srinagar - 190 001, Kashmir, Inde.

*On a étudié le degré de tolérance/sensibilité présenté par différentes variétés de mûrier à la maladie de la tache causée par *Phloespora maculans* (Bereng) Allesch dans la vallée du Cachemire au cours de l'année 1986. Aucune des variétés, qu'elle soit indigène ou exotique, n'est complètement résistante à la maladie, bien qu'il y ait une différence de degré. Les variétés Ichinose, Obasawe et Francee présentent le degré de sensibilité à la maladie le plus faible, tandis qu'on observe une sensibilité maximale chez les variétés Shimanuchi, Zugtul et Serpentine.*

INTRODUCTION

Un certain nombre de cultivars améliorés, principalement du Japon et d'Italie, ont été introduits dans la vallée du Cachemire ; ils constituent à l'heure actuelle l'élément moteur de l'élevage des vers à soie. En outre, on trouve également dans toute la vallée du Cachemire plusieurs variétés de mûriers indigènes tant à l'état sauvage que dans les plantations.

La maladie de la tache causée par *Phloespora maculans* (Bereng) Allesch, observée pour la première fois en Inde par Munshi et coll., est la maladie du mûrier la plus commune dans la vallée du Cachemire. Cette maladie diminue le rendement en feuilles (Munshi et coll., 1987) et a également des effets négatifs sur l'élevage des vers à soie. Elle atteint son intensité maximale entre les mois de juin et d'octobre. La présente étude a été entreprise afin de sélectionner les variétés de mûrier qui présentent le degré maximal de tolérance/sensibilité à cette maladie dans l'Etat du Cachemire.

MATERIELS ET METHODES

Le test de résistance variétale a été réalisé sur le terrain, dans des conditions naturelles d'infestation, pendant la saison d'infestation maximale au cours des années 1986, 1987 et 1988. Le test de résistance variétale a également été conduit par inoculation artificielle sur le terrain. Pour l'étude de l'infestation naturelle, 10 plants nains d'un même groupe d'âge (respectivement, 10, 11 et 12 ans) ont été prélevés au hasard pour chaque variété afin d'enregistrer l'intensité de la maladie. Vingt-six variétés au total ont été sélectionnées : Ichinose, Obawase, Francee, KNG, Enshutakasuke, Chinese White, Sakasukwa, Senmatsu, Chatatul, Goshierami, Kairyerose, Tomieiso, Kasuga, Rokukuyoso, Kokuso 21, Kokuso 20, Kokuso 27, Robeshernal, Muki, Takewase, Limoncina, Botetul, Ichihei, Serpentine, Zugtul et Shimanuchi. Toutes ces variétés proviennent de la mûraie de la Basic Seed Station du Gouvernement de Jammu et Cachemire, Mirgund, Baramulla. Pour chaque plant, des feuilles prélevées sur toutes les branches ont été examinées pour étudier l'intensité de la maladie. Les feuilles sont regroupées selon les six degrés suivants, en fonction du nombre de taches (Croxall et coll., 1952) (Fig. 1, clichés des feuilles après déchlorination).

- 0 : Sans infestation
- 1 : 1 à 5 taches
- 2 : 6 à 10 taches
- 3 : 11 à 15 taches
- 4 : 16 à 20 taches
- 5 : 21 taches à recouvrement total

Le pourcentage d'intensité de la maladie (PDI) est calculé selon la formule suivante (FAO, 1957) :

$$PDI = \frac{\Sigma \text{ Valeurs numériques} \times \text{degré}}{\text{Nombre total d'observations}} \times \frac{100}{\text{Valeur maximale}}$$

Le test de résistance variétale par inoculation artificielle sur le terrain a été conduit selon la méthode recommandée par Kiraly et coll. (1974). Cinq plants de chacune des 26 variétés mentionnées ci-dessus ont été sélectionnés au hasard et infestés par vaporisation et application de la suspension de spores, ils ont été ensuite recouverts de feuilles en polyéthylène pendant une nuit pour induire la germination des spores et l'infestation. Les observations sont faites selon la méthode utilisée dans le test de résistance variétale dans des conditions d'infestation naturelle sur le terrain.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'analyse des résultats révèle des différences significatives au niveau de la gravité de la maladie entre ces 26 variétés, aussi bien dans des conditions d'inoculation naturelle qu'artificielle. Le test de Bartlett's d'homogénéité de la variance (Gomez et Gomez, 1984) montre que les données obtenues pour les conditions d'infestation naturelle sur trois ans sont homogènes. Il est évident, à la lecture du tableau I, que la variété Ichinose présente l'intensité de maladie la plus faible et la variété Shemanuchi l'intensité la plus forte. Cependant, deux groupes de variétés peuvent être identifiés sur la base du degré de maladie ; l'un se compose des variétés les moins sensibles, à savoir : Ichinose, Obasawase, Francee, KNG, Enshutakasuke, Chinese White, Sakasukwa, Senmetsu, Chatatul, Goshorami, Kairyoroso, Tomieiso, Kasuga, Rokokuyoso, Kokuso 21, Kokuso 20, Kokuso 27, Robeshsernal et Muki, et l'autre comprend les variétés les plus sensibles : Takewase, Limoncina, Botetul, Ichihei, Serpentine, Zugtul et Shemanuchi.

La présente étude montre donc clairement que, bien que toutes les variétés étudiées soient sensibles à la maladie, Ichinose, Obasawase et Francee présentent une résistance à la maladie.

DYEING SILK WITH VEGETABLE DYES. II. MULBERRY PLANT EXTRACTS

M.K. VIJAYEENDRA, B.R. DAYAKAR YADAV & V.V. HADIMANI

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

*In the present studies, mulberry (*Morus alba* L.) root and fruit extracts have been employed for dyeing silk, using different mordants like copper sulphate, alum, ferrous sulphate, potassium dichromate and stannous chloride. The silk could take brighter and darker shades, i.e. brown shade with roots and purple to reddish violet shades with fruits, whereas cotton did not have any affinity for these dyes. Fastness properties of the dyed materials were tested and silk was found to have good fastness to washing, perspiration and a fair degree of fastness to light.*

Keywords : vegetable dyes, mulberry plant extract, mordanting, fastness test, silk dyeing.

INTRODUCTION

The earliest authentic records concerning silk dyeing was by Chinese and date back to 2600 b.c. (Phadke, 1947). In India, the use of vegetable dyes is more in vogue especially in rural folks, in home industries, handicraft work, kalamkari art printing, impregnating on human skin, etc.

So far, no reports are available on the use of mulberry plant extracts to dye silk. Therefore, some trials were carried out using mulberry root and fruit extracts for dyeing of silk with a prior mordanting. The dyed materials were subjected to various fastness tests.

MATERIALS AND METHODS

In dyeing silk with root and fruit extracts, two stages are involved : first, the mordanting and the other is colouring or the actual dyeing. The mordants used were : alum, copper sulphate, ferrous sulphate, potassium dichromate and stannous chloride. Simultaneously, both cotton and silk materials were dyed with the mulberry extracts. The method employed is as follows :

a. Silk fabric :

The fabrics previously degummed with soap-soda (using 5 g of soap and 5 g of soda per litre, boiled for a period of 90 minutes) were used in the experiments. The material to liquor ratio is 1:30.

b. Mordanting :

Silk fabrics were wetted and then treated with mordant solutions (2 % o.w.f.) for a period of 30 minutes in lukewarm condition.

c. Mulberry plant (dye) extract :

i. Mulberry roots :

The tender portions and parts with soft cortex tissue are ideal for extracting the colouring matter. The roots were cut to 3-5 cm length and washed in running water to remove the soil particles adhering to the roots. These cut roots were boiled with little amount of water for a period of 15-20 minutes. At

the end, the solution was filtered to get a clear dye extract. It was found that dye solution had a pH of 4.

ii. Mulberry fruits :

The ripened fruits collected from mulberry plants were squashed gently to get the required solution for dyeing. This solution had a pH of 2.5.

d. Dyeing :

Previously mordanted silk fabrics were treated with the mulberry root extracts at a temperature of 60-70 °C for about 1-1.5 hours.

Dyeing of silk with fruit extract was carried out using hot and cold methods. In hot method, mordanted silk was treated with the fruit extract at a temperature of 60-70 °C for about 1-1.5 hours. While in the cold dye method, the mordanted silk was kept immersed in the fruit extract overnight at room temperature. The shades obtained in all the cases were about 1 %. The above dyed fabric samples were scrooped using acetic acid.

e. Testing of dyed silk :

The dyed silk fabrics were tested for washing and perspiration fastness following ISO standards. For assessing the light fastness (Mathew, 1947) the dyed fabrics were exposed to sunlight for 1-4 weeks from sunrise to sunset. The samples (about 7.6 cm length × 1 cm width) were arranged on an exposure board, placed in such a manner that one half of the sample was exposed to light while the other half was protected. The exposure board was kept at an angle of 45° facing south in order to obtain as much sunlight as possible.

The degree of fastness to light may be classified numerically as :

I : not faded in 4 weeks' exposure ;

II : not faded in one week's exposure ;

III : faded in one week's exposure.

RESULTS AND DISCUSSION

The colours obtained with different mordants were different. The cotton fabric failed to take any of the dyes with all the mordants thus showing no affinity towards the extracts of mulberry plants. The mulberry root extract dyed a brownish or catachy colour whereas the fruit extract dyed purple to reddish shades on silk fabrics. With the amount of extract used in dyeing the shades obtained were lighter (about 1 %). In order to obtain darker shades it becomes necessary to increase the concentrations of the extracts in the dyeing bath. Further, it was noticed that dyeing done under cold conditions gave a darker shade when compared to the hot dyeing method for mulberry fruit extract.

The dyed silk was subjected to washing, perspiration and light fastness tests. The washing fastness of silk dyed with root extract (Table I) showed no colour change and fading after washing.

Of the five mordants used, copper sulphate gave more satisfactory fastness to washing. While in the other mordants, staining on cotton and silk was not at all observed, however, change in colour had a rating of medium and above medium.

In the case of the mulberry fruit extract (Table II), the shade obtained in the case of stannous chloride was violet, while with other mordants the colour was in the range of steel gray. Overall observations showed that there was no considerable difference in the fastness properties with hot and cold dyed fabrics, except in the case of stannous chloride mordant. In general, the washing fastness rating is excellent in almost all the cases.

Table I. Showing the hot dyeing of silk with mulberry root extract and its effect on washing fastness.*

Tableau I. Teinture à chaud de la soie avec un extrait de racines de mûrier et effet sur la solidité au lavage.*

Mordant	Staining		Change in colour (fading)
	Cotton	Silk	
Mordant	Teinture sur		Altération de la couleur (dé lavage)
	Coton	Soie	
Copper sulphate / Sulfate de cuivre	5	4-5	5**
Alum / Alun	5	5	3
Tin chloride / Chlorure de fer	5	5	3
Ferrous sulphate / Sulfate ferreux	5	5	3-4
Potassium dichromate / Bichromate de potassium	5	5	5

* As per ISO standards / Conformément aux normes ISO.

** Change in tint to brownish / Le ton vire au marron.

Table II. Showing the cold and hot dyeing of silk with mulberry fruit extract and its effect on washing fastness.*

Tableau II. Teinture à froid et à chaud de la soie avec un extrait de fruits de mûrier et effet sur la solidité au lavage.*

Mordant	Cold dyeing / Teinture à froid			Hot dyeing / Teinture à chaud		
	Staining on		Change in colour	Staining on		Change in colour
	Cotton	Silk		Cotton	Silk	
Mordant	Teinture sur		Altération de la couleur	Teinture sur		Altération de la couleur
	Coton	Soie		Coton	Soie	
Copper sulphate / Sulfate de cuivre	5	4-5	5	5	4-5	5
Alum / Alun	5	4-5	5	5	5	5
Tin chloride / Chlorure de fer	5	4-5	1	5	4-5	3
Ferrous sulphate / Sulfate ferreux	5	5	5	5	4-5	3
Potassium dichromate	5	4-5	5	5	5	5
Bichromate de potassium						

* As per ISO standards / Conformément aux normes ISO.

Table III. Showing the dyeing of silk with mulberry root and fruit extracts, and its effect on perspiration fastness.

Tableau III. Teinture de la soie avec des extraits de racines et de fruits de mûrier et effet sur la résistance à la transpiration.

Mordant	Mulberry root extract <i>Extrait de racine de mûrier</i>						Mulberry fruit extract <i>Extrait de fruit de mûrier</i>											
	Acid / <i>Acide</i>			Alkaline / <i>Alcalin</i>			Hot / <i>A chaud</i>			Cold / <i>A froid</i>								
	Change in colour	Stain on		Change in colour	Stain on		Acid			Alkali			Acid			Alkali		
		Cotton	Silk		Cotton	Silk	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>Mordant</i>	<i>Altération de la couleur</i>	<i>Teinture sur</i>		<i>Altération de la couleur</i>	<i>Teinture sur</i>		<i>Acide</i>			<i>Alcalin</i>			<i>Acide</i>			<i>Alcalin</i>		
		<i>Coton</i>	<i>Soie</i>		<i>Coton</i>	<i>Soie</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
Copper sulphate <i>Sulfate de cuivre</i>	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Alum <i>Alun</i>	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4-5	5	5	5	5	5
Stannous chloride <i>Chlorure stanneux</i>	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4-5	5	5
Ferrous sulphate <i>Sulfate ferreux</i>	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Potassium dichromate <i>Bichromate de potassium</i>	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

1. Shades after treatment are darker in alkali treated samples as compared to acid treated.

2. Alkali shades are less dark compared to acid treatment.

1. Les teintes après traitement sont plus foncées chez les échantillons traités à l'alcali que chez les lots traités à l'acide.

2. Les teintes obtenues à l'alcali sont moins foncées que les teintes obtenues par traitement à l'acide.

As shown in Table III, the fastness to perspiration, both in alkaline and acidic conditions, was found to be very good for the fabrics treated with all the mordants. After perspiration test the shades were slightly darker under alkaline conditions. In fastness to light test it is observed that the fabrics dyed with the fruit extract are not fast to light (Grade 3), with the exception of the sample dyed using ferrous sulphate and potassium dichromate as mordants, with a fair degree of fastness (Grade 2-3). But the materials dyed with root extract are fast to light (Grade 1), which is true for all the mordants.

CONCLUSIONS

From the above experimental results, it is evident that the mulberry roots and fruits can be used to dye silk. The raw materials for extracting the dye is in plenty and easily available throughout the year, and the extraction process is simple and non-hazardous to the dyer and the silk.

At present, only dyeing aspects have been studied. Further in-depth work has to be carried out regarding the chemical constitution of the colouring matter and also the economics of dyeing silk with extracts of mulberry.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are thankful to the Director, Karnataka State Sericulture Development Institute, for having permitted them to publish this article.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1982), ISI. Handbook of textile testing. Indian Standar Institution, Publ., New Delhi.
MATHEWS J.M. (1947), Application of dye stuffs. Publ. John Wiley and Sons, Inc., New York, pp. 768.
PHADKE B.N. (1947), History of dyes and dyeing in the Bombay presidency. pp. 131. Textile Dyer and Printer, 21(15), 39.

TEINTURE DE LA SOIE AVEC DES EXTRAITS VEGETAUX. II - EXTRAITS DE MURIER

M.K. VIJAYEENDRA, B.R. DAYAKAR YADAV & V.V. HADIMANI

Karnataka State Sericulture Development Insitute, Thalaghattapura, Bangalorc - 560 062, Inde.

*Dans cette étude, on a employé des extraits de racines et de fruits de mûrier (*Morus alba* L.) pour teindre la soie en utilisant différents mordants comme le sulfate de cuivre, l'alun, le sulfate de fer, le bichromate de potassium et le chlorure stanneux. On a pu obtenir des teintes plus claires ou plus foncées de soie : une teinte marron avec les racines et des teintes pourpre à rougeâtre avec les fruits, alors que le coton ne présente aucune affinité pour ces teintures. Les propriétés de solidité des tissus teints ont été testées et on a observé que la soie possède une bonne solidité au lavage, à la transpiration et un assez bon degré de solidité à la lumière.*

INTRODUCTION

Les plus anciens écrits authentiques concernant la teinture de la soie viennent de Chine et remontent à 2600 avant J.C. (Phadke, 1947). En Inde, l'utilisation de teintures végétales est plus commune particulièrement chez les populations rurales, dans les exploitations familiales, l'artisanat, les peintures Kalamkari, les tatouages, etc.

Aucune étude n'a encore été faite sur l'utilisation des extraits de mûrier pour la teinture de la soie. Des tests ont donc été conduits sur l'utilisation des extraits de racines et de fruits de mûrier pour teindre la soie préalablement mordancée. Les matériaux teints ont ensuite été soumis à divers tests de solidité.

MATERIELS ET METHODES

La teinture de la soie avec des extraits de racines et de fruits se fait en deux étapes : premièrement le mordantage, puis la coloration ou la teinture proprement dite. Les mordants utilisés sont : l'alun, le sulfate de cuivre, le sulfate ferreux, le bichromate de potassium et le chlorure stanneux. Des tissus de coton et de soie sont teints simultanément avec les extraits de mûrier. La méthode employée est la suivante :

a) Tissus de soie :

Des tissus de soie préalablement décreusés avec du savon et du soda (5 g de savon et 5 g de soda par litre, bouillis pendant 90 minutes) ont servi pour cette expérience. Le rapport matériel sur liquide est de 1:30.

b) Mordantage :

Les tissus de soie sont mouillés, puis traités avec les solutions de mordantage (2 % du poids de la fibre) pendant 30 minutes à température tiède.

c) Extrait de mûrier (teinture) :

1. Racines de mûrier :

Les zones tendres et les parties contenant un cortex souple sont idéales pour l'extraction du colorant. Les racines sont coupées en morceaux de 3 à 5 cm et lavées à l'eau courante afin d'enlever les particules de terre adhérant aux racines. Ces racines sectionnées sont bouillies avec un peu d'eau pendant 15 à 20 minutes. La solution est ensuite filtrée pour obtenir un extrait de teinture propre. On a observé que la solution de teinture a un pH de 4.

2. Fruits de mûriers :

Les fruits mûrs prélevés sur les mûriers sont écrasés afin d'obtenir la solution requise pour la teinture. Cette solution a un pH de 2,5.

d) Teinture :

Des tissus de soie préalablement mordancés sont traités avec les extraits de racines de mûrier à une température de 60 à 70 °C pendant 1 à 1,5 heure.

La teinture de soie avec les extraits de fruits se fait à chaud et à froid. A chaud, la soie mordancée est traitée avec l'extrait de fruit à une température de 60 à 70 °C pendant environ 1 à 1,5 heure. A froid, la soie mordancée est immergée dans l'extrait de fruit pendant une nuit à température ambiante. Les teintes obtenues dans tous les cas sont d'environ 1 %. Les échantillons de tissus teints décrits ci-dessus sont frottés avec de l'acide acétique.

e) Tests de la soie teinte :

On a testé la solidité au lavage et à la transpiration des tissus de soie teints suivant les normes ISO. Pour évaluer la résistance à la lumière (Mathew, 1947), les tissus de soie sont exposés aux rayons du soleil pendant 1 à 4 semaines du lever au coucher du soleil. Les échantillons (d'environ 7,6 cm de longueur × 1 cm de largeur) sont placés sur une planche d'exposition de façon à ce qu'une moitié de l'échantillon soit exposée à la lumière, tandis que l'autre moitié est à l'ombre. La planche d'exposition est maintenue à un angle de 45° face au sud afin d'obtenir un ensoleillement maximal.

Le degré de solidité à la lumière peut être classé par ordre numérique de la façon suivante :

I : aucune décoloration après 4 semaines d'exposition ;

II : aucune décoloration après 1 semaine d'exposition ;

III : décoloration après une semaine d'exposition.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les couleurs obtenues sont différentes suivant les mordants. Le tissu de coton n'a pris aucune des teintures, quel que soit le mordant, et ne présente donc aucune affinité avec les extraits de mûrier. L'extrait de racine de mûrier permet d'obtenir une teinte marron ou noir cachou tandis que l'extrait de fruit donne une teinte pourpre à rougeâtre sur les tissus de soie. Avec les quantités d'extrait utilisées dans la teinture, les teintes obtenues sont plus claires (environ 1 %). Afin d'obtenir des couleurs foncées, il est nécessaire d'augmenter la concentration des extraits dans le bain de teinture. De plus, on remarque qu'à froid, la teinture à base d'extrait de fruit donne une teinte plus foncée qu'à chaud.

La soie teinte a été soumise aux tests de solidité au lavage, à la transpiration et à la lumière. Pour le test de la solidité au lavage, la soie teinte avec l'extrait de racine (tableau I) conserve la même couleur après le lavage.

Des cinq mordants utilisés, le sulfate de cuivre donne la meilleure solidité au lavage. Pour tous les autres mordants, on n'observe aucune coloration sur la soie ou le coton, cependant on note un degré de changement de la couleur de moyen à supérieur.

Dans le cas de l'extrait de fruit de mûrier (tableau II), la teinte obtenue avec le chlorure de fer est le violet, tandis qu'avec les autres mordants la couleur tirait vers le gris-acier. L'ensemble des observations montre qu'il n'y a pas de différence importante des propriétés de solidité entre les tissus traités à chaud et les tissus traités à froid, sauf dans le cas du chlorure stanneux. En général, le taux de solidité au lavage est excellent dans presque tous les cas.

Comme le montre le tableau III, la solidité à la transpiration, aussi bien dans des conditions alcalines qu'acides, s'est révélée très bonne pour les tissus, quel que soit le mordant utilisé. Après le test de la transpiration, les teintes sont légèrement plus foncées dans des conditions alcalines. Dans le test de solidité à la lumière, on observe que les tissus teints avec l'extrait de fruit ne sont pas résistants à la lumière (degré 3), à l'exception de l'échantillon teint en utilisant le sulfate de fer et le bichromate de potassium comme mordants qui donnent un degré moyen de solidité (degré 2 à 3). Cependant, les tissus teints avec de l'extrait de racine sont solides à la lumière (degré 1) quel que soit le mordant.

CONCLUSIONS

Les résultats expérimentaux décrits ci-dessus montrent clairement que les racines et les fruits de mûrier peuvent être utilisés pour teindre la soie. Les matériaux bruts pour extraire le colorant sont abondants et faciles à obtenir tout au long de l'année. Le procédé d'extraction est simple et ne présente aucun danger pour le teinturier ou pour la soie.

A l'heure actuelle, seuls les aspects concernant la teinture ont été étudiés. Des études approfondies devront être menées pour connaître la composition chimique de la matière colorante et étudier l'aspect économique de la teinture de soie avec des extraits de mûrier.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHY

INDICATIFS DES LANGUES UTILISEES

LANGUAGE SYMBOLS USED

(Bg) Bulgare / Bulgarian.

(D) Allemand / German.

(F) Français / French.

(K) Coréen / Korean.

(Pt) Portugais / Portuguese.

(Ro) Roumain / Rumanian.

(C) Chinois / Chinese.

(E) Anglais / English.

(J) Japonais / Japanese.

(Pl) Polonais / Polish.

(R) Russe / Russian

(S) Espagnol / Spanish.

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

The corresponding small letters are used to indicate the language of the summary.

Sériciculture générale

General sericulture

Low-input sericultural technique and the tentative idea about it.

Technique séricicole à faible coût.

CHEN D.

South China Agricultural Unvi., Guangzhou, Dept. of Sericulture, China.

1990 Guangdong Sericultural Newsletter, Vol. 1., 36-41. (C)

Effects of fluoride on crops, livestock and mulberry silkworm.

Effets des fluorures sur les récoltes, le cheptel et le ver à soie.

CHEN S., BIAN Y. M., LIU S.

1990 Huanjing Wuran Yu Fangzi, Vol. 12(2), 10-14. (C)

Occurrence of bacterial disease (flacherie) of silkworm, *Bombyx mori* in Jamu and Kashmir state.

Présence de la maladie bactérienne (flacherie) du ver à soie *Bombyx mori* dans l'Etat du Jamu et du Cachemire.

CHISHTI M. Z., SOHAF K. A., KHAN M. A.

Dept. of Zoology, University of Kashmir, Srinagar 190 006 J. & K.

1991 Indian J. Seric., Vol. 30(1), 54-55. (E)

The desirable measures for efficiency of diversified farming in sericulture by region and type of farming.

Les mesures souhaitables pour l'efficacité des exploitations diversifiées en sériciculture en fonction de la région et du type d'exploitation.

CHOO B. K.

Seoul National Univ., Suwon College of Agriculture, Korea Republic.

1988 The Research Report of the Rural Development, Vol. 31, 461-482. (K)

Les sentiers de la Soie.

The Silk paths.

CUENOT J.

1991 Eds. Joël Cuenot, BP 24, Meudon-Bellevue, 92194 Meudon Cedex. France 107 p. (F)

Non mulberry sericulture : present status and strategy.

Sériciculture non-mûrier : situation actuelle et stratégie.

Central Silk Board

Central Silk Board, Ministry of Textiles, Gov. of India, Bangalore 560 001 India.

1991 C. S. B., Bangalore, India, 1-7. (E)

La sériciculture et l'industrie de la soie au Brésil.

Sericulture and the silk industry in Brazil.

GUYONNET J.

1991 *Mémoire de fin d'études Ecole Sup. d'Agric., Angers, France, 80 p. (F)*

Recent advances in sericulture.

Progrès récents en sériciculture.

HORIE Y.

The Sericultural Experiment Station, Min. of Agric., Suginami-ku, Tokyo, Japan.

1980 *Ann. Rev. Entomol., Vol. 25, 49-71. (E)*

Science and civilisation in China.

Science et civilisation en Chine. (Vol. 9)

KUHN D.

1988 *Cambridge Univ. Press, Vol. 9, 520 p. (E)*

Experiences of new sericultural area establishment in Leizhou, Zhanjiang (China).

Essais de nouvelles implantations sérícolas à Leizhou, Zhanjiang (Chine).

LIN G.

Zhanjiang Municipal Silk Cloth Co., Guangdong, China.

1990 *Guangdong Sericultural Newsletter, Vol. 1, 1-6. (C)*

A report on the distribution of *Bacillus thuringiensis* in sericultural areas of karnataka, india.

Rapport sur la localisation de *Bacillus thuringiensis* dans les zones sérícolas du Karnataka en Inde.

NATARAJU B., BAKAVENKATASUBBAIAH M., BAIG M., SINGH B. D. SENGUPTA K.

Central Sericultural & Training Institute, Mysore 570 008, India.

1991 *Indian J. Seric., Vol. 30(1), 56-58. (E)*

Preliminary studies on economic benefit of fish culture combined with sericulture by growing mulberry trees on fish pond embankment.

Etudes préliminaires sur le bénéfice économique de la pisciculture combinée avec la sériciculture en plantant des mûriers sur les berges des viviers.

SHU H., XU H.

Jiangxi Provincial Society for Seric., Nanchang, China.

1990 *Jiangxi Aquacultural Science & Tech., Vol. 2, 4-10. (C)*

Comprehensive techniques of developing silkworm and mulberry production.

Techniques complètes pour développer la production de mûriers et de vers à soie.

ZHONG Z.

Hubei Provincial Academy of Agricultural Sciences, Inst. of Seric., Wuchang, China

1990 *Hubei Agricultural Sciences, Vol. 3, 34-35. (C)*

Mûrier

Mulberry

A comparative biochemical study of six mulberry (*Morus alba* L.) varieties.

Etude biochimique comparative de six variétés de mûriers. (*Morus alba* L.).

BOSE P. C., MAJUMDER S. K., SENGUPTA K.

Central Seric. Research & Training Institute, Mysore 570 008, India.

1991 *Indian J. Seric.*, Vol. 30(1), 83-87. (E)

Studies on the changes with time of the reserve substances in the hardwood cutting of mulberry varieties.

Etudes sur les variations des substances de réserves dans les boutures des variétés de mûriers.

CHOI Y. C., RYU K. S.

1989 *Han'guk Chamsa Hakhoechi*, Vol. 31(1), 1-11. (C)

Effect of spacing, crown height and method of pruning on mulberry leaf yield, quality and cocoon yield.

Effet de l'espacement, de la hauteur de la couronne et de la méthode de taille des mûriers sur le rendement en feuilles, la qualité et le rendement en cocons.

CHOUDHURY P. C., SHUKLA P., GHOSH A., MALLIKARJUNA B., SENGUPTA K.

Central Sericultural & Training Institute, Mysore 570 008, India.

1991 *Indian J. Seric.*, Vol. 30(1), 46-53. (E,f)

Rheological properties of mulberry gels.

Propriétés rhéologiques des gels de mûrier.

FUKUBA H., KURATA S.

1991 *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, Vol. 38(1), 27-32. (J)

Study on the breeding of triploid hybrid mulberry tree. III. Investigation and analysis of the fruit development of triploid hybridizing combinations.

Etude sur la sélection de mûriers hybrides triploïdes. III. Recherche et analyse sur le développement du fruit dans les combinaisons d'hybrides triploïdes.

GUO Z., WANG S., FU L.

Guangdong Provincial Academy of Agric. Sciences, Guangzhou Inst. of Sericulture, China.

1990 *Guangdong Sericultural Newsletter*, Vol. 1, 16-20. (C)

Biosynthesis of b-sitosterol and the isoprenyl units of the Diels-Alder type adducts in *Morus alba* callus cultures.

Biosynthèse du b-sitosterol et des unités isoprènes de l'adduit de type Diels-Alder dans des cultures de cals de *Morus alba*.

HANO Y., AYUKAWA A., NOMURA T.

1990 *Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu*, Vol. 32, 1-8. (J)

Applicable techniques for rapid multiplication of mulberry tree (*Morus alba*).

Techniques applicables pour la multiplication rapide de mûriers *Morus alba*.

JI D., LIN S., LU Z.

1990 *Bull. of Sericulture (China)*, Vol. 4, 20-22. (C)

Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Broussonetia papyrifera* L. Vent.

Régénération de la plante à partir de protoplastes du mésophylle de *Broussonetia papyrifera* L. Vent.

KATAGIRI K.

1991 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 60(5), 407-409. (J)

A new 2-aryl-benzofuran, w-hydroxymoracin N from mulberry leaves.

Un nouveau 2-aryl-benzofurane, la w-hydroxymoracine N provenant des feuilles de mûriers.

MATSUYAMA S., KUWAMARA Y., SUZUKI T.

1991 *Agr. Biol. Chem.*, Vol. 55, 1409-1410. (E)

Description of thrips larvae which are noteworthy on cultivated plants (Thysanoptera), 2 : *Pseudodendrothrips mori* (Niwa).

Description de larves de thrips que observées sur des plantes cultivées (Thysanoptera), 2 : *Pseudodendrothrips mori* (Niwa).

MIYAZAKI M., KUDO M.

National Inst. of Seric. & Entomol. Science, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1989 *Applied Entomology & Zoology*, Vol. 24(2), 209-212. (E)

Improved procedures for the cryopreservation of mulberry using winter buds.

Procédures améliorées pour la conservation au froid des mûriers sous forme bourgeons d'hiver.

NIINO T., YAKUWA H., NOJIRI K., SAKAI A.

National Institute of Agrobiological Resources, Shinjo, Yamagata 996, Japan.

1991 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 60(5), 394-399. (J,e)

Suspension culture of cells from hypocotyl of mulberry.

Culture de cellules de l'hypocotyle de mûrier en suspension.

OHNISHI T., KOBAYASHI Y.

1991 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 60(4), 320-323. (J)

Effects of refrigeration period of calluses of mulberry varieties which is hard to dormant on their growth after the storage.

Effets de la période de réfrigération des cals des variétés de mûriers à forte dormance sur leur croissance après le stockage.

OHNISHI T., YASUKURA F., KIMURA T.

1991 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 60(5), 400-401. (J)

Study on the parasitic site on mulberry infected by *Pseudomonas solanacearum*.

Etude sur le site parasitique chez le mûrier infecté par *Pseudomonas solanacearum*.

QIU X., HUANG Y.

South China Agricultural Univ., Guangzhou, Department of Agrobiol., China.

1990 *Journal of South China Agric. University*, Vol. 11(1), 85-88. (C)

Studies on the quality of leaf under two pruning systems in mulberry.

Etudes sur la qualité de la feuille de mûrier en fonction de deux systèmes de taille.

RATNA SEN, BENCHAMIN K. V., JOLLY M. S.

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

1991 *Indian J. Seric.*, Vol. 30(1), 17-22. (E,f)

Studies on the cause in freezing resistance of mulberry *Morus alba* L.

Etudes sur la cause de la résistance au froid du mûrier *Morus alba* L.

RYU K. S.

Kyungpook National Univ., Taegu, Korea Rep., College of Agriculture, Korea.

1988 *The Research Report of the Rural Development*, Vol. 31, 389-393. (K)

Induction of browning on the mulberry leaves by irradiation with ultraviolet light and by tightly-closed stress.

Induction d'une coloration marron sur les feuilles de mûrier par la lumière ultraviolette et par le stress.

SHIRATA A.

1991 *Acta Seric. Entomol.*, N5, 27-45. (J)

Distribution of minerals and carbohydrates in mulberry tree in their growth and regrowth phases.

Distribution des minéraux et des hydrates de carbone dans les mûriers au cours des phases de croissances.

SHIRATA K., TAKAGISHI H

1989 *Baiomasu Henkan Keikaku Kenkyu Hokoku*, Vol. 15, 27-37. (J)

The histories of artificial polyploid strains in *Morus* and their agronomic characters (3).

Histoires des souches polyploïdes artificielles chez *Morus* et leurs caractères agronomiques (3).

TOHOKU NATL. AGRIC. EXP. STATION.

1988 *Miscellaneous Public. of the Tohoku Natl. Agric. Exp. Sta.*, Vol. 8, 89-95. (J)

Variations in amounts of carbohydrates, amino acids and adenine nucleotides in mulberry tree (*Morus alba*) stems during transitional phases of growth.

Variations des taux d'hydrates de carbone, d'acides aminés et de nucléotides adéniliques dans les tiges des mûriers (*Morus alba*) au cours des phases de croissance.

YAMASHITA T.

1990 *Tree Physiol.*, Vol. 6(2), 191-200. (E)

Effects of fertilizer on stem production in mulberry.

Effets de l'emploi de fertilisant sur la production de pousses chez le mûrier.

YAMASHITA T., KAWAUCHI I., TAKAGISHI H., HIKASA S.

1989 *Biomassu Henkan Keikaku Kenkyu Hokoku*, Vol. 15, 14-26. (J)

Effects of crop plant used as organic fertilizer in coastal mulberry tree (*Morus alba*) garden.

Effets des déchets de plantes utilisés comme fertilisants dans les jardins de mûriers *Morus alba*.

YIN D., XIE F.

1990 *Bull. Sericulture (China)*, Vol. 4, 32-33. (C)

Studies on initial temperature for development of mulberry tree (*Morus alba*).

Etudes sur la température initiale pour le développement des mûriers *Morus alba*.

ZHOU W., FENG G., PU Y.

Langzhong farm of Sericulture, Sichuan, China.

1990 *Bulletin of Sericulture (China)*, Vol. 4, 6-9. (C)

B. mori : élevage, nutrition, pathologie

B. mori : rearing, feeding, pathology

Studies on the symatological toxicity and the residual effect of pesticides on mulberry leaves to the silkworm, *Bombyx mori*.

Etudes sur la toxicité symatologique et l'effet résiduel des pesticides dans les feuilles de mûriers sur le ver à soie *Bombyx mori*.

CHINTANA S.

1986 Thesis (M. S. Agric.), Bangkok (Thailand), 61 p. (E,t)

Cold-storage of mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. during the pupal stage (Egypt).

Conservation au froid de vers à soie *Bombyx mori* L. au cours du stade nymphal, en Egypte.

EL-KARAKSY I. A., HOSNY A.

Ministry of Agriculture, Cairo, Plant Protection Research Inst., Egypt.

1988 Alexandria Journal of Agric. Research, Vol. 33(3), 269-277. (E)

Study on the breeding of DNV (*Bombyx mori* denisonucleosis virus) resistant, silkworm breed.

III-Egg production for 'Kang 1 × Kang 2' and a farm survey.

Etude sur l'élevage de souches de vers à soie résistants au DNV (virus de la denisonucléose de *B. mori*).
III-Production d'œufs pour 'Kang 1 × Kang 2' et étude d'une ferme.

FANG F., LU Y., HUANG Z.

South China Agricultural Univ., Guangzhou, China.

1990 Guangdong Sericultural Newsletter, Vol. 1, 24-28. (C)

Evaluation of three new hybrids of the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. during spring and autumn under Egyptian environmental conditions.

Evaluation de trois nouveaux hybrides du ver à soie du mûrier, *Bombyx mori* L. au cours de l'élevage de printemps et d'automne en Egypte.

FODA M. M.

Ministry of Agriculture, Plant Protection Research Inst., Cairo, Egypt.

1988 Alexandria Journal of Agric. Research, Vol. 33(3), 261-268. (E)

Performance of parental bivoltine silkworm (*Bombyx mori* L.) breeds on new mulberry (*Morus sp.*) varieties.

Rendement des races bivoltines parentales du ver à soie *Bombyx mori* L. élevées sur des variétés nouvelles de mûrier *Morus sp.*

GIRIDHAR K., SIVARAMI REDDY N.

Ctrl. Seric. Res. & Training Inst., Srirampuram, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.

1991 Indian J. Seric., Vol. 30(1), 23-29. (E,f)

Effective rate of rearing in bivoltine silkworm *Bombyx mori* L. breeds on different mulberry (*Morus* sp.) varieties.

Taux effectif d'élevage de souches bivoltines de vers à soie *Bombyx mori* L. nourries avec différentes variétés de mûriers *Morus* sp.

GIRIDHAR K., SIVARAMI REDDY N.

Ctrl. Seric. Res. & Training Inst., Srirampuram, Manandavadi Road, Mysore 570 008, India.

1991 *Indian J. Seric.*, Vol. 30(1), 88-90. (E)

Influence of host-insect on the pathogenicity of microsporidian *Vairimorpha* sp. M12 derived from silkworm, *Bombyx mori*.

Influence des insectes hôtes sur la pathogénicité du microsporidien *Vairimorpha* sp. M12 provenant du ver à soie *Bombyx mori*.

HAYASAKA S., ISHIHARA R.

1991 *Acta Seric. Entomol.*, N5, 17-20. (J)

Quantitative requirement of nutrients for growth of the silkworm, *Bombyx mori* L.

Quantités nécessaires d'éléments nutritifs pour la croissance du ver à soie *Bombyx mori* L.

HORIE Y.

Silkworm Physiology Division, Sericultural Experiment Station, Tokyo, Japan.

1978 *Reprinted from JARQ* Vol. 12(4), 211-217. (E)

Isolation of *Nosema bombycis* from moths of the lawn grass cutworm, *Spodoptera depravata* Butler.

Isolement de *Nosema bombycis* à partir des papillons de *Spodoptera depravata* Butler.

IWANO H., ISHIHARA R.

Fac. of Agric. & Veterinary Medicine, Nihon Univ., Kameino, Fujisawa, Kanagawa 252, Japan.

1991 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 60(4), 279-287. (J,e)

Dimorphic development of *Nosema bombycis* spores in gut epithelium of larvae of the silkworm, *Bombyx mori*.

Dimorphisme du développement des spores de *Nosema bombycis* dans l'intestin des larves du ver à soie *Bombyx mori*.

IWANO H., ISHIHARA R.

Fac. of Agric. & Veterinary Medicine, Nihon Univ., Kameino, Fujisawa, Kanagawa 252, Japan.

1991 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 60(4), 249-256. (J,e)

A study of a possibility for a reduced frequency rate of feeding on rearing silkworms in the last age period.

Etude sur la possibilité d'une fréquence réduite de nourrissage dans les élevages de vers à soie au cours du dernier stade.

KARAIVANOV S.

Bubarska Izpitvatelna Kontrolna Stantsiya, Kharmanli, Bulgarie.

1990 *Zhivotnov'dni Nauki (Bulgaria)*, Vol. 27(7), 114-119. (B)

Study on resistance of the silkworm, *Bombyx mori*, to high temperature.

Etude sur la résistance du ver à soie *Bombyx mori* aux températures élevées.

KATO M.

Dept. Insect Genet. & Breeding, Inst. of Seric. & Entomol. Sci. Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1989 *Proc. of the 6th International Congress of SABRAO*, 953-956. (E)

Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution.

Structure cristalline de l'endotoxine-delta de *Bacillus thuringiensis* à une résolution de 2,5 Å.

LI J., CARROLL J., ELLAR D. J.

Medical Research Council Lab. of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge CB2 2QH, UK.

1991 *Nature*, 1991, Vol. 353, 815-821. (E)

Silkworm diseases.

Les maladies du ver à soie.

LU Y-L.

1991 FAO Agricultural Service Bulletin, Vol. 73(4), 75 p. (E)

Resistance to viral infection of silkworm larvae reared on artificial diet given once during the 1st to 3rd instars.

Résistance à l'infection virale des larves de vers à soie élevées sur aliment artificiel une seule fois du 1^{er} au 3^{ème} âge.

MATSUBARA F., MATSUMOTO T., OHNISHI M., ISHIKO S., SUGIMORI H. et al.

Kyoto University of Industrial Arts and Textile Fibers, Japan.

1989 Japanese Journal of Applied Entomol. & Zool., Vol. 33(1), 9-11. (J)

Experiment of laboratorial storage of silkworm cocoons.

Expérience sur le stockage en laboratoire de cocons de vers à soie.

MIN S.

Zhejiang Agricultural Univ., Hangzhou, Department of Sericulture, China.

1990 Bull. of Sericulture, Vol. 3, 30-32. (C)

Preparation and characterization of monoclonal antibodies against occluded virions of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus.

Préparation et caractérisation des anticorps monoclonaux contre les virions occlus du virus de la polyédrose nucléaire de *Bombyx mori*.

NAGAMINE T., KOBAYASHI M., SAGA S., HOSHINO M.

1991 J. Invert. Pathol., Vol. 57, 311. (E)

Titration of *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae) nuclear polyhedrosis virus in a *Bombyx mori* cell line.

Titrage du virus de la polyédrose nucléaire de *Bombyx mori* dans des lignées de cellules de *B. mori*. (Lepidoptera : Bombycidae).

NAGAMINE T., SHIMOMURA M., SUGIMORI H., KOBAYASHI M.

Nagoya Univ., Fac. of Agriculture, Japan.

1989 Applied Entomology and Zoology, Vol. 24(2), 235-237. (E)

Rearing of silkworm, *Bombyx mori* L. on alternate host plants.

Elevage du ver à soie, *Bombyx mori* L. sur des plantes hôtes alternatives.

NASREEN A., AKHTAR M., ASHFAQ M., QAMAR S.

University of Agriculture, Faisalabad, Dept. of Agricultural Entomology, Pakistan.

1989 Pakistan Journal of Agric. Science, Vol. 26(1), 105-106. (E)

Feeding trials with different varieties of mulberry in relation to cocoon crop performance and incidence of loss due to disease.

Essais alimentaires avec différentes variétés de mûriers en rapport avec le rendement de la récolte de cocons et l'incidence sur les pertes dues aux maladies.

NATARAJU B., BAIG M., RAJU R., KRISHNASWAMY S., SAMSON M. S.

Central Sericultural Research & Training Inst., Mysore, India.

1989 Indian Journal of Entomol., Vol. 51(3), 238-241. (E)

Investigations on the multiplication of the variants of *Bombyx mori* nuclear-polyhedrosis virus.
Recherches sur la multiplication des variants du virus de la polyédrose nucléaire du ver à soie *Bombyx mori*.

NOGUCHI Y.

Saitama-Ken Sericultural Experiment Station, Kumagaya, Saitama 360, Japan.

1991 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 60(4), 302-309. (J,e)

Some research results about breeding summer white cocoon silkworm strains.

Quelques résultats de recherche sur la sélection de souches de vers à soie à cocons blancs l'été.

PHAM VAN VUONG

Trung Tam Nghien Cuu Dau Tam To Trung Uong, Hanoi, Vietnam.

1988 *Khoa Hoc va Ky Thuat Nong Nghiep (Vietnam)*, Vol. 8, 360-364. (V)

Comparative study of natural and artificial diet of the silkworm (*Bombyx mori* L.).

Etude comparative entre l'alimentation artificielle et naturelle du ver à soie *Bombyx mori* L.

SANNAMVONG K.

Central Luzon State Univ., Munoz, Nueva Ecija, Philippines.

1989 *Thesis (M.S. in Crop Protection)*, Munoz, Nueva Ecija CLSU Library, 97 p. (E)

Preliminary study on inner contamination of silkworm cocoons.

Etude préliminaire sur la contamination interne des cocons de vers à soie.

SHI L., DING H., YANG D.

Zhejiang Provincial Academy of Agric. Sci., Hangzhou, Institute of Sericulture, China.

1990 *Zhejiang Agricultural Sciences.*, Vol. 5, 240-242. (C)

Effect of juvenile hormone analogue on artificial diet rearing of silkworm, *Bombyx mori* L.

Effet d'analogue d'hormone juvénile sur l'élevage du ver à soie *Bombyx mori* L. nourri avec un aliment artificiel.

SOHN H. R.

Kyungpook National Univ., Taegu, College of Agriculture, Korea Republic.

1987 *The Research Reports of the Rural Develop. Adminis.*, Vol. 30, 363-371. (K)

Differences in urea content in the haemolymph of *B. mori* reared on an artificial diet and on fresh mulberry leaves.

Différences dans le contenu en urée de l'hémolymph de *B. mori* élevé soit sur aliment artificiel soit sur des feuilles fraîches de mûrier.

SUMIDA M., YAMADA Y., MORI H., MATSUBARA F.

Faculty of textile Science, Japan.

1991 *Bul. the Apparel Sci. Res. Ctre, Kyoto Inst. of Tech.*, Vol. 9(2), 1-3. (J,e)

Feeding and gustatory responses in the "polyphagous strains" of the silkworm, *Bombyx mori* L.

Réponses alimentaire et gustative de la "souche polyphage" du ver à soie *Bombyx mori* L.

YAZAWA M., HIRAO T., ARAI N., YAGI S.

National Institute of Sericultural & Entomol. Sci., Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1991 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 60(5), 363-371. (J,e)

Séricigènes non-mûrier : élevage, nutrition, pathologie

Non-mulberry silkworms : rearing, feeding, pathology

Biosynthesis of very long-chain methyl-branched alcohols, their acetate esters and hydrocarbons in pupae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*.

Biosynthèse d'alcools à très longues chaînes méthyl, leurs esters acétate et hydrates de carbone dans les chrysalides du ver du tabac *Manduca sexta*.

NELSON D. R., FATLAND C. L., BUCKNER J. S., DE RENOBLES M. et al.
1990 *Insect Biochem.*, Vol. 20(8), 821-827. (E)

Long-chain and very long-chain methyl-branched alcohols and their acetate esters in pupae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*.

Alcools à chaînes latérales méthyl longues et très longues et leurs esters d'acétate dans les chrysalides du ver du tabac *Manduca sexta*.

NELSON D. R., FATLAND C. L., BUCKNER J. S., DE RENOBLES M. et al.
Biosciences Research Lab., ARS, USDA, State University Station, Fargo, ND.
1990 *Insect Biochem.*, Vol. 20(8), 809-819. (E)

Constituents of the young and old leaves of primary food plants of oak tasar silkworm, *Antheraea proylei* J.

Constituants des jeunes feuilles et des feuilles matures des plantes nourricières primaires du ver à soie tasar du chêne, *Antheraea proylei* J.

PANDEY R. K., GOEL R. K.
Cttral Tasar Research & Training Inst., Research Extension Ctr., Bir-176 077, Kangra, India
1991 *Indian J. Seric.*, Vol. 30(1), 70-71. (E)

Cinnamomum glanduliferum Meissn as an additional primary host plant for *Antheraea assama* ww.

Cinnamomum glanduliferum Meissn, une nouvelle plante hôte primaire pour *Antheraea assama* ww.

RAJA RAM, SAMSON M V
Regional Muga Research Station, Central Silk Board, Kamrup, Assam. India.
1991 *Indian J. Seric.*, Vol. 30(1), 68-69. (E)

Cinnamomum glanduliferum Meissn as a secondary host plant for eri silkworm, *Samia cynthia ricini* Hutt.

Cinnamomum glanduliferum Meissn, une seconde plante hôte pour le ver à soie eri *Samia cynthia ricini* Hutt.

RAJA RAM, SAMSON M V
Regional Muga Research Station, Ctral. Silk board, Kamrup, Assam. India.
1991 *Indian J. Seric.*, Vol. 30(1), 64-65. (E)

Phosphatase activity in tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D., during its larval and pupal development.

Activité phosphatase chez le ver à soie tasar *Antheraea mylitta* D. au cours de son développement larvaire et nymphal.

SINHA A. K., SINHA U. S. P., SHIVA RAJU K., SINHA S. S.

Central Tasar Research & Training Inst., Ranchi 834 005, India.

1991 *Indian J. Seric.*, Vol. 30(1), 91-92. (E)

Amino acids in the excreta of healthy and pebrine infected larvae of *Antheraea mylitta* D.

Acides aminés dans les excréta des larves saines et infectées de pébrine d' *Antheraea mylitta* D.

SINHA A. K., SINHA U. S. P., SINHA S. S. & SENGUPTA K.

Central Tasar Research & Training Institute, PO. Hehal 834 005, Dist. Ranchi (Bihar), India

1991 *Indian J. Seric.*, Vol. 30(1), 78-80. (E)

Changes in phosphorus compounds in the haemolymph of healthy and pebrine infected larvae and pupae of tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D.

Variations des composés phosphoriques dans l'hémolymphe des larves et des chrysalides saines et infectées de pébrine du ver à soie tasar *Antheraea mylitta*.

SINHA U. S. P., SINHA A. K., SINHA S. S., SENGUPTA K.

Central Tasar Research & Training Institute, Ranchi 834 005, India.

1991 *Indian J. Seric.*, Vol. 30(1), 75-77. (E)

Changes in phosphorus compounds in healthy and pebrine infected developing embryos of tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D.

Variations des composés phosphoriques dans les embryons sains et infectés de pébrine du ver à soie tasar, *Antheraea mylitta* D.

SINHA U. S. P., SINHA A. K., SINHA S. S., SENGUPTA K.

Central Tasar Research & Training Institute, Ranchi 834 005, India.

1991 *Indian J. Seric.*, Vol. 30(1), 81-82. (E)

Quantitative studies on the infection of *Galleria mellonella* with a nuclear polyhedrosis virus of *Bombyx mori*.

Etudes quantitatives sur l'infection de *Galleria mellonella* par un virus de la polyédrose nucléaire de *Bombyx mori*.

STAIRS G. R.

1991 *J. Invert. Pathol.*, Vol. 57, 402. (E)

Vers à soie : génétique

Silkworms : genetics

Experimental results of using alpha-ray in silkworm studies./ Ket qua thi nghiem su dung tia anfa trong cong tac nghien cuu tam to.

Résultats expérimentaux sur l'utilisation des rayons alpha dans les études sur le ver à soie.

DAO H. C., NGUYEN T. B.

Trung Tam Nghien cuu Dau Tam To Trung Uong, Hanoi, Vietnam.

1989 Khoa Hoc Va Ky Thuat Nong Nghiep, Vietnam, Vol. 4, 224-227. (K)

Genetical analysis on the nonsusceptibility to denisonucleosis virus in the silkworm, *Bombyx mori*.

Analyse génétique sur la non sensibilité du ver à soie *Bombyx mori* au virus de la denisonucléose.

EGUCHI R.

1991 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 60(5), 384-389. (J,e)

Chromosomal fragment responsible for genetic mosaicism in larval body marking of the silkworm *B. mori*.

Fragment chromosomique responsable du mosaïcisme génétique dans le marquage du corps larvaire du ver à soie *B. mori*.

FUJIWARA H., NINAKI O., KOBAYASHI M., KUSUDA J., MAEKAWA H.

1991 Genet. Res., Vol. 57(1), 11-16. (E)

Studies on the inheritance of artificial-feed taking character of the silkworm.

Etudes sur le caractère héréditaire de la prise d'aliment artificiel chez le ver à soie.

HE Y., YANG M.

Sichuan Provincial Academy of Agricultural Science. (C)

1990 Bull. of Sericulture, Vol. 3, 27-29. (C)

Evidence for a relationship between the *Bombyx mori* middle repetitive Bm1 sequence family and U1snRNA.

Mise en évidence d'une relation entre la famille de séquences répétées médianes de Bm1 de *Bombyx mori* et la séquence du snRNA U1.

HERRERA R. J., WANG J.

1991 Genetica, Vol. 84, 31. (E)

The cocoon characters of the progeny from the graduating cross on cocoon weight in the 6th generation.

Les caractères du cocon des descendants de la 6ème génération de croisements orientés sur le poids du cocon.

HIRATA Y.

Ntl Inst. of Seric. & Entomol. Science, Ministry of Agric., Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1991 *Acta Sericologia et Entomologica*, N 5, 1-16. (J)

The conservation and study on genetic resources of silkworms in China.

La conservation et l'étude des ressources génétiques des vers à soie en Chine.

HUANG J.

The Sericulture Research Inst., Chinese Academy of Agric. Sciences, Zhenjiang, China.

1989 *Proc. of the 6th International Congress of SABRAO*, 60-66. (E)

cdNA cloning, sequencing and temporal expression of the protease responsible for vitellin degradation in the silkworm, *Bombyx mori*.

Clonage par ADNc, séquençage et expression temporelle du gène de la protéase responsable de la dégradation de la vitelline chez le ver à soie *Bombyx mori*.

IKEDA M., YAGINUMA T., KOBAYASHI M., YAMASHITA O.

1991 *Comparative Biochem. and Physiol.*, Vol. 99, 405. (E)

Manifestation of mosaicism on epidermal tissue and variation of haemolymph protein in hereditary sex-mosaic of *Bombyx mori*.

Manifestation de mosaïcisme sur le tissu épidermique et variation des protéines de l'hémolymphé dans la mosaïque sexuelle héréditaire de *Bombyx mori*.

KAWAGUCHI Y., BANNO Y., DOIRA H., FUJII H.

Kyushu Univ., Fukuoka, Fac. of Agriculture, Japan.

1989 *Science Bull. of the Fac of Agric.*, Vol. 43(1-2), 9-21. (J)

Genetical studies on the "miniature egg" mutant in *Bombyx mori*.

Etudes génétiques sur le mutant "oeuf miniature" chez *Bombyx mori*.

KAWAGUCHI Y., DOIRA H., KIHARA H.

Faculty of Agriculture, Kyushu University, Higashi-Ku, Fukuoka 812, Japan.

1991 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 60(5), 346-349. (J,e)

High level expression of porcine growth hormone in the silkworm, *Bombyx mori*, using a baculovirus expression vector.

Expression à un taux élevé de l'hormone de croissance porcine chez le ver à soie *Bombyx mori* en utilisant un baculovirus comme vecteur d'expression.

KAWAI H., SHIMOGORI Y.

1991 *Bio Ind.*, Vol. 8(1), 39-43. (J)

Identification of the Z-W bivalent in the silkworm, *Bombyx mori*.

Identification du bivalent Z-W chez le ver à soie *Bombyx mori*.

KAWAMURA N., NIINO T.

Lab. Sericology, Fac. Agric., Hokkaido Univ., N-9, W-9, Kita-ku Sapporo, Hokkaido 060, Japan.

1991 *Genetica*, Vol. 83, 121-123. (E)

Production of foreign gene products using *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus vector.

Synthèse de produits de gènes étrangers en utilisant le virus de la polyédrose nucléaire de *Bombyx mori* comme vecteur.

MAEDA S.

1991 *Bio. Ind.*, Vol. 81(1), 32-38. (J)

Structure and organization of major plasma protein genes of the silkworm, *Bombyx mori*.
Structure et organisation des gènes de la protéine majeure du plasma majeur chez le ver à soie *Bombyx mori*.

MORI S., IZUMI S., TOMINO S.
1991 *J. Mol. Biol.*, Vol. 2(18), 7. (E)

Establishment of cell lines from *Bombyx mori* and *B. mandarina*, an attempt of cell fusion.
Etablissement de lignées cellulaires de *Bombyx mori* et *B. mandarina*, essai de fusion des cellules.

NINAKI O., NAGAYASU K., KAMEOKA H., FUJIWARA H., MIYAJIMA N. et al.
Sericultural Experiment Station, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
1988 *Japan Scientific Societies Press, Tokyo*, 243-246. (E)

Gene analysis by blot hybridization on the silkworm, *Bombyx mori*, cell lines.
Analyse de gènes par hybridation en "blot" sur les lignées de cellules du ver à soie *Bombyx mori*

NINAKI O., TAKADA N., FUJIWARA H., OGURA T., MIYAJIMA N., et al.
1989 *J. Invertebrate Cell System Applications*, Vol. 1, 143-149. (E)

Preservation of domesticated mulberry silkworm genes and their use in Japan.
Conservation des gènes du ver à soie du mûrier domestiqué et leur utilisation au Japon.

OHTSUKI Y.
National Institut of Seric. & Entomol. Sci., Tsukuba 305, Ibaraki, Japan.
1989 *Proc. of the 6th Internat. Congress of SABRAO*, 67-72. (E)

Studies on the haemolymph amylase in *Bombyx mori* L. I. Frequency of amylase strain type in an experimental population of a few breeds of *Bombyx mori* L.

Etudes sur l'amylase de l'hémolymph chez *Bombyx mori* L. Fréquence des types d'amylases dans les populations de quelques races de *Bombyx mori* L.
RATNA SEN, NAGARAJ C. S., SURESH KUMAR N., SENGUPTA K.
Central Sericultural Research & Training Institute, Mysore 570 008, India.
1991 *Indian J. Seric.*, Vol. 30(1), 38-41. (E,f)

Synergistic interactions of silkmoth chorion promoter binding factors.
Interactions synergiques des facteurs se fixant au promoteur du chorion du ver à soie.

SKEIKY Y. A., IATROU K.
1991 *Mol. Cell. Biol.*, Vol. 11, 1954-1964. (E)

Heterozygosity of silkworm hybrids obtained from crossing two lines selected for combinational capacity.

Hétérozygotie d'hybrides de vers à soie obtenus par croisement de deux lignées sélectionnées pour leur capacité combinatoire.

STRUNNIKOV V. A., STRUNNIKOVA L. V., ZVYAGINTSEVA T. V.
Academy of Sciences of the USSR, Moscow.
1990 *Doklady, Biol. Sciences*, Vol. 310(1/6), 21-23. (E,R)

Genetic divergence among fifteen multivoltine genetic stocks of silkworm (*Bombyx mori* L.).
Divergences génétiques parmi 15 souches multivolines de vers à soie *Bombyx mori* L.

SUBBA RAO G., DAS S. K., DAS N. K.
Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore 742 101, India.
1991 *Indian J. Seric.*, Vol. 30(1), 72-74. (E)

Expression and regulation of the fibroin genes in the silkworms, *Bombyx mori* and *Antheraea yamamai*.

Expression et régulation des gènes de la fibroïne chez *Bombyx mori* et *Antheraea yamamai*.

SUZUKI Y., TAMURA T.

National Institute for Basic Biology, Okazaki, 444, Japan.

1989 *Proc. of the 6th International Congress of SABRAO*, 31-34. (E)

Microinjection of DNA into early embryo of *Bombyx mori*.

Microinjection d'ADN dans les embryons précoces de *Bombyx mori*.

TAMURA T.

1991 *Bio. Ind.*, Vol. 8(1), 26-31. (J)

Defining the sequence recognized with BmFTZ-F1, a sequence specific DNA binding factor in the silkworm *Bombyx mori*, as revealed by direct sequencing of bound oligonucleotides and gel mobility shift competition analysis.

Détermination de la séquence reconnue par BmFTZ-F1, un facteur de liaison spécifique à l'ADN chez *Bombyx mori*, révélée par séquençage direct des oligonucléotides liés et par analyse de modification de la mobilité sur gel avec compétiteurs.

UEDA H., HIROSE S.

1991 *Nuc. Ac. Res.*, Vol. 19, 36-89. (J)

Hybrid recombination of AcNPV transfer vector with *Bombyx mori* NPV and expression in silkworm larvae and pupae and the stability of expression product.

Recombinaison hybride du vecteur de transfert AcNPV avec le NPV de *Bombyx mori*, son expression chez les larves et les chrysalides du ver à soie et la stabilité du produit de l'expression.

WU A., WANG P., MAO C., QIAN Y., SUN Y.

1990 *Shengwu Gongcheng Xuebao*, Vol. 6(4), 277-281. (C)

Inheritance and correlation of characters of feed conversion efficiency in silkworm.

Hérédité et corrélation des caractères de l'efficacité de la transformation alimentaire chez le ver à soie.

YANG M., TU Z.

Zhejiang Agricultural Univ., Hangzhou, Dept. of Sericulture, China.

1990 *Bull. of Sericulture*, Vol. 3, 22-24. (C)

Genetic path analysis of feed efficiency in silkworm (*Bombyx mori*).

Analyse génétique de l'efficacité de l'alimentation chez le ver à soie *Bombyx mori*.

YANG M., ZHONG B., DU Z.

Zhejiang Agricultural Univ., Hangzhou, Dept. of Sericulture, China.

1990 *Acta Sericulturae Universitatis Zhejiangensis*, Vol. 16(4), 431-435. (C)

Vers à soie : physiology, biochimie

Silkworms : physiology, biochemistry

Site of hemolymph lectin production and its activation *in vitro* by 20-hydroxyecdysone.

Site de production de la lectine de l'hémolymphe et son activation *in vitro* par la 20-hydroxyecdysone.

AMANAI K., SAKURAI S., OHTAKI T.

1991 *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, Vol. 17(1), 39-51. (E)

Hormonal regulation of pheromone biosynthesis in the silkworm moth, *Bombyx mori*.

Régulation hormonale de la biosynthèse de phéromone chez le papillon *Bombyx mori*.

ARIMA R., TAKAHARA K., KADOSHIMA T., NUMAZAKI F., ANDO T., et al.

1991 *Appl. Entomol. Zool.*, Vol. 26(1), 137-147. (E)

Goblet cell alkaline phosphatase in silkworm midgut epithelium - its entity and role as an ATPase.

Phosphatase alcaline de l'intestin moyen du ver à soie - entité et rôle comme ATPase.

AZUMA M., TAKEDA S., YAMAMOTO H., ENDO Y., EGUCHI M.

1991 *J. Exp. Zool.*, Vol. 258, 294. (E)

Studies on the isozymes patterns of G-G-PD and LDH in male pupa of eri-silkworm, *Philosamia ricini*.

Etudes sur les profils des isozymes de la G-G-PD et de la LDH chez la chrysalide mâle du ver à soie eri *Philosamia ricini*.

BHATTACHARYYA A., SARKAR S. K., GANGULY S., BASU S. K.

1990 *Sci. Cult.*, Vol. 56(3), 131-133. (E)

Bombykol the silkworm sex pheromone - a review.

Le Bombykol, phéromone sexuelle du ver à soie - revue.

BOSE P. C., BOSE G., SENGUPTA K.

Central Sericultural Research & Training Inst., Mysore 570 008, India.

1991 *Indian J. Seric.*, Vol. 30(1), 1-16. (E)

The digestion of silk fibroin by rat.

Digestion de la fibroïne de soie par le rat.

CHEN K., IURA K., AIZAWA R.

1991 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 60(5), 402-403. (J)

Effect of temperature, time and pH on the extraction of protein in a chrysalis of Silkworm.

Effet de la température, du temps et du pH sur l'extraction de protéines à partir de chrysalides de vers à soie.

CHO C. H., CHA W. S., KIM J. S.

Chosun University, Kwangju College of Engineering, Korea Republic.

1989 *Korean Journal of Biotech. & Bioengin.*, Korea Rep., Vol. 4(2), 65-68. (K)

Alanyl transfer RNA synthetase from *Escherichia coli*, *Bombyx mori* and *Rattus cottus*. Existence of common structural features.

Alanyl tRNA-synthetase chez *Escherichia coli*, *Bombyx mori* et *Rattus cottus*. Existence de caractéristiques communes.

DIGNAM J. D., DIGNAM S. S., BRUMLEY L. L.

1991 *E. J. B.*, Vol. 198, 201. (E)

The formation of myeloid bodies in retinular cells of the pupal compound eyes of silkworm moths (*Bombyx mori*) exposed to a constant bright light.

La formation de corps myéloïdes dans les cellules rétinales des yeux composés nymphaux du papillon *Bombyx mori* exposé à une lumière vive constante.

EGUCHI E., MAEDA S., SHIMIZU I.

1991 *Cell and Tissue Res.*, Vol. 265, 381. (E)

Genetically defined membrane-bound and soluble alkaline phosphatases of the silkworm : their discrete localization and properties.

Phosphatases alcalines libres et liées aux membranes définies génétiquement chez le ver à soie : localisation et propriétés.

EGUCHI M., AZUMA M., YAMAMOTO H., TAKEDA S.

1990 *Prog. Clin. Biol. Res.*, Vol. 344, 267-287. (E)

Species specificity in the action of big and small prothoracicotropic hormones of 4 species of lepidopteran insects, *Mamestra brassicaea*, *Bombyx mori*, *Papilio xuthus* and *Polygonia aureum*.

Spécificité d'action des hormones prothoracicotropes grandes et petites de quatre espèces d'insectes lépidoptères, *Mamestra brassicaea*, *Bombyx mori*, *Papilio xuthus* et *Polygonia aureum*.

FIJIMOTO Y., ENDO K., WATANABE M., KUMAGAI K.

1991 *Zoological Science B.*, Vol. 8, 351. (E)

Production of antibodies to *Manduca sexta* cerebral neurosecretory cells.

Production d'anticorps contre les cellules neurosecrétices du cerveau de *Manduca sexta*.

FLANAGAN T. R., O'BRIEN M. A., AGUI N., BOLLENBACHER W. E.

Medicinal Biochemistry, Burroughs Wellcome, Research Triangle park, NC.

1989 *Archives of Insect Biochem. and Physiol.*, Vol. 12(4), 219-229. (E)

Stereo chemistry of the hydrogen addition to C-25 of desmosterol by sterol-delta 24-reductase of the silkworm *Bombyx mori*.

Stéréochimie de l'addition d'hydrogène au C-25 du desmostérol par la stérol-delta24-réductase du ver à soie *Bombyx mori*.

FUJIMOTO Y., NAGAKARI M., IKUINA Y., IKEKAWA N., KAKINUMA K.

1991 *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, Vol. 10, 688-689. (E)

Purification and characterisation of cocoon chrysalis, a causative antigen of sericultural asthma.

Purification et caractérisation de la chrysalis du cocon, un antigène responsable de l'asthme en sériciculture.

HAGIWARA O.

1991 *Kitakanto Igaku*, Vol. 41(1), 51-64. (J)

Developmental variability in the distribution of free aminoacids in hemolymph of inbred lines in *Bombyx mori*.

Variations de la distribution des acides aminés libres dans l'hémolymph des lignées consanguines de *Bombyx mori* au cours du développement.

HAQUE R., RAHMAN S., SAHA A. K., AHSAN S.

1990 *Pok. J. Zool.*, Vol. 22(3), 217-222. (E)

Research development of silkworm brain hormones. 3) PTHH.

Recherches sur les hormones du cerveau du ver à soie. 3) La PTHH.

ISHIZAKI H., SUZUKI A.

1990 *Saibo kogaku*, Vol. 9(6), 551-559. (J)

Research development on silkworm brain hormones. 1)

Recherches sur les hormones du cerveau du ver à soie. 1)

ISHIZAKI H., SUZUKI A.

1990 *Saibo Kogaku*, Vol. 9(4), 357-362. (J)

Research development on silkworm brain hormones. 2) Bombyxin.

Recherches de développement sur les hormones du cerveau du ver à soie. 2) La Bombyxine.

ISHIZAKI H., SUZUKI A.

1990 *Saibo Kogaku*, Vol. 9(5), 444-452. (J)

***Bombyx* prothoracicotropic hormone.**

L'hormone prothoracicotrope de *Bombyx*.

KATAOKA H., NAGASAWA H., KAWAKAMI A., OKA T., MIZOGUCHI A. et al.

1991 *ACS Symp. Ser.*, Vol. 453, *Insect Neuropep.*, 20-26. (E)

Expression of a putative precursor of pheromone biosynthesis activation neuropeptide-1 (PBAN-1) of the silkworm *Bombyx mori*, and its conversion to the mature peptide, PBAN-1.

Expression d'un précurseur potentiel du neuropeptide-1 activateur de la biosynthèse de phéromone (PBAN-1) chez le papillon *Bombyx mori*, et sa transformation en peptide mature PBAN-1.

KAWANO T., KUNIYOSHI H., NAKAYAMA J.

1991 *Agr. Biol. Chem.*, Vol. 55, 1943. (E)

A study on the enzyme activities in silkworm body influenced by growth promoting substances in artificial diet.

Etude sur les activités enzymatiques dans le corps du ver à soie sous l'influence de substances de croissance fournies dans l'alimentation artificielle.

KIM J. U., MA Y. I.

Chungbuk Natl. Univ., Cheongju, College of Agric., Rural dev. administration, Korea Rep.

1988 *The Research Reports of the Rural Develop. Administ.*, Vol. 31, 395-402. (K)

Isolation and amino acid sequence of pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN) of the silkworm *Bombyx mori*.

Isolement et séquence d'acides aminés d'un neuropeptide activant la biosynthèse de phéromone chez le ver à soie *Bombyx mori*.

KITAMURA A., NAGASAWA H., KATOAKA H., INOUE T., MATSUMOTO S., et al.

1989 *Pept. chem.*, Vol. 27, 63-68. (E)

Effects of 20-hydroxyecdysone and kk-42 on chitinase and B-N-acetylglucosaminidase during the larval-pupal transformation of *Bombyx mori*.

Effets de la 20-hydroxyecdysone et de kk-42 sur la chitinase et la B-N-acétylglucosamine au cours de la transformation larvo-nymphale de *Bombyx mori*.

KOGA D., FUNAKOSHI T., FUJIMOTO H., KUWANO E., ETO M., et al.

Lab. of Biochem., Fac of Agric., Yamaguchi Univ., Yamaguchi 753, Japan.

1991 *Insect. Biochem.*, Vol. 21(3), 277-284. (E)

Influence of thyroxine administration on lipid and water contents in the silkworm *B. mori*.

Influence de l'administration de thyroxine sur les contenus en lipide et en eau chez le ver à soie *B. mori*.

KUMARI J. P., RUTH N. Y., NAIDU B. P.

1989 *Environ. Ecol.*, Vol. 7(4), 889-891. (E)

Structure-activity relationship of pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN) from the silkworm, *Bombyx mori*.

Relation structure-fonction du neuropeptide activant la biosynthèse de phéromone (PBAN) chez le papillon *Bombyx mori*.

KUNIYOSHI H., KITAMURA A., NAGASAWA H., CHUMAN T., SMIMAZAKI K. et al.

1991 *Pept. Chem.*, 28th, 251-254. (E)

Synthesis and insect growth regulatory activity of 1-neopentyl-5-substituted imidazoles.

Synthèse et activité régulatrice de croissance des 1-néopentyl-5-imidazoles substitués.

KUWANO E., KIKUCHI M., ETO M.

1990 *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.*, Vol. 35(1/2), 35-41. (E)

Study on absorption of mid-gut of silkworm (*Bombyx mori*) larva for leucine and uracil.

Etude sur l'absorption de leucine et d'uracile dans l'intestin des larves du ver à soie *B. mori*.

LU S., CUI W., XU J.

Zhejiang Agricultural Univ., Hangzhou, Dept. of Sericulture, China.

1990 *Acta Agriculturae Universitatis Zhejiangensis*, Vol. 16(2), 169-173. (C)

Oviposition stimulants for the lesser mulberry pyralid *Glyphodes pyloalis* (Walker) in mulberry leaves. Rediscovery of phytoalexin components as insect kairomones.

Stimulants de l'oviposition pour la petite pyrale du mûrier, *Glyphodes pyloalis* Walker, dans les feuilles de mûriers. Redécouverte des composés phytoalexine comme kairomones d'insectes.

MATSUYAMA S., KUWAHARA Y., NAKAMURA S., SUZUKI T.

1991 *Agr. Biol. Chem.*, Vol. 55, 1333. (E)

Effect of adipokinetic hormone on properties of lipophorin of the silkworm, *Bombyx mori*.

Effet de l'hormone adipocinétique sur les propriétés des lipophorines du papillon *Bombyx mori*.

MIURA K., SHIMIZU I.

1991 *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 98, 73. (E)

Three-dimensional reconstruction of the body movement of a silkworm based on two video pictures.

Reconstitution en trois dimensions à partir de deux films video, du mouvement du corps du ver à soie.

MIURA M., KAISE T., SUGIURA A., NISHIOKA T.

Fac. of Textile Science & Technology, Shinshu Univ., 3-15-1 Tokida, Ueda 386, Japan.

1991 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 60(4), 310-316. (E)

Immunohistochemical localisation of prothoracicotropic hormone producing neurosecretory cells in the brain of *B. mori*.

Localisation immunohistochimique des cellules neurosécrétrices produisant l'hormone prothoracicotrope dans le cerveau de *B. mori*.

MIZOGUCHI A., OKA T., KATAOKA H., NAGASAWA H., SUZUKI A., ISHIZAKI H.

1990 *Dev. Growth Differ.*, Vol. 32, 591 (E)

Osmotic pressure of hemolymph in the silkworm, *Bombyx mori* : changes in amino and cation concentrations during development.

Pression osmotique de l'hémolymphe chez le ver à soie *Bombyx mori* : variations des concentrations en acides aminés et cations au cours du développement.

NAKAYAMA S.

Lab. of Biology, Tezukayama College, Gakuen-Minami, Nara 631, Japan.

1991 *Appl. Ent. Zool.*, Vol. 26(1), 99-105. (E)

Effets d'un régulateur de croissance d'insectes, le fénoxycarbe, sur le développement postembryonnaire de *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae).

Effects of an insect growth regulator, fenoxycarb, on the post-embryonic development of *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae).

PLANTEVIN G., GRENIER S., CHAVANCY G.

Laboratoire de Biol. Appl., Bât. 406, INSA-INRA, 20 av. A. Einstein, 69621 Villeurbanne F.

1991 *C. R. Acad. Sci., Paris*, t. 313, Serie III, 513-519. (F,e)

Esterase genetic polymorphism in hemolymph of larval *Bombyx mori* L.

Polymorphisme génétique de l' estérase hémolympatique de la larve de *Bombyx mori* L.

SHABALINA A.

1990 *Dokl. Bolg. Akad. Nauk.*, Vol. 43(9), 105-108. (E)

Medial frequency rhythmicity of haemolymph in the silkworm, *Bombyx mori* L. (PM × NB₄D₂).

Fréquence du rythme du vaisseau médian hémolympatique chez le ver à soie *Bombyx mori* L. (PM × NB₄D₂).

SIVARAMI REDDY N., PAVAN KUMAR T., SASIRA BABU K.

Dept. of Zoology, S. V. Univ., Tirupati 517 502, India.

1991 *Indian J. Seric.*, Vol. 30(1), 66-67. (E)

Kinetic data for the BM-5 insect cell line in repeated-batch suspension cultures.

Données cinétiques sur la lignée cellulaire BM-5 cultivée en suspension par repiquages répétés.

STAVROULAKIS D. A., KALOGERAKIS N., BEHIE L. A., IATROU K.

1991 *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 38(2), 116-126. (

Growth characteristics of a *Bombyx mori* insect cell line in stationary and suspension cultures.

Caractéristiques de la croissance d'une lignée de cellules de *Bombyx mori* en cultures adhérentes ou en suspension.

STRAVOULAKIS D. A., KALOGERAKIS N., BEHIE L. A., IATROU K.

1991 *Can. J. Chem. Eng.*, Vol. 69(2), 457-464. (E)

Distribution, synthesis and changes of alkaline protease activity in the larval midgut of the silkworm, *Bombyx mori*.

Distribution, synthèse et variation de l'activité de la protéase alcaline dans l'intestin larvaire du ver à soie *Bombyx mori*.

SUZUKI T., AZUMA M., YOSHIMURA T., EGUCHI M.

Fac. of Textile Sci., Kyoto Inst. of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan.

1991 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 60(5), 337-345 (J,e)

Effect of intake of 20-OH-ecdysone contained in the diet on changes of haemolymph ecdysteroid levels in the late 5th instar larvae of *Bombyx mori*.

Effet de la prise de 20-OH-ecdysone contenue dans l'alimentation sur les changements des taux d'ecdystéroïdes de l'hémolymph chez le ver à soie *Bombyx mori* au 5ème âge.

TAKEDA S., YANAGAWA H.-A., SATO M.

National Institute of Sericultural & Entomological Sci., Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1991 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 60(5), 404-406. (E)

Clotting inhibitor of *Bombyx* hemolymph.

Un inhibiteur de la gélification de l'hémolymph de *Bombyx*.

TERASAKI A., KAWAI H., SHIMOGORI Y., HIMENO M.

1991 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 60(4), 317-319. (J)

Thyroxine-induced haemolymph protein and ecdysteroid increases in the silkworm, *Bombyx mori*. Effect on larval growth and silk production.

Augmentation de la protéine de l'hémolymph induite par la thyroxine et d'ecdystéroïde chez le ver à soie *Bombyx mori*. Effet sur la croissance larvaire et la production de soie.

THYAGARAJA B. S., KELLY T. J., MASLER E. P., BORKOVEC A. B.

1991 *J. Insect Physiol.*, Vol. 37, 153. (E)

Identification and purification of a *Bombyx mori* homologue of FTZ-F1.

Identification et purification d'un homologue de FTZ-F1 chez *Bombyx mori*.

UEDA H., HIROSE S.

1990 *Nucl. Ac. Res.*, Vol. 18, 7229. (J)

Effect of carbaryl on free amino acid content in haemolymph and posterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori* L. (PM × NB₄D₂).

Effet du carbaryl sur le contenu en acide aminés libres de l'hémolymph et du sécréteur de la glande séricigène du ver à soie *Bombyx mori* L. (PM × NB₄D₂).

VENKATA REDDY S., SIVARAMI REDDY N., RAMAMURTHI R.

Department of Zoology, S. V. University, Tirupati 517 502, India.

1991 *Indian J. Seric.*, Vol. 30(1), 30-37. (E,f)

Developmental changes of the antenna and its neurons in the silkworm, *Bombyx mori*, with special regard to larval-pupal transformation.

Développement des antennes et de leurs neurones chez le ver à soie *Bombyx mori* en tenant compte plus particulièrement des transformations larvo-nymphales.

WAKU Y.

1991 *J. Morphology*, Vol. 207, 253.

Effect of juvenile hormone analogue on the protease of digestive juice from silkworm *Bombyx mori*.

Effet de l'analogue d'hormone juvénile sur la protéase du suc digestif du ver à soie *Bombyx mori*.

ZHOU N., XU J.

Zhejiang Agric. Univ., Hangzhou, Department of Seric., China.

1990 *Acta Agriculturae Universitatis Zhejiangensis*, Vol. 16(2), 165-168. (C)

Vers à soie : oeufs, embryologie

Silkworms : eggs, embryology

Dynamics of the synthesis of fibroin and heat shock proteins in different organs and at different stages of silkworm *Bombyx mori* ontogenesis.

Dynamique de la synthèse de fibroïne et des protéines de choc thermique dans différents organes et à des stades différents de l'ontogenèse du ver à soie *Bombyx mori*.

ABRAMOVA I. Y., UL'MASOV K. A., AKOPOV S. B., KARAEV K. K., et al.
1991 *Prikl. Biokhim Mikrobiol.*, Vol. 27(1), 147-156. (R)

Changes in cyclic AMP and cyclic GMP content related to embryogenesis and diapause of the silkworm, *Bombyx mori*.

Variations des contenus en AMP et GMP cycliques au cours de l'embryogenèse et de la diapause du ver à soie *Bombyx mori*.

CHEN J. H., YAGINUMA T., YAMASHITA O.
Nagoya University, Faculty of Agriculture, Japan.
1989 *Journal of Seric. Science of Japan*, Vol. 58(1), 60-65. (E)

The arrest of embryogenesis at gastrula stage in the diapausing silkworm *Bombyx mori* is related to the synthesis of protein P61.

L'arrêt de l'embryogenèse au stade gastrula chez le ver à soie diapausant *Bombyx mori* est lié à la synthèse de la protéine P61.

COULON M., DOREL C.
1991 *Roux's archives of developmental Biology*, Vol. 199, 469. (E)

Isolation and structure of diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*.

Isolément et structure de l'hormone de diapause du ver à soie *Bombyx mori*.

IMAI K., KONNO T., NAKAZAWA Y., KOMIYA T., ISOBE M., KOGA K. et al.
1991 *Proceedings Jap. Acad. Sci. B.*, Vol. 67, 98. (J)

Cyclic - GMP levels in abdominal ganglia of the silkworm, *Bombyx mori* at the time of eclosion.

Taux de GMP-cyclique dans les ganglions abdominaux du ver à soie *Bombyx mori* au moment de l'éclosion.

KOBAYASHI K., HIGUCHI K., KURIOKA A., KONO T.
Faculty of Agriculture, Tokyo Univ. of Agric. & Technology, Fuch, Tokyo 183, Japan;
1991 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol 60(4), 257-262. (E)

Termination of egg diapause by imidazoles in the silkworm, *Antheraea yamamai*.

Levée de la diapause de l'oeuf par des imidazoles chez le papillon *Antheraea yamamai*.

KUWANO E., FUJISAWA T., SUZUKI K., ETO M.
1991 *Agr. Biol. Chem.*, Vol. 55, 1185. (J)

Motility related ultrastructural changes in the flagellar membrane of apyrene spermatozoa of the silkworm *Bombyx mori*, induced by Arg-C endopeptidases.

Modifications ultrastructurales liées à la mobilité dans la membrane flagellaire du spermatozoïde apyrène du ver à soie *Bombyx mori* induites par des endopeptidases Arg-C.

OSANAI M., KASUGA H., AIGAKI T.

1991 *Invert. Reprod. and Development*, Vol. 19, 193. (E)

Partial purification of eclosion hormone from the saturniid silkmoth, *Samia cynthia ricini* Donovan.

Purification partielle de l'hormone d'éclosion du papillon saturniide, *Samia cynthia ricini* Donovan.

SAITO H., FUGO H.

1990 *Nippon Oyo Dobutsu Konchu Gakkaishi*, Vol. 34(4), 289-295. (J)

Effects of ecdysteroids on the growth of the post-testicular reproductive organs in the silkworm, *Bombyx mori*.

Effets des ecdystéroïdes sur la croissance des organes reproducteurs post-testiculaire chez le ver à soie *Bombyx mori*.

SHINBO H., HAPPA G. M.

Dept. Physiol. & Behav., Natl. Instit. of Seric. & Entomol. Science, Tsukuba, Ibaraki, Japan

1989 *Journal of Insect Physiol.*, United Kingdom, Vol. 35(11), 855-864. (E)

Developmental regulation of covalent modification of double-stranded RNA during silkworm oogenesis.

Régulation des modifications covalentes de l'ARN double brin au cours de l'ovogenèse chez le papillon.

SKEIKY Y. A. W., IATROU K.

1991 *J. Mol. Biol.*, Vol. 218, 517. (E)

Purification and immunological properties of vitellin, and its quantitative changes during embryogenesis in the silkworm *Bombyx mori*.

Purification et propriétés immunologiques de la vitelline et ses variations quantitatives au cours de l'embryogenèse chez le ver à soie *Bombyx mori*.

SOHN K. W., MOON J. Y.

1988 *Han'guk Chamsa Hakkoichi*, Vol. 30(2), 96-104. (C)

Induction of androgenetic parthenogenesis by laser microbeam irradiation of the silkworm (*Bombyx mori*).

Induction de parthénogenèse androgénétique chez *Bombyx mori* par irradiation avec un microfaisceau laser.

XU H., CHEN Z., LU Z.

Anhui Agricultural Coll., Hefei, China.

1990 *Journal of Anhui Agricultural College*, Vol. 17(3), 169-172. (C)

Does an enzyme activity capable of phosphorylating sorbitol control utilization of sorbitol at the termination of diapause in eggs of the silkworm *Bombyx mori*.

L'activité d'une enzyme capable de phosphoryler le sorbitol peut-elle contrôler l'utilisation du sorbitol en fin de diapause chez les oeufs du ver à soie *Bombyx mori*.

YAGINUMA T., YAMASHITA O.

1991 *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 98, 135. (E)

Effect of validoxylamine A on the trehalase activity in the colleterial glands of the silkmoth, *Bombyx mori*.

Effet de la validoxylamine A sur l'activité de la tréhalase dans les glandes accessoires du papillon *Bombyx mori*.

YAO X., FUGO H., TAKEDA S.

Dept. Seric., Fac. of Agric., Tokyo Univ. of Agric. & Tech., Fuchu-shi, Tokyo 183, Japan.

1991 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 60(4), 296-301. (J,e)

Effect of egg-raising temperature on amount of spawned eggs.

Effet de l'élévation de température des œufs sur la quantité d'œufs pondus.

YAO Y., ZHAO Z., CHEN X.

Suzhou Coll. of Sericulture and Mulberry Culture, Jiangsu, China.

1990 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 3, 43-44. (C)

Comparison of tyrosine decarboxylase activity in house fly and silkworm during ontogenesis.

Comparaison de l'activité tyrosine décarboxylase chez la mouche et le ver à soie au cours de l'ontogénèse.

ZHIVOTENKO E. Y., KUTUZOVA N. M., FILIPPOVICH Y.

1990 *Ontogenez*, Vol. 21(5), 548-551.

Vers à soie : glandes séricigènes

Silkworms : silk glands

Effect of 20-hydroxyecdysone on the ultrastructure of the posterior silk gland cells in the silkworm *Bombyx mori*.

Effet de la 20-hydroxyecdysone sur l'ultrastructure des cellules du sécréteur de la glande séricigène chez le ver à soie *Bombyx mori*.

DAI Y., ZHU J.

1990 *Kunchong Xuebao*, Vol. 33(4), 398-402. (C)

Seasonal changes in the organic composition of silk gland of the silkworm, *Bombyx mori* L.

Variations saisonnières de la composition organique de la glande séricigène du ver à soie *Bombyx mori* L.

DHINAKAR G. M., CHANGAMMA C., REDDANNA P., GOVINDAPPA S.

Division of Reproductive Physiol., Dept. of Zoology, S.V., Univ., Tirupati 517502, (AP)

1991 *Indian. J. Seric.*, Vol. 30(1), 42-45. (E,f)

Soie

Silk

Influence of fluorescent whitening agents on silk phototendering and dye fading.

Influence des agents blanchissants fluorescents sur la photo-fragilisation de la soie et la décoloration.
ANONYMOUS.

1990 Textile Chemist and Colorist, Vol. 22(5), 17-21. (E)

Production of soluble fibroin powder by hydrolysis with hydrochloric acid and physical properties.

Production et propriétés physiques d'une poudre de fibroïne soluble obtenue par hydrolyse à l'acide chlorhydrique.

CHEN K., TAKANO R., HIRABAYASHI K.

Fac. of Technology, Tokyo University of Agric. & Tech., Koganei, Tokyo 184, Japan.

1991 J. Seric. Sci. Jpn., Vol. 60(5), 358-362. (J,e)

Phospholipid species and fatty acid compositions of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine from cocoon shells of the silkworm, *Bombyx mori* and the Japanese oak silkworm, *Antheraea yamamai*.

Composition en phospholipides et en acides gras de la phosphatidylcholine et de la phosphatidyléthanolamine des coques des cocons du ver à soie, *Bombyx mori* et du ver à soie du chêne japonais *Antheraea yamamai*.

FURUSAWA T., NARUTAKI A.

1991 Bull. of Apparel Sci. Res. Ctre., Kyoto Inst. of Tech., Vol. 9(2), 19-24. (J,e)

Degumming of Murshidabad silk fabrics with alkalies.

Décreusage des tissus de soie de Murshidabad avec des solutions alcalines.

GULRAJANI M. L., DAS S., SETHI S.

1990 Indian J. Fibre Text. Res., Vol. 15(4), 173-179. (E)

I. R. study of the layer structure of tussah silk.

Etude I. R. de la structure en couches de la soie tussah.

HU J., JI T., WANG J., GUO H.

1990 Guang puxue yu Guangpu fenxi, Vol. 10(5), 11-13. (C)

Relationship between environmental conditions in the cocooning frame and the occurrence of slender silk.

Rapport entre les conditions d'environnement de l'encabannage et l'obtention de soie fine.

HUANG G., MIN S.

Zhejiang Agricultural Univ., Hangzhou, Department of Sericulture, China.

1990 Bull. Sericulture (China), Vol. 4, 47-48. (C)

Solubilization scouring of silk fibroin and fibroin collagen membrane formation.

Lavage de la fibroïne et formation de membranes de collagène-fibroïne.

INOUE H., HIROSHI T.

1989 *Kyozome to Seiren Senshoku*, Vol. 40(4), 122-132. (J)

Sensory and mechanical characteristics of hand feeling of chitosan treated Fuji silk.

Caractéristiques sensorielle et mécanique du touché de la soie Fuji traitée au chitosan.

KAKO T.

1991 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 60(4), 288-295. (J,e)

Salt-shrinking and dispersion treatment of fine fibers of "Akebono" cocoon.

Les fibres fines des cocons "Akebono" soumises à la rétraction par le sel et au traitement par dispersion.

KATO H.

National Institute of Sericultural & Entomological Science, Tsukuba, Ibaraki, 305, Japan.

1991 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 60(4), 270-278. (J,e)

Improvement of mechanical properties of silk fibroin membranes by addition of fibroin fibers and poly(sodium)glutamate.

Amélioration des propriétés mécaniques des membranes de fibroïne de soie en ajoutant des fibres de fibroïne et de poly(sodium) glutamate.

LIANG C. X., HIRABAYASHI K.

1991 *Sen'i Gakkaishi*, Vol. 46(12), 535-540. (J)

Application of Ethylenoxide-Gas to silkworm pupae killing and properties of the obtained cocoon and raw silk.

Application d'éthylénoxyde-gaz pour tuer les chrysalides du ver à soie et propriétés des cocons et de la soie grège obtenus.

MATSUMOTO T.

1991 *Bull. of Apparel Sci. Res. Ctre., Kyoto Ins. of Tech.*, Vol. 9(2), 8-13. (J,e)

Preservation of silkworm quasi-fresh cocoon treated with ethyleneoxide gas.

Conservation de cocons de vers à soie presque frais après traitement au gaz éthylénoxyde.

MATSUMOTO T., HASHIMOTO Y.

1991 *Bull. of Apparel Sci. Res. Ctre., Kyoto Inst. of Tech.*, Vol. 9(2), 14-18. (J,e)

Irregularities of blended yarns in waste silk spinning system.

Irrégularités des fils mélangés dans un système de filage des déchets de soie.

MATSUMOTO Y., TSUCHIYA I., TORIUMI K., HAKAWA K.

Faculty of Textile Science & Technology, Shinshu University, Tokida, Ueda 386, Japan.

1991 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 60(4), 263-269. (E)

Proteolytic degradation of fibroin subunit by enzyme degumming.

Dégradation protéolytique des sous-unités de la fibroïne par l'enzyme de décreusage.

MORI H., SUMIDA M., MATSUBARA F.

1991 *Bull. of Apparel Sci. Res. Ctre., Kyoto Inst. of Tech.*, Vol. 9(2), 4-7. (J,e)

Dyeing properties of an acid dye for *Antheraea yamamai*.

Propriétés de teinture d'un colorant acide pour la soie d'*Antheraea yamamai*.

NAKAJIMA T., DOHMYOU M., SHIMIZU Y., KIMURA M.

1991 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 60(5), 372-376. (J,e)

Studies on grafting technique of methacrylamine onto silk fibers.

Etudes sur la technique de greffage de méthacrylamine sur les fibres de soie.

PARK Y. H.

Seoul National University, Suwon, College of Agriculture, Korea Republic.

1989 *The Research Reports of the Rural Development Adminis.*, 32, 241-246. (K)

Condition for design of the limit-size detecting period of an automatic silk reeling machine.

Conception de la détermination de la durée de détection de la taille limite du fil sur une machine automatique à dévider la soie.

SEGI H.

Nissan Motor Co., Ltd., Mitaka-city, Tokyo 181, Japan.

1991 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 60(5), 350-357. (J,e)

Immobilization of hyaluronic acid on silk fibroin.

Immobilisation de l'acide hyaluronique sur la fibroïne.

SHIMADA M., TAKIGAMI S., UCHIDA T., NAKAMURA Y., PHILLIPS G.

1990 *Cellulose*, 495-500. (E)

Effects of high dose methoprene treatment on quantitative characters of cocoon and cocoon filament.

Effets d'un traitement avec des doses élevées de méthoprène sur les caractères quantitatifs et sur le filament du cocon.

TAKABAYASHI K., HIROMU A.

1991 *Acta Seric. Entomol.*, N5, 21-25. (J)

Crystal structure of silk (*Bombyx mori*).

Structure cristalline de la soie provenant de *Bombyx mori*.

TAKAHASHI Y., GEHOH M., YUZURIHA K.

1991 *J. Polym. Sci., Part B : Polym. Phys.*, Vol. 29, 889-892. (E)

The study on the preparation and the structure analysis of biological polymer materials. 1)

Characterization of the regenerated silk fibroin from *Bombyx mori*.

Etude sur la préparation et analyse de la structure des polymères biologiques. 1) Caractérisation de la fibroïne de soie de *Bombyx mori* régénérée.

TSUKADA M., GOTO Y., MINOURA N.

1990 *J. S. S. J.*, Vol. 59, 325-330. (J)

Analysis of the difference in cocoon samples used for dry-shell weight examination.

Analyses des différences dans les échantillons de cocons utilisés pour le contrôle du poids de la coque sèche.

ZHU L.

Zhejiang Agricultural Univ., Hangzhou, Dept. of Sericulture, China.

1990 *Bull. Sericulture (China)*, Vol. 4, 14-16. (C)

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 25 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 × 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 25 free reprints are sent by the Editor.

* * *

Directeur Gérant : Dr H. BOUVIER

Dépôt légal : 4e trimestre 1991