

Revue des Vers à Soie

Journal of Silkworms

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

Directeur Gérant
Rédacteur en Chef
Rédacteur Adjoint

H. BOUVIER
G. CHAVANCY
A. FOURNIER

Managing Director
Chief Editor
Deputy Editor

COMITE DE REDACTION
EDITORIAL BOARD

AKAPANTHU S. (Thaïlande / <i>Thailand</i>)	LIU S.-X. (Chine / <i>China</i>)
BEAULATON J. (France)	LU H.-S. (Chine / <i>China</i>)
BECK D. (France)	MANO Y. (Japon / <i>Japan</i>)
BOSQUET G. (France)	MAUCHAMP B. (France)
COUBLE P. (France)	PERSOONS C.J. (Pays-Bas / <i>Netherlands</i>)
DANDIN S.B. (Inde / <i>India</i>)	PRUDHOMME J.-C. (France)
DAS B.C. (Inde / <i>India</i>)	REALI G. (Italie / <i>Italy</i>)
DATTA R.K. (Inde / <i>India</i>)	SHIMURA K. (Japon / <i>Japan</i>)
DOIRA H. (Japon / <i>Japan</i>)	SHIRATA A. (Japon / <i>Japan</i>)
FONSECA T.C. (Brésil / <i>Brazil</i>)	SOMASHEKAR T.H. (Inde / <i>India</i>)
FOURCHE J. (France)	SONWALKAR T.N. (Inde / <i>India</i>)
FREDDI G. (Italie / <i>Italy</i>)	TAKAHASHI R. (Brésil / <i>Brazil</i>)
GOLDSMITH M.R. (USA)	TAZIMA Y. (Japon / <i>Japan</i>)
HORIE Y. (Japon / <i>Japan</i>)	TRENCZEK T. (Suisse / <i>Switzerland</i>)
IATROU K. (Canada)	VAGO C. (France)
JOLLY M.S. (Inde / <i>India</i>)	VEY A. (France)
KOBAYASHI M. (Japon / <i>Japan</i>)	XIA J.-G. (Chine / <i>China</i>)
KRISHNASWAMY S. (Inde / <i>India</i>)	YAMASHITA O. (Japon / <i>Japan</i>)
LEA H. Z. (Corée / <i>Korea</i>)	YANAGAWA H. (Japon / <i>Japan</i>)
LEGAY J.-M. (France)	

SOMMAIRE - CONTENTS

Actualités / News i

Revues / Reviews

Crossbreeding and heterosis in the silkworm, *Bombyx mori*, a review 1
 L'hybridation et l'hétérosis chez le ver à soie *Bombyx mori* 21
 J. NAGARAJU, RAJE URS & R.K. DATTA

Influence of various agronomical practices in India on the leaf quality in mulberry, a review 27
 Influence de diverses pratiques agronomiques en Inde sur la qualité de la feuille chez le mûrier 41
 K.M. PUROHIT & T. PAVAN KUMAR

Articles originaux / Original papers

Chromosomal features at different meiotic stages during spermatogenesis in *Bombyx mori* 51
 Caractéristiques des chromosomes à différents stades méiotiques de la spermatogenèse chez *Bombyx mori* 59
 Y. BANNO, Y. KAWAGUCHI, K. KOGA & H. DOIRA

Study on the haemolymph lysozyme activity and its inheritance in different breeds of the silkworm, *Bombyx mori* L., in F₁ crosses 63
 Etude sur l'activité lysozyme de l'hémolymph et sa transmission héréditaire dans des croisements F₁ de différentes souches du ver à soie *Bombyx mori* L. 71
 A. BOZCHKOVA, P. TZENOV & Y. NATCHEVA

Use of monoclonal antibodies to BmNPV for early detection of the nuclear polyhedrosis disease in *Bombyx mori* L. 75
 Utilisation d'anticorps monoclonaux contre le BmNPV pour la détection précoce de la polyédrose nucléaire chez *Bombyx mori* L. 85
 M. SHAMIM, M. BAIG, R.K. DATTA & S.K. GUPTA

Studies on the phenotypic variability of seven cultivars of *Morus alba* L. and three of *Morus multicaulis* P. (Moraceae) — Part 2 91
 Etudes sur la variabilité phénotypique de sept cultivars de *Morus alba* L. et trois de *Morus multicaulis* P. (Moraceae) — 2ème partie 103
 L. CAPPELLOZZA, A.T. CORADAZZI, S. CAPPELLOZZA, B. BALDAN & P. MARIANI

Stages of oogenesis correlated with the age of the uzi fly, *Exorista bombycis* (= *E. sorbillans*) (Diptera: Tachinidae) 107
 Etapes de l'ovogenèse en fonction de l'âge de la mouche uzi *Exorista sorbillans* (= *E. sorbillans*) (Diptera: Tachinidae) 119
 H.B. MANJUNATHA & H.P. PUTTARAJU

Rapports techniques / Technical reports

Studies on *Aspergillus* disease of the silkworm, *Bombyx mori* L. 127
 Etude de l'aspergillose chez le ver à soie *Bombyx mori* L. 135
 C.S. PATIL, M. KRISHNA, P. SHARADAMMA & S.B. DANDIN

Effect of pruning time on the nutritive value of <i>Quercus serrata</i> leaves, the primary food plant of <i>Antheraea proylei</i> J., and its impact on oak tasar silkworm rearing . . .	139
Effet de la taille sur la valeur nutritive des feuilles de <i>Quercus serrata</i> , plante hôte primaire d' <i>Antheraea proylei</i> J., et impact sur l'élevage du ver à soie tasar du chêne . . .	143
M.K. GHOSH & R.C. SRIVASTAVA	

Notes brèves / Brief notes

SEM observations on larval and pupal spiracles of <i>Bombyx mori</i> L. (Lepidoptera: Bombycidae) . . .	145
Observation au microscope électronique à balayage des stigmates larvaires et nymphaux du ver à soie <i>Bombyx mori</i> L. (Lepidoptera : Bombycidae) . . .	151
S.K. TEWARI, VINEET KUMAR & R.K. DATTA	

SEM observations on sensory receptors on the head capsule of the silkworm, <i>Bombyx mori</i> L. (Lepidoptera: Bombycidae) . . .	153
Observation au microscope électronique à balayage des récepteurs sensoriels de la capsule céphalique du ver à soie <i>Bombyx mori</i> L. (Lepidoptera : Bombycidae) . . .	159
S.K. TEWARI, VINEET KUMAR & R.K. DATTA	

Evaluation and utilization of specific hybrids of the multivoltine silkworm, <i>Bombyx mori</i> L., in unfavourable seasons of West Bengal . . .	161
Evaluation et utilisation d'hybrides spécifiques du ver à soie polyvoltin <i>Bombyx mori</i> L. au cours de saisons défavorables dans le Bengale occidental . . .	165
S. CHATTOPADHYAY, S.K. DAS, G.C. ROY, N.K. DAS, S.K. SEN & T. PAVAN KUMAR	

Feeding adaptability of different silkworm varieties to an artificial diet varying in mulberry leaf powder content . . .	167
Adaptation de différentes variétés de ver à soie à un aliment artificiel en fonction du contenu en poudre de feuilles de mûrier . . .	171
WU X.-f., WU J.-l., MIAO Y.-g.	

Amino acid analysis of the cocoon of <i>Cricula trifenestrata</i>, a pest of the <i>Antheraea assama</i> host plant, <i>Machilus bombycina</i> . . .	173
Analyse des acides aminés du cocon de <i>Cricula trifenestrata</i> , parasite de <i>Machilus bombycina</i> , plante hôte d' <i>Antheraea assama</i> . . .	177
B.G. UNNI	

Bibliographie / Bibliography . . .	179
Sériciculture générale / General sericulture . . .	180
Mûrier / Mulberry . . .	182
<i>Bombyx mori</i> : élevage, nutrition, pathologie / <i>Bombyx mori</i> : rearing, feeding, pathology .	185
Séricigènes non mûriers : élevage nutrition, pathologie / Non mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology . . .	189
Vers à soie : génétique / Silkworms: genetics . . .	191
Vers à soie : physiologie, biochimie / Silkworms: physiology, biochemistry . . .	193
Vers à soie : oeufs, embryologie / Silkworms: eggs, embryology . . .	196
Glandes séricigènes / Silk glands . . .	198
Soie / Silk . . .	199

Instructions aux auteurs / Information for contributors

BULGARIE

A l'occasion du 100e anniversaire de sa création, la Station expérimentale séricicole de Vratza organise une conférence internationale sur le thème " Les problèmes de la sériciculture au niveau international à la fin du XXe siècle " à Vratza du 17 à 20 septembre 1996.

Le programme scientifique de la conférence portera sur les aspects les plus importants de la sériciculture :

- mûrier : sélection et culture ;
- ver à soie : élevage, nourrissage, pathologie, sélection ;
- le ver à soie comme outil biologique : génétique, physiologie, biochimie, génie génétique, biologie moléculaire, biologie du développement, etc. ;
- soie : dévidage, qualité, grades ;
- économie : marchés intérieurs et internationaux, prix, commerce, analyse économique de projets, etc.

Pour toute information, contacter :

Dr Panomir TZENOV, Director, Sericultural Experiment Station, 24 Mito Orozov Street, Vratza 3000, Bulgaria.
Fax: +359 92 45 154.

BULGARIA

On the 100th anniversary of its founding, the Sericultural Experiment Station, Vratza, organises an international conference entitled " Problems of World Sericulture at the End of the 20th Century " in Vratza from 17-20 September 1996.

The scientific programme will cover topics related to the most important aspects of sericulture:

- mulberry: selection and breeding;
- silkworm: rearing, feeding, pathology and breeding;
- the silkworm as a biological model: genetics, physiology, biochemistry, genetic engineering, molecular biology, developmental biology, etc.;
- silk: reeling, quality and gradation;
- economics: domestic and international markets, prices, trading, economic analysis of projects, etc.

Further information may be obtained from :

CROSSBREEDING AND HETEROSIS IN THE SILKWORM, *BOMBYX MORI*, A REVIEW

J. NAGARAJU¹*, RAJE URS² & R.K. DATTA³

1. Seribiotech Research Laboratory, 8, West of Chord Road, Mahalakshimpuram Post, II Stage, Bangalore - 560 086, India.
2. Central Silk Board, United Mansions, No. 39 Mahatma Gandhi Road, Bangalore - 560 001, India.
3. Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi Road, Srirampura, Mysore - 570 008, India.

Keywords: Crossbreeding, double cross, mid-parent.

INTRODUCTION

Crossbreeding is extensively used in silkworm improvement as a means of exploiting heterosis (Osawa and Harada, 1944; Harada, 1949, 1952, 1954, 1957, 1961; Yokoyama, 1957; Harada *et al.*, 1961; Krishnaswami *et al.*, 1964; Hirobe, 1985). The two big leaps in hybrid utilisation were the Japanese silkworm and American maize. In fact, the utilisation of hybrid vigour in the silkworm came slightly earlier than in the case of maize. The credit of introducing F₁ hybrids with a clear demonstration of their superiority over parental strains goes to Toyama (1906) of Japan. The hybrids which were crosses of Chinese and Japanese origin became so popular with the farmers there, that by 1919 over 90% of eggs produced were of hybrid origin, reaching 100% by 1928 (Yokoyama, 1973a). The average weight of cocoon shell, which had been brought by slow selection from a little below 20 cg in 1804 to a little over that weight in 1910, was increased rapidly to well over 40 cg by 1932 when the hybrids took over production in Japan (Hirobe, 1985). That was the power of hybrids and phenomenal contribution of hybrid vigour to silkworm improvement. However, unlike in many plant species like rice where highly inbred lines are used for commercial exploitation, in the silkworm, only the hybrids of highly inbred lines (Yokoyama, 1979; Chang *et al.*, 1981; Gamo and Hirabayashi, 1983) or of different breeds (Krishnaswami *et al.*, 1964) are used. The word "heterosis" was coined by Shull in 1914 (as cited by Shull, 1948) to describe the increased vigour of crossbreeds relative to their parents irrespective of the cause underlying such a phenomenon.

The domesticated silkworm, *Bombyx mori*, which enjoys the patronage of many countries in the world by virtue of its commercial value has wide distribution with well-defined geographical races (Hirobe, 1968). These races display genetic, physiological, ethological, morphological, biochemical and quantitative differences (Yokoyama, 1979; Gamo and Ohtsuka, 1980; Gamo, 1983). Besides, many intensive breeding efforts aiming at improving the productivity and quality of silk have yielded a number of inbred lines (Jolly, 1983; Datta, 1984). Many inbred lines which carry specific improvement for a particular character have also been developed (Miyahara, 1978; Maruyama, 1984). Relations between voltinism, moultnism and quantitative traits have been reasonably well defined (Nagatomo, 1942; Morohoshi, 1949; Nakada, 1970; Murakami, 1989; Murakami and Ohtsuki, 1989). The environmental influence on the manifestation of such characters has been elucidated (Morohoshi, 1949; Harada *et al.*, 1961; Singh and Hirobe, 1964; Tazima, 1988; Nagaraju, 1990).

* To whom correspondence should be addressed. Tel.: 0091-80-3324179, Fax: 0091-80-3320752

The objective of this paper is to review briefly the different forms of heterotic expression for different economic traits in the silkworm.

HYBRID VIGOUR FOR DIFFERENT CHARACTERS

During the different stages of silkworm development many characters have been found to have a relationship with the qualitative and quantitative aspects of silk yield (Ohi *et al.*, 1970). However, the characters which reveal intense manifestation of heterosis are as follows:

- i) the duration of feeding in hybrids becomes shorter than that of the parents or the midparental values (MPV),
- ii) the mortality rate is lower than that of the parents,
- iii) the double cocoon rate is higher than that of the parents,
- iv) the cocoon weight is higher than that of MPV,
- v) the cocoon shell layers are heavier than that of MPV,
- vi) the length of silk fibre is longer than that of MPV, and
- vii) the cocoon fibre weight is heavier than that of MPV.

The earlier results of Osawa and Harada (1944) show the following values of hybrid vigour for different characters (Table I) considering the MPV as 100.

Table I. Heterosis for different characters in the silkworm.

Tableau I. Hétérosis pour différents caractères chez le ver à soie.

Characters <i>Caractères</i>	Heterosis* <i>Hétérosis*</i>
Duration of feeding / <i>Durée du nourrissage</i>	97
Larval mortality / <i>Mortalité larvaire</i>	56
Double cocoon rate / <i>Taux de cocons doubles</i>	146
Silk filament size / <i>Titre de la bave de soie</i>	103
Cocoon shell weight / <i>Poids de la coque</i>	124
Egg number / <i>Nombre d'oeufs</i>	123

* Index value of 100 is taken for midparental values / *L'indice 100 correspond aux valeurs des parents moyens.*
(Osawa and Harada, 1944).

In the silkworm, the heterosis recorded by Harada (1957) was in the order of cocoon shell weight (27.8%), cocoon weight (25.9%), survival rate (23%), size of filament (20.7%), length of filament (19%) and growth rate (11%) (Fig. 1).

However, the level of heterosis recorded for different traits by different workers is not consistent. Subba Rao and Sahai (1990) using 30 bivoltine $\times$ bivoltine hybrids showed the highest significant level of heterosis for cocoon yield (14.25), which is a function of both survival rate and cocoon weight, followed by cocoon weight (3.89) and denier (3.08) as shown in Table II. Similar studies carried out for six multivoltine $\times$ bivoltine hybrids by Nagaraju (1990) showed the highest heterosis for larval weight (13.93%) followed by survival rate (12.7%) and single cocoon weight (8.7%) as shown in Table III.

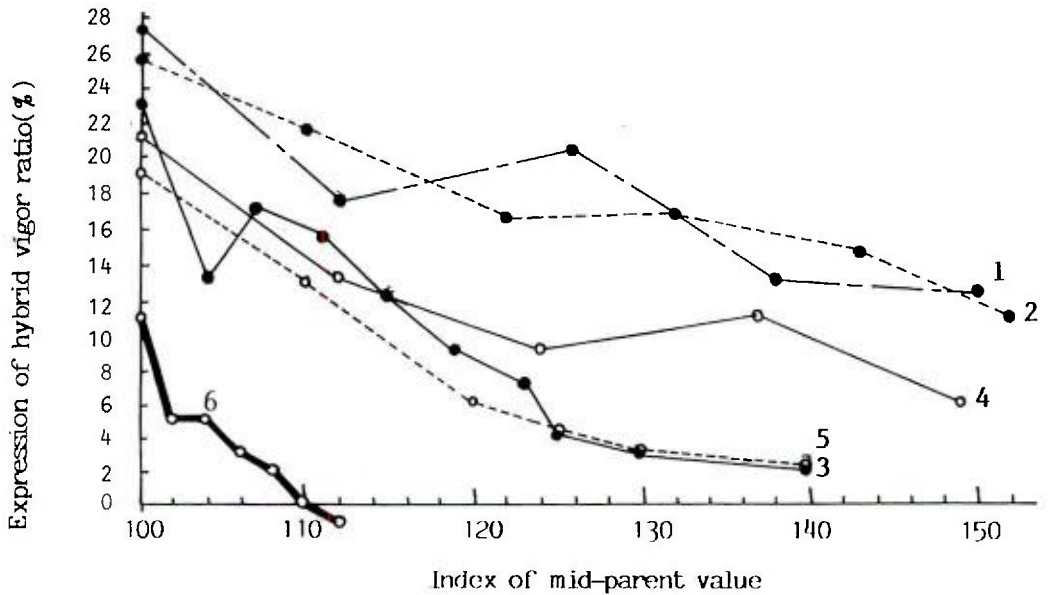


Fig. 1: A sample of expression of hybrid vigor for several characters in the silkworm.

(1) Cocoon layer weight 100 = 27.5 cg; (2) Single cocoon weight 100 = 1.4 g; (3) Survival rate 100 = 69.5 %; (4) Size of filament 100 = 2.5 d; (5) Length of filament 100 = 750 m; (6) Growth rate 100 = 32.5 d.

Fig. 1 : Exemple d'expression de la vigueur hybride pour plusieurs caractères du ver à soie.

(1) Poids de la coque soyeuse 100 = 27,5 cg ; (2) Poids du cocon 100 = 1,4 g ; (3) Taux de survie 100 = 69,5 % ; (4) Titre de la bave 100 = 2,5 d ; (5) Longueur de la bave 100 = 750 m ; (6) Taux de croissance 100 = 32,5 d.
Harada, 1957.

Table II. Heterosis for different characters in the silkworm (mean of 30 bivoltine × bivoltine hybrids).

Tableau II. Hétérosis pour différents caractères chez le ver à soie (moyenne de 30 hybrides bivoltins × bivoltins).

Characters / Caractères	$\frac{F_1 - MPV}{MPV} \times 100$
Cocoon yield / Rendement en cocons	14.25**
Single cocoon weight / Poids d'un cocon	3.89**
Single shell weight / Poids de la coque	3.29
Shell ratio / Richesse soyeuse	-0.558
Filament length / Longueur de la bave	-2.78
Denier	3.08
Larval duration / Durée larvaire	2.58
Survival rate / Taux de survie	0.87

* Significance at the 5% level / Significatif au seuil de 5 %.

** Significance at the 1% level / Significatif au seuil de 1 %.
(Subba Rao and Sahai, 1990).

Studies made by various workers show that the degree of heterosis varies steeply for different characters. Such wide differences in the manifestation of heterosis suggest that the parental strains involved in the hybrids differ in their genetic make-up, as reflected in their sharp differences in origin, voltinism and quantitative traits such as larval duration, single cocoon weight, cocoon shell weight, filament length, etc. (Harada, 1957; Yokoyama, 1957; Krishnaswami *et al.*, 1964; Chang *et al.*, 1981; Gamo and Hirabayashi, 1983; Tayade, 1987; Sathenahalli *et al.*, 1989).

Harada (1961) found a functional relationship between MPV and F_1 hybrid values. The degree of heterosis manifested is proportional to the quantity of MPV. The greater is the MPV, the less becomes the heterosis. According to Harada (1961), when the quantitative characters of the parents are improved through selection excessively, they become more homogenous for genic components, consequently the heterosis tends to become smaller, as found for weight of cocoon (Fig. 2) and length of silk filament (Fig. 3).

Table III. Heterosis for different characters in the silkworm (mean of 6 multivoltine $\times$ bivoltine hybrids).

Tableau III. Hétérosis pour différents caractères chez le ver à soie (moyenne de 6 hybrides polyvoltins $\times$ bivoltins).

Characters / Caractères	$\frac{F_1 - MPV}{MPV} \times 100$
Total larval duration / <i>Durée larvaire totale</i>	-5.30
5th instar larval duration / <i>Durée du 5e âge</i>	-1.40
Larval weight / <i>Poids larvaire</i>	13.93
Survival rate / <i>Taux de survie</i>	12.67
Single cocoon weight / <i>Poids d'un cocon</i>	8.65
Cocoon shell weight / <i>Poids de la coque</i>	6.17
Cocoon shell ratio / <i>Richesse soyeuse</i>	-0.22

(Nagaraju, 1990)

As a result, the characters of F_1 will gradually approximate to that of the parents themselves, as Hayes (1952) reported in maize. On this point, Smith (1936) has also found that the number of leaves of F_1 in *Nicotiana rustica* was consistently below the MPV. Such a result is interpreted as due to the preponderance of accumulated recessive genes for the characters favoured by selection.

HETEROSIS IN DIFFERENT CROSSING SYSTEMS

The hybrid vigour is at its best in the single cross of the genetically distinct populations, which decreases gradually like $F_1 > F_2 > F_3 > F_4 \dots$ and the phenomenon of heterosis disappears in about F_{14} generations in the silkworm (Hirobe, 1985).

Silkworm varieties could be crossed into single cross ($A \times B$), three-way cross [$(A \times B) \times C$] and double cross patterns [$(A \times B) \times (C \times D)$]. Generally, single cross hybrids manifest the highest rate of hybrid vigour as compared to three-way and double cross hybrids. Studies conducted on variation in quantitative characters in parental strains and hybrids of different crossing systems reveal that

variability for quantitative traits is smaller in single cross hybrids than in parental strains, three-way and double cross hybrids (Watanabe, 1961; Sohn, 1983; Yokoyama, 1973b).

Fig. 2: Manifestation of heterosis in relation to midparental values in silkworm for cocoon weight.

x = midparent values, y = F_1 hybrid values, effect of heterosis, $x-y$.

Fig. 2 : Manifestation de l'hétérosis en fonction des valeurs du parent moyen pour le poids du cocon chez le ver à soie.

x = valeurs du parent moyen, y = valeurs de l'hybride F_1 , effet de l'hétérosis, $x-y$.
Harada, 1961.

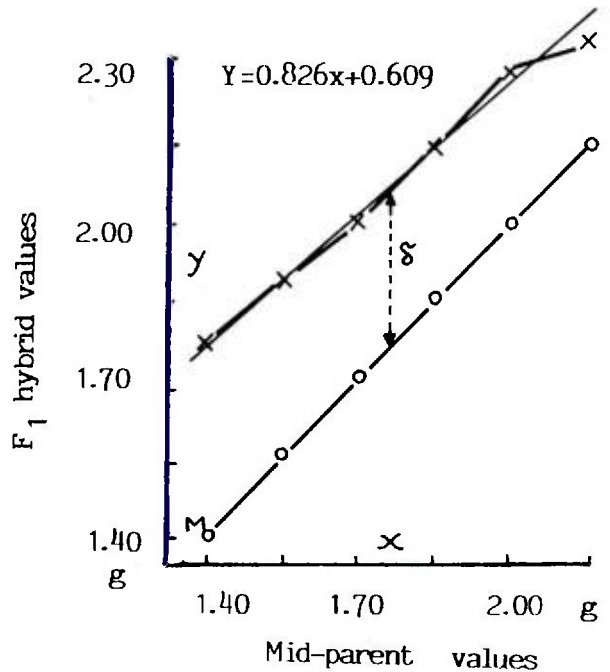
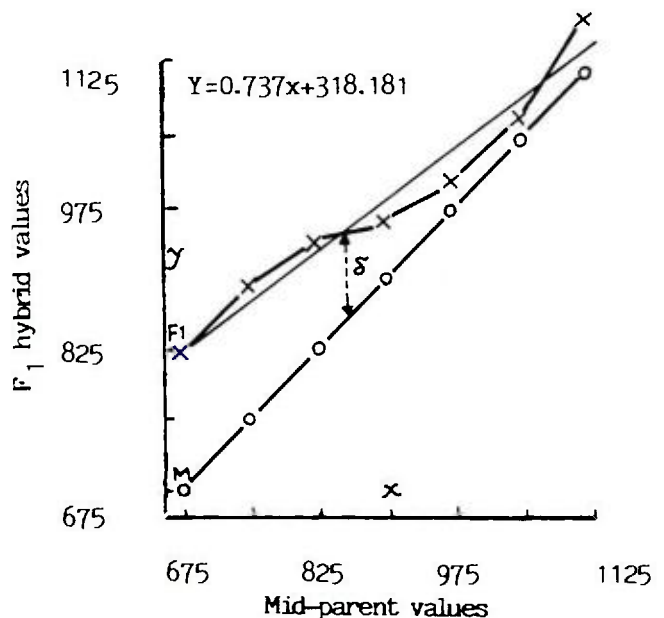


Fig. 3: Manifestation of heterosis in relation to midparental values in silkworm for length of silk filament.

x = midparent values, y = F_1 hybrid values, effect of heterosis, $x-y$.

Fig. 3 : Manifestation de l'hétérosis en fonction des valeurs du parent moyen pour la longueur de la bave chez le ver à soie.

x = valeurs du parent moyen, y = valeurs de l'hybride F_1 , effet de l'hétérosis, $x-y$.
Harada, 1961.



Most of the studies recorded to date (Hirobe, 1985; Udupa and Gowda, 1988; Nagaraju, 1990) show that three-way and double cross hybrids are inferior to single cross hybrids. The results obtained by Nagaraju (1990) for three-way cross hybrids of (multivoltine $\times$ multivoltine) $\times$ bivoltine and (multivoltine $\times$ multivoltine) $\times$ bivoltine (Table IV) also corroborate these studies.

Such a difference between hybrids of single, three-way and double crosses could be interpreted considering the fact that one of the parents involved in three-way and both parents in the double cross hybrids are actually F_1 individuals. Furthermore, the population produced by three-way or double cross hybrids is a mixture of genotypes, all of which could in principle have been produced by single crosses, but differs from single cross hybrids in the following three ways (Falconer, 1981).

- i) If the lines crossed have been selected, and if any of the consequent superiority of their single crosses is due to epistatic interactions, some of this superiority is lost in three-way and double crosses.
- ii) There is genetic variation within the crosses and consequent loss of phenotypic uniformity.
- iii) The variance between crosses is reduced and the best three-way and double cross hybrids are consequently not as good as the best single cross hybrids.

Donald *et al.* (1977) and Gaines *et al.* (1970) observed that the mean of three-way cross hybrids of cattle retains only approximately 40% of heterosis of the F_1 hybrids. Sheridan (1981) reviewing crossbreeding and heterosis in various animal species concludes that such results are best explained by parental epistasis model. Results obtained by various workers on heterosis in single, three-way and double cross hybrids in the silkworm tend to favour the parental epistasis model.

In the three-way crossing type it is difficult to make a choice between (Japanese $\times$ Japanese) $\times$ Chinese and (Chinese $\times$ Chinese) $\times$ Japanese hybrids. But considering the silk yarn quality the latter has been found to be better (Yokoyama, 1973b). The double crossing type (Japanese $\times$ Chinese) $\times$ (Japanese $\times$ Chinese) produces nonuniform cocoons with variable cocoon shapes and filament length, as compared to the (Japanese $\times$ Japanese) $\times$ (Chinese $\times$ Chinese) type, hence the latter is preferred (Table V) (Yokoyama, 1973b). The crossing effect is expressed in different ways in case of different crossing order according to the quantitative characters, especially cocoon shell weight in (Japanese $\times$ Japanese) $\times$ (Chinese $\times$ Chinese) crosses. The crossing effect has been found to be highest when the parental strains are crossed in the order of $(1 \times 2) \times (3 \times 4)$, with $4 > 3 > 2 > 1$ for cocoon shell weight.

Presently, improved silkworm strains which yield longer silk filament tend to lay fewer eggs (Ohi *et al.*, 1970). On the other hand, in the double cross hybrids, the egg yield/female moth is 30% more than in single cross hybrids (Yokoyama, 1973b). Hence, the usage of double cross hybrids is to an extent of more than 40% in Japan, while such a use is yet to gain initiative in India. A model has been proposed by Minagawa and Ohtsuka (1975), which can predict the performance of three-way and double cross hybrids from the performance of single cross hybrids of the constituent lines.

HETEROSIS IN RECIPROCAL CROSSES

In the silkworm, many quantitative characters are closely associated with the nature of voltinism and maturity period which are known to be sex-linked (Nagatomo, 1942; Morohoshi, 1949; Nakada, 1970, 1972; Tazima, 1988). Hence, expression of heterosis varies in the reciprocal crosses of silkworm breeds which differ in voltinism and maturity period. In the reciprocal cross of polyvoltine $\times$ bivoltine, the male value is greater than the female one for cocoon shell weight, as demonstrated by Tazima (1988) (Table VIa). Besides, in the reciprocal cross of polyvoltine $\times$ bivoltine, cocoon weight, shell weight, filament length and filament weight are lower than those of direct crosses (Tazima, 1988) (Table VIb).

However, such reciprocal differences are not observed in the crosses which involve parental strains of the same voltinism. Nakada (1970) found the larval span of the females to be shorter than that of the males in the reciprocal cross hybrids. The fact that the females of the hybrids grow too quickly has an adverse effect on the cocoon shell weight (Morohoshi, 1949; Nakada, 1972). First, Nagatomo (1942) proposed that maturity genes linked to the Z chromosome play an important role in reciprocal hybrid differences since the larval maturity gene has a close correlation with body size, cocoon weight, cocoon shell weight and body weight. Later, Morohoshi (1949) proposed multiple allelism of maturity genes, i.e., early (l_m), intermediate ($+^{lm}$) and late (L_m) maturity. In such a scheme, if one considers that polyvoltines possess the early maturity (l_m) gene and the bivoltines carry the late

Table IV. Heterosis for different quantitative characters in single and three-way crosses.

Tableau IV. Hétérosis pour différents caractères quantitatifs chez des croisements simples et trois voies.

	Survival rate <i>Taux de survie</i>			Cocoon weight <i>Poids du cocon</i>			Cocoon shell weight <i>Poids de la coque</i>		
	MPV	F ₁	Heterosis (%)	MPV	F ₁	Heterosis (%)	MPV	F ₁	Heterosis (%)
Single crosses / Croisements simples :									
polyvoltine × bivoltine / <i>polyvoltins × bivoltins</i>									
Pure Mysore × NB ₁₈	86.20	98.20	13.92	1.46	1.55	6.16	.276	.267	-3.26
Hosa Mysore × NB ₁₈	71.37	92.80	30.00	1.62	1.72	6.17	.306	.341	11.44
polyvoltine × polyvoltine / <i>polyvoltins × polyvoltins</i>									
Pure Mysore × Hosa Mysore	74.00	95.32	28.81	1.16	1.48	27.58	.190	.238	25.26
Three-way crosses / Croisements trois voies :									
(Pure Mysore × NB ₁₈ × NB ₇)	94.00	91.90	-2.23	1.66	1.60	-3.61	.321	.279	-13.08
Pure Mysore × Hosa Mysore × NB ₁₈)	82.80	81.60	-1.45	1.67	1.64	-1.80	.312	.327	4.68

(Nagaraju, 1990)

maturity gene (+^{lm}) on Z chromosomes, in a cross between polyvoltine × bivoltine and its reciprocal hybrids, the reciprocal differences for maturity and related traits could be expected. Although this is an oversimplified version for explanation purpose, there seems to be an intricate, genetic mechanism which involves voltinism, maturity genes, temperature during silkworm rearing and hormonal interplay seem to operate on the manifestation of the traits (Oshiki, 1979).

Table V. Comparison of characters among parents and different crosses, spring 1972.

Tableau V. Comparaison des caractères entre les parents et différents croisements, printemps 1972.

Combination	Pupation ratio (%)	Cocoon yield/10000 larvae (kg)	Single cocoon weight (g)	Cocoon shell weight (cg)	Cocoon shell ratio (%)	Filament length (m)	Denier	Raw silk	Neatness
Combinaison	Taux de nymphe (%)	Rendement en cocons/10000 larves (kg)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (cg)	Richesse soyeuse (%)	Longueur de la bave (m)	Denier	Soie grège	Netteté
Rb (J)	90	17.2	1.81	40.8	22.5	1140	2.67	82.2	96.0
137 (C)	94	18.3	2.07	52.0	25.1	1343	2.96	84.4	94.0
Sfp (J)	91	19.3	2.17	50.4	23.2	1488	2.33	82.2	93.0
13a (C)	95	19.3	2.20	53.8	24.5	1530	2.57	88.5	96.5
Single cross / Croisements simples									
Sfp × rb	95	19.3	2.02	47.8	23.7	1370	2.67	84.5	95.5
13a × 137	95	18.5	2.00	50.8	25.4	1513	2.50	83.7	94.4
Sfp × 13a	97	21.6	2.26	54.4	24.1	1577	2.67	85.5	95.5
Three-way cross / Croisement trois voies									
(Rb × Sfp) × 13a	98	23.0	2.38	57.6	24.2	1438	3.03	85.0	92.5
Double cross / Croisements doubles									
(Sfp × rb) × (13a × 137)	97	22.9	2.38	56.2	23.6	1479	2.97	87.8	89.5
(Sfp × 137) × (Rb × 13a)	98	20.1	2.18	52.2	23.9	1420	2.78	85.9	92.5

J: Japanese / Japonais. C: Chinese / Chinois.
(Yokoyama, 1973b)

Table VI(A). Sexual differences in the quantitative characters in direct and reciprocal crosses of the silkworm.*Tableau VI(A). Différences entre les sexes pour les caractères quantitatifs chez des croisements directs et réciproques du ver à soie.*

Cross	Larval span (days:hr)	Single cocoon weight (g)			Cocoon shell weight (g)		
		Male	Female	Mean	Male	Female	Mean
<i>Croisement</i>	<i>Durée larvaire (jours:h)</i>	<i>Poids du cocon (g)</i>			<i>Poids de la coque (g)</i>		
		<i>Mâle</i>	<i>Femelle</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Mâle</i>	<i>Femelle</i>	<i>Moyenne</i>
Pure Mysore (F) × N ₄ (M)	21:22	1.68	2.16	1.92	0.318	0.349	0.334
N ₄ (F) × Pure Mysore (M)	21:00	1.57	1.70	1.65	0.297	0.252	0.275

M: Male / *Mâle*. F: Female / *Femelle*.
(Tazima, 1988).

Table VI(B). Difference in the quantitative characters in direct and reciprocal crosses of the silkworm.*Tableau VI(B). Différences entre les caractères quantitatifs chez des croisements directs et réciproques du ver à soie.*

	Single cocoon wt. (g)	Shell weight (cg)	Shell ratio (%)	Filament length (m)	Filament weight (g)
	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Poids de la coque (cg)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>	<i>Longueur de la bave (m)</i>	<i>Poids de la bave (g)</i>
Pure Mysore	1.00	13.3	13.3	272	0.07
C134	1.83	48.5	26.8	1245	0.37
Pure Mysore × C134	1.87	32.4	17.3	841	0.25
C134 × Pure Mysore	1.59	27.0	17.0	729	0.20

(Tazima, 1988)

HETEROSIS AND ENVIRONMENT

According to the concept of genetic homeostasis (Lerner, 1954), heterozygotes are likely to be better buffered than homozygotes against environmental variations. Consequently, heterozygotes might be expected to display less variation both between and within environments as compared to their parental strains. Thus, the degree of manifestation of heterosis shown by a particular cross can be influenced by the environment (Barlow, 1981). This concept of genotype-environmental

interactions influencing the level of heterosis has been dealt with by different authors for different animal species (Sang, 1964; Griffing and Zsiros, 1971; Knight, 1973; Orozco, 1976; Ruban *et al.*, 1988; Santiago *et al.*, 1989; Ehiobu and Goddard, 1989).

Generally, in a good environment (which includes optimum temperature of 25 °C, mulberry leaves of high nutritive value, optimum rearing space, germ-free conditions, air current and 70-75% relative humidity) silkworm parental strains register a higher silk yield and its attributes (Krishnaswami, 1978; Rapussas and Gabriel, 1976; Ueda, 1963; Ueda *et al.*, 1969). As a result, MPV is close to hybrid mean values with a little difference. In fact, when one of the parental strains is a high-yielding bivoltine strain and the other one is a polyvoltine strain in a cross, heterosis over the high-yielding strain will be negative when both parental strains and hybrids are raised in a good environment.

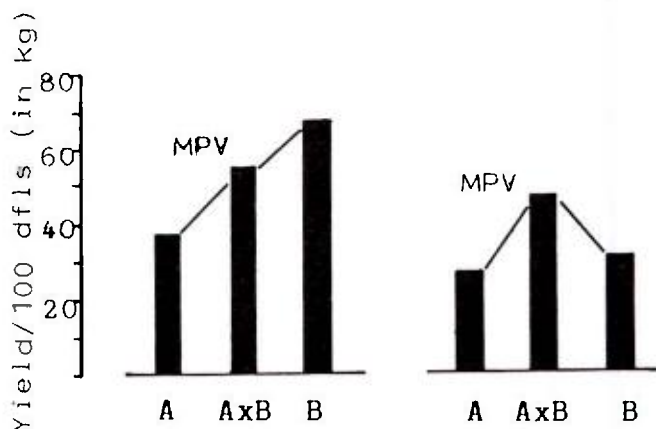
On the other hand, when both the parental strains and the hybrids are raised in an adverse environment (for example, high temperature > 31 °C), the mean of the hybrids will be much higher than the mean of the parental strains. In such cases, heterosis over both MPV and better parental values will be higher (Fig. 4). This condition is similar to the "Greek temple model" proposed by Cunningham (1987) for the traits exhibiting a greater degree of heterosis in a poor environment. The means of six single cross hybrids of polyvoltine and bivoltine strains raised in optimum (25 °C) and high (31 °C) reveal differences in heterosis for survival rate and cocoon characters (Table VII).

Fig. 4: Schematic representation of cocoon yield differences in parental strains and other hybrids under optimum and adverse rearing conditions.

A: Polyvoltine, B: Bivoltine, A × B: Hybrid.

Fig. 4: Représentation schématique des différences de rendement en cocons entre les souches parentales et d'autres hybrides dans des conditions d'élevage optimales et défavorables.

A: Polyvoltin, B: Bivoltin, A × B: Hybride.



The results obtained by Watanabe (1960) on heterosis for starvation resistance at three temperatures, 13 °C, 20 °C and 31 °C, corroborate this view. In his study, F₁ hybrids recorded overdominance for starvation resistance in each instar at all the three temperatures. In the early instars, which recorded higher growth at 30 °C, heterosis was larger at 13 °C (47.3%) than at 30 °C (24.8%) while heterosis was higher (37.26%) for fifth instar larvae at 30 °C than at 20 °C (30.4%). Harada *et al.* (1961) found distinct differences in heterosis for the characters concerning reeling in the hybrid population of Japanese (N501 and 3 other strains) and Chinese (C502 and 5 other strains) strains raised during different seasons and years (Table VIII).

Table VII. Midparental value (MPV), F_1 hybrid value and heterosis in polyvoltine $\times$ bivoltine hybrids raised at two temperatures.

Tableau VII. Valeur du parent moyen (MPV), des F_1 et de l'hétérosis chez des hybrides polyvoltins $\times$ bivoltins élevés à deux températures différentes.

Characters Caractères	25 °C			31 °C		
	MPV	F_1	Heterosis (%)	MPV	F_1	Heterosis (%)
Survival rate / Taux de survie (%)	86.05	96.80	12.49	81.95	94.70	15.5
Single cocoon wt. / Poids du cocon (g)	1.51	1.64	8.60	1.29	1.43	10.9
Cocoon shell wt. / Poids de la coque (g)	0.28	0.30	7.14	0.25	0.27	8.0

(Nagaraju, 1990)

Table VIII. Comparison of heterosis (%) over midparental value for post-reeling characters in Japanese $\times$ Chinese hybrids raised during spring and autumn.

Tableau VIII. Comparaison de l'hétérosis (%) par rapport à la valeur du parent moyen pour les caractères post-dévidage chez des hybrides japonais $\times$ chinois élevés au printemps et à l'automne.

	Raw silk percentage Richesse soyeuse			Silk filament length Longueur de la bave			Silk filament weight Poids de la bave			Silk filament size Denier de la bave		
	F_1	MPV	Heterosis (%)	F_1	MPV	Heterosis (%)	F_1	MPV	Heterosis (%)	F_1	MPV	Heterosis (%)
Spring Printemps	18.8	18.6	1.07	1211	1068	13.40	40.40	31.25	29.30	3.03	2.66	14.0
Autumn Automne	17.8	16.3	9.20	1020	831	22.70	29.90	19.95	49.90	2.63	2.19	20.1

(Harada *et al.*, 1961)

SEXUAL DIFFERENCES IN THE MANIFESTATION OF HETEROSIS

The degree of manifestation of heterosis does not seem to show marked differences between sexes in the hybrid progeny. Results obtained by Shimizu (1966) show that females recorded slightly higher heterosis than males both for cocoon and cocoon shell weights (Table IX).

Table IX. Sexual differences in the manifestation of heterosis of cocoon and cocoon shell weights.***Tableau IX. Différences entre les sexes de la manifestation de l'hétérosis pour les poids du cocon et de la coque.***

Sexes	Cocoon weight (g) Poids du cocon (g)				Cocoon shell weight (cg) Poids de la coque (cg)			
	Parents N124	C122	F ₁	Heterosis (%)	Parents N124	C122	F ₁	Heterosis (%)
Female / Femelle	2.154	2.007	2.670	28.36	45.687	44.597	56.99	26.25
Male / Mâle	1.662	1.537	2.015	26.01	42.357	41.641	51.62	22.90

* Average of ten rearings from 1956-65 / Moyenne de dix élevages de 1956 à 1965.
(Shimizu, 1966)

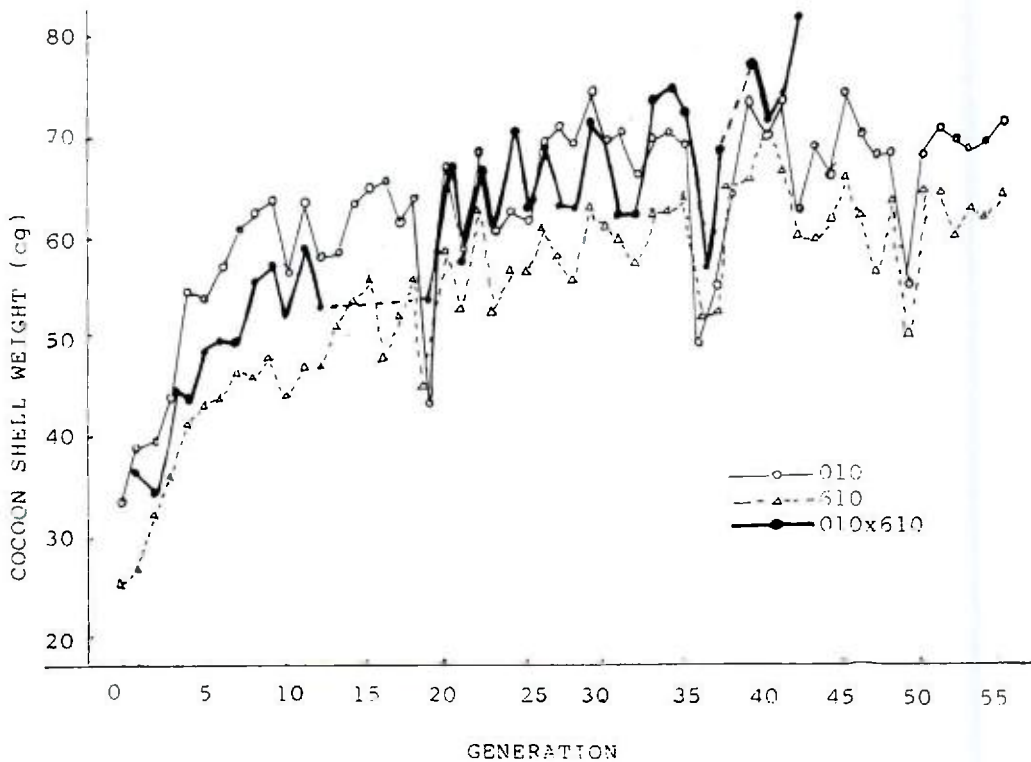
**Fig. 5: Effect of selection for cocoon shell weight in 010 and 610 strains and their hybrid, 010 × 610.**

Fig. 5 : Effet de la sélection du poids de la coque chez les souches 010 et 610 et chez leur hybride 010 × 610.
Maruyama, 1984.

HETEROSIS IN RELATION TO SELECTION FOR QUANTITATIVE TRAITS

The foregoing account shows that heterosis has been harnessed in the silkworm by crossing different breeds, inbred lines and geographical races. However, information is also available on how the amount of heterosis depends on the selection history of populations selected for different characters. The studies reported by Maruyama (1984) show that when the two lines, 010 and 610, selected for cocoon shell weight for 55 generations (from 1928 to 1982) were crossed, the hybrid mean for the selected trait (cocoon shell weight) was closer to the mean of the better parent (Fig. 5) and the heterotic values over MPV were not significant (Table X). On the other hand, mean values for cocoon weight, an unselected trait in the experiment, exhibited higher mean values which were outside the mean of both parental strains and also revealed a high level of heterosis specially from the ninth generation of selection (Table X). Consequent to the higher mean for cocoon weight, the cocoon shell ratio was found to be lower than that of both parents and heterosis over MPV for this character was found to be negative in almost all the generations (Table X, Fig. 6).

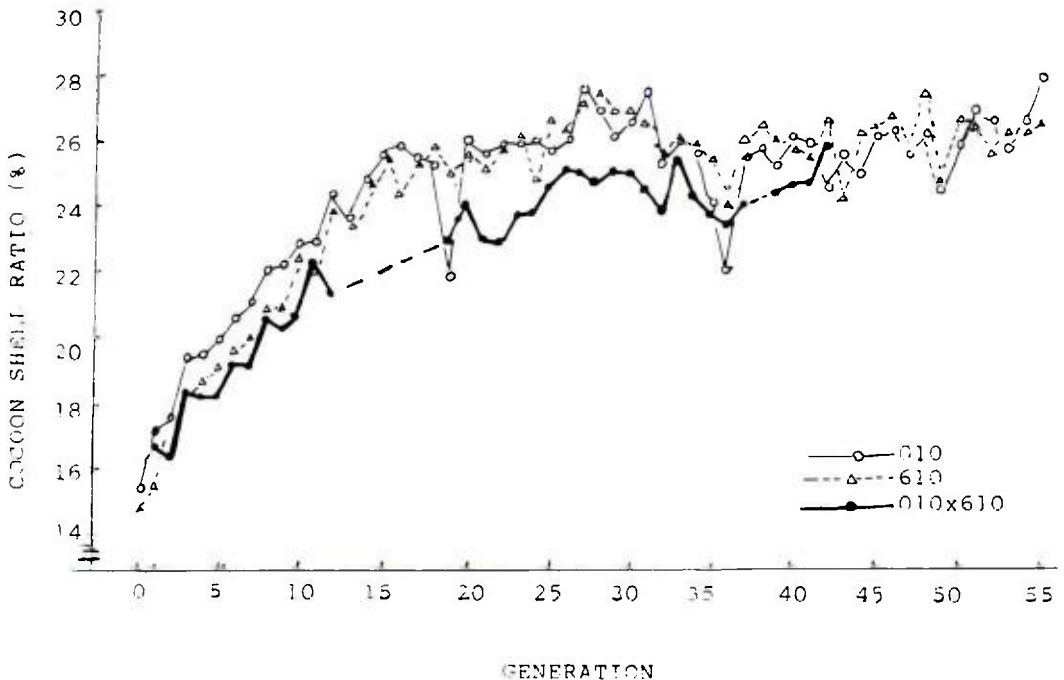


Fig. 6: Effect of selection for cocoon shell weight on cocoon shell ratio in 010 and 610 strains and their hybrid, 010 × 610.

Fig. 6 : Effet de la sélection du poids de la coque sur la richesse soyeuse chez les souches 010 et 610 et chez leur hybride 010 × 610.

Maruyama, 1984.

In another experiment, Suzuki and Miyahara (1961) crossed two different lines, namely 72 and MK, which were characterised by normal filament length and long filament length, respectively. The hybrid mean for filament length was nearer to the longer filament parent and the heterosis over MPV was substantial (Table XI). The mean values of the F_1 hybrid for filament length also showed a similar trend (Table XI). On the other hand, filament weight showed extensive heterosis over both MPV and better parent values (BPV) (Table XI).

Table X. Mean of characters and heterosis measured in 010 and 610 lines selected for cocoon shell weight and their hybrids.

Tableau X. Moyenne des caractères et de l'hétérosis mesurés chez les lignées 010 et 610 sélectionnées pour le poids de la coque et chez leurs hybrides.

Year Année	G	Cocoon weight (g) Poids du cocon (g)				Cocoon shell weight (cg) Poids de la coque (cg)				Cocoon shell ratio (%) Richesse soyeuse (%)			
		F ₁	010	610	H (%)	F ₁	010	610	H (%)	F ₁	010	610	H (%)
1927	0	-	2.20	1.71		-	33.8	25.3		-	15.4	14.8	
1928	1	2.19	2.31	1.76	7.6	36.5	39.4	27.3	9.5	16.7	17.2	15.5	2.1
1929	2	2.09	2.26	1.89	0.7	34.3	39.8	32.5	-5.1	16.4	17.6	17.4	-6.3
1930	3	2.44	2.27	2.01	14.0	44.7	44.1	36.3	11.2	18.3	19.4	18.1	-2.4
1931	4	2.45	2.80	2.22	-2.4	44.3	54.9	41.5	-8.1	18.1	19.6	18.7	-5.5
1932	5	2.66	2.69	2.29	6.8	48.5	53.8	43.7	-0.5	18.2	20.0	19.1	-6.9
1933	6	2.58	2.76	2.26	2.8	49.6	56.8	44.2	-1.8	19.2	20.6	19.6	-4.8
1934	7	2.55	2.89	2.34	-2.5	49.0	60.9	46.7	-8.9	19.2	21.1	20.0	-6.6
1935	8	2.69	2.83	2.23	6.3	55.4	62.3	46.6	1.8	20.6	22.0	20.9	-4.0
1936	9	2.82	2.89	2.31	8.5	57.2	64.1	48.3	1.8	20.3	22.2	20.9	-5.8
1937	10	2.49	2.48	2.00	11.2	51.2	56.6	44.7	1.1	20.6	22.8	22.4	-8.9
1938	11	2.68	2.79	2.14	8.7	59.7	63.9	46.9	7.8	22.3	22.9	11.9	-0.5
1939	12	2.49	2.39	1.89	13.7	53.2	58.2	47.3	0.9	21.4	24.4	23.8	-11.2
1946	19	2.36	2.01	1.82	23.2	54.1	44.0	45.6	20.8	22.9	21.9	25.1	-2.6
1947	20	2.81	2.60	2.32	14.2	67.4	67.8	59.3	6.1	24.0	26.1	25.6	-7.2
1948	21	2.52	2.32	2.13	13.3	57.9	59.3	53.7	2.5	23.0	25.6	25.2	-9.5
1949	22	2.98	2.68	2.44	16.4	68.2	69.5	63.5	2.6	22.9	25.9	26.0	-11.8
1950	23	2.62	2.35	2.04	19.4	62.0	61.0	53.2	8.6	23.7	26.0	26.1	-9.0
1951	24	3.00	2.42	2.31	26.9	71.7	63.1	57.5	18.9	23.9	26.1	24.9	-6.3
1952	25	2.60	2.41	2.16	13.8	63.9	62.2	57.6	6.7	24.6	25.8	26.7	-6.3
1953	26	2.79	2.69	2.35	10.7	70.1	70.2	62.0	6.1	25.1	26.1	26.4	-4.4
1954	27	2.55	2.60	2.17	6.9	63.9	72.0	59.1	-2.5	25.1	27.7	27.2	-8.6
1955	28	2.56	2.60	2.06	9.9	63.6	70.2	56.8	0.2	24.8	27.0	27.6	-9.2
1956	29	2.88	2.88	2.47	7.7	72.2	75.5	64.1	3.4	25.1	26.2	26.0	-3.8
1957	30	2.81	2.64	2.30	13.8	70.5	70.6	62.1	6.3	25.1	26.7	27.0	-6.5
1958	31	2.56	2.60	2.29	4.7	63.1	71.7	61.2	-5.0	24.6	27.6	26.7	-9.4
1959	32	2.67	2.60	2.26	9.9	63.5	65.7	58.1	2.6	23.8	25.3	25.7	-6.7
1960	33	2.93	2.73	2.42	13.8	74.6	71.0	63.5	10.9	25.5	26.0	26.2	-2.3
1961	34	3.14	2.79	2.45	19.9	66.2	71.7	63.6	12.6	24.3	25.7	26.0	-6.0
1962	35	3.08	2.93	2.54	12.6	73.2	70.7	65.0	7.9	23.8	24.1	25.6	-4.2
1963	36	2.48	2.29	2.20	10.5	58.1	50.3	53.1	12.4	23.4	22.0	24.1	1.5
1964	37	2.77	2.13	2.06	31.9	66.4	54.8	53.8	22.3	24.0	25.6	26.1	-7.2
1966	39	3.24	2.96	2.57	17.2	78.8	74.8	67.0	11.1	24.3	25.3	26.1	-5.5
1967	40	2.92	2.72	2.80	5.8	72.2	71.2	72.6	0.4	24.7	26.2	25.9	-5.2
1968	41	3.05	2.89	2.59	15.3	75.4	75.0	66.4	6.7	24.7	26.0	25.6	-4.3
1969	42	2.24	2.59	2.31	32.3	83.9	64.0	61.9	33.2	25.9	24.7	26.8	0.6

G: Generation / Génération.

H: Heterosis / Hétérosis.

(Maruyama, 1984)

Table XI. Mean of filament length, size and weight in parental lines, 72 and MK and their hybrids.*Tableau XI. Moyenne de la longueur, du titre et du poids de la bave chez les lignées parentales 72 et MK et chez leurs hybrides.*

Line	Filament length (m)	Filament size (d)	Filament weight (cg)
<i>Lignée</i>	<i>Longueur de la bave (m)</i>	<i>Titre de la bave (d)</i>	<i>Poids de la bave (cg)</i>
Parents			
72	690	2.43	20.34
MK	1322	1.61	25.97
Hybrids / Hybrides			
72 × MK (F _{1a})	1219	2.38	35.46
MK × 72 (F _{1b})	1157	2.38	32.61
Heterosis % / Hétérosis (%)			
F _{1a}	21.17	17.82	53.10
F _{1b}	15.00	17.82	40.80

(Suzuki and Miyahara, 1961)

Table XII. Mean of characters and heterosis measured in LFL and SFL lines and their hybrids.*Tableau XII. Moyenne des caractères et de l'hétérosis mesurés chez les lignées LFL et SFL et chez leurs hybrides.*

Characters <i>Caractères</i>	Lines <i>Lignées</i>		Interline matings <i>Croisements entre lignées</i>		Heterosis % <i>Hétérosis (%)</i>	
	LFL	SFL	LFL × SFL F _{1a}	SFL × LFL F _{1b}	F _{1a}	F _{1b}
Filament length / <i>Longueur de la bave (m)</i>	876	704	783	717	-0.89	-9.2
Denier	2.00	2.85	2.19	2.2	3.29	3.76
Single cocoon wt. / <i>Poids du cocon (g)</i>	1.375	1.345	1.416	1.349	4.17	0.80
Single shell wt. / <i>Poids de la coque (g)</i>	0.215	0.199	0.233	0.217	20.7	4.83
Cocoon shell ratio / <i>Richesse soyeuse (%)</i>						
Survival rate / <i>Taux de survie (%)</i>	56.25	68.06	73.12	74.97	17.64	20.06

SFL: Line selected for short filament / *Lignée sélectionnée pour une bave courte.*LFL: Line selected for long filament / *Lignée sélectionnée pour une bave longue.*

(Nagaraju and Pavankumar, 1995)

Table XIII. Mean of characters and heterosis measured in LFL and SFL lines and their crosses with an unrelated tester line.

Tableau XIII. Moyenne des caractères et de l'hétérosis mesurés chez les lignées LFL et SFL et chez leurs croisements avec une lignée témoin non apparentée.

Characters Caractères	Lines Lignées		Tester Témoin	Crosses Croisements		Heterosis (%) Hétérosis (%)	
	LFL	SFL		HLF × NB ₁₈ F _{1a}	SFL × NB ₁₈ F _{1b}	F _{1a}	F _{1b}
Filament length / Longueur de la bave (m)	876	704	870	1000	883	14.54	12.20
Denier	2.00	2.85	2.60	2.68	2.80	16.23	15.67
Single cocoon wt. / Poids du cocon (g)	1.375	1.345	1.668	1.723	1.679	12.93	11.48
Single shell wt. / Poids de la coque (g)	0.215	0.199	0.346	0.353	0.320	25.71	17.61
Cocoon shell ratio / Richesse soyeuse (%)							
Survival rate / Taux de survie (%)	56.25	68.06	47.50	66.40	72.08	23.81	25.14

SFL: Line selected for short filament / Lignée sélectionnée pour une bave courte.

LFL: Line selected for long filament / Lignée sélectionnée pour une bave longue.
(Nagaraju and Pavankumar, 1995)

The example is also available on how selection history of populations derived from the common genetic stock influences the manifestation of heterosis. Nagaraju and Pavakumar (1995) evaluated the crossing effects in the two lines selected divergently for long and short filament lengths for eleven generations from the same base population. The two lines selected for length of silk filament differed by 172 meters. The effect of accrued differences in filament length in the parental lines was seen in the hybrids of interline matings. The values of heterosis expressed as percentages of MPV are shown in Table XII. The hybrid mean was found to be below MPV for the selected trait, indicating the directional dominance of alleles from the line selected for shorter filament length (SFL). The effect of selection of length of filament was also evident in the selected lines when they were crossed with the common tester parent (Table XIII). the genetic differences observed in the line by virtue of selection corroborate the theoretical contention (Falconer, 1981) that subdivision of base population through inbreeding results in lines with different genic values. The directional dominance for the SFL probably reflects the history of past directional selection, towards increasing fitness as contended by Robertson (1955).

Table XIV. Manifestation of heterosis in trimoulter $\times$ tetramoulter and their reciprocal hybrids.

Tableau XIV. Manifestation de l'hétérosis chez un hybride trimuant $\times$ tétramuant et chez les hybrides réciproques.

Strains	Voltinism	Larval span (days:hr)	Single cocoon wt. (g)	Cocoon shell wt. (g)	Shell ratio (%)	Filament length (m)	Denier
<i>Souches</i>	<i>Voltinisme</i>	<i>Durée larvaire (jours:h)</i>	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Poids de la coque (g)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>	<i>Longueur la bave (m)</i>	<i>Denier</i>
Parents							
NB ₁₈ (Tetra.)	Bivoltine	22:22	1.754	0.338	19.2	909	1.3
MHMP(W) (Tri.*)	Polyvoltine	17:01	0.727	0.110	15.1	614	2.6
Hybrids / Hybrides							
NB ₁₈ $\times$ MHMP (W)							
Trimoulters* / Trimuants*		17:07	1.053	0.174	16.5	675	2.0
Heterosis (%) / Hétérosis (%)		-13.45	-15.11	-22.32	3.79	-11.36	2.56
Tetramoulters / Tétramuants		21:07	1.490	0.283	18.9	933	2.6
Heterosis (%) / Hétérosis (%)		5.32	20.11	26.34	10.20	22.50	33.33
MHMP(W) $\times$ NB ₁₈							
Tetramoulters / Tétramuants		22:02	1.555	0.288	18.5	901	2.1
Heterosis (%) / Hétérosis (%)		10.53	25.3	28.5	9.87	18.32	7.69

Tetra.: Tetramoulter / *Tétramuant*. **Tri.:** Trimoulter / *Trimuant*.

* Mean of only female individuals was taken since no male trimoulters were observed.

* *Les moyennes concernent uniquement les individus femelles car aucun mâle trimuant n'a été observé.*
(Singh *et al.*, 1989)

HETEROSIS IN RELATION TO MOULTINISM

Manifestation of heterosis in the crosses of trimoulter and tetramoulter strains has been studied (Yamamoto *et al.*, 1986; Singh *et al.*, 1990). Singh *et al.* (1990) observed negative heterosis in

trimoulter hybrid segregants for almost all the traits except denier (Table XIV). It is not surprising that negative heterosis was observed for all the traits, considering the fact that trimoulters have a shorter larval duration, spin smaller and lighter cocoons with a short filament length. On the other hand, tetramoulter segregant hybrids revealed a high degree of positive heterosis for all the traits except for filament length (Table XIV). In the reciprocal cross, i.e., trimoulter female $\times$ tetramoulter male, only tetramoulters of both sexes appeared (Table XIV). A high magnitude of heterosis for all the traits was observed in this hybrid. Similar results have also been reported by Morohoshi (1949) in univoltine $\times$ polyvoltine and bivoltine $\times$ bivoltine crosses. The appearance of only female trimoulters in the cross of tetramoulter $\times$ trimoulter is due to the sex-linked nature of the trimoulter gene and the non-appearance of trimoulters in the cross of trimoulter female (polyvoltine) $\times$ tetramoulter (bivoltine) is due to differences in the sex-linked maturity genes ($+^{lm}$, lm) in the parental strains which act in co-operation with moulting genes.

REFERENCES

- BARLOW R. (1981) Experimental evidence for interaction between heterosis and environment in animals. *Anim. Breed. Abst.*, 49, 715-739.
- CHANG K. Y., HAN K. S., MIN B. Y. (1981) Genetic studies on silkworm characters by diallel cross. II. Analysis of heterosis and combining abilities. *Seric. J. Korea*, 22, 1-7.
- CUNNINGHAM E. P. (1987) Present and future perspectives in animal breeding research. *In Proc. XV Int. Cong. Genet.*, New Delhi, India, Vol. 4, 169-180.
- DATTA R. K. (1984) Improvement of silkworm races (*Bombyx mori* L.) in India. *Sericologia*, 24, 393-415.
- DONALD H. P., RICHARDSON G. V., RUSSELL W. Y. (1977) Estimation of heterosis in crossbreed dairy cattle. *Anim. Prod.*, 25, 193-208.
- EHIOBU N. G., GODDARD M. E. (1989) Heterosis in cross between lines of *Drosophila melanogaster* selected for adaptation to different environments. *Theo. Appl. Genet.*, 77, 253-259.
- FALCONER D. S. (1981) Introduction to quantitative genetics. Second Ed., Longman, London.
- GAINES J. A., RICHARDSON G. V., CARTER R. C., McCLURE W. H. (1970) General combining ability and maternal effects in crossing three British breeds of beef cattle. *J. Anim. Sci.*, 31, 19-26.
- GAMO T. (1983) Biochemical genetics and its application to the breeds of the silkworm. *JARQ*, 16, 264-272.
- GAMO T., HIRABAYASHI T. (1983) Genetic analysis of growth rate, pupation rate and some quantitative characters by diallel cross in silkworm, *Bombyx mori*. *Japan J. Breed.*, 33, 178-190.
- GAMO T., OHTSUKA Y. (1980) Phylogenetic studies on the racial differences of the silkworm, *Bombyx mori*, on the basis of polymorphic genes in haemolymph proteins. *Bull. Sericult. Exp. Sta.*, 28, 15-50.
- GRIFFING B., ZSIROS E. (1971) Heterosis associated with genotype-environment interactions. *Genetics*, 68, 443-445.
- HARADA C. (1941) On the hybrid effect of economic characters in silkworm. *J. Sericult. Sci. Japan*, 18.
- HARADA C. (1952) On the double cross of the silkworms. *Japan J. Breed.*, 2.
- HARADA C. (1954) On the three-way cross of the silkworms. *Japan J. Breed.*, 3, 99.
- HARADA C. (1957) On the relation between commercial characters and their F_1 hybrids in *Bombyx mori*. *Proc. Int. Genet. Symp.*, 352-356.
- HARADA C. (1961) On the heterosis of quantitative characters in the silkworm. *Bull. Sericult. Exp. Sta.*, 17, 50-52.
- HARADA C., KIMURA K., AOKI H. (1961) On the effect of hybrid vigour on the quantitative characters concerned with reeling of cocoons. *Acta Sericologica*, 37, 42-45.
- HAYES (1952) Development of the heterosis concept. *In Heterosis*. (Ed. J. W. Gowen) 31, 49-63. Iowa State University Press, Ames.
- HIROBE T. (1968) Evolution, differentiation and breeding of the silkworm – the silk road, past and present. *Genetics in Asian Countries. XII Int. Cong. Genet.*, 25-36.

- HIROBE T. (1985) On the recent advancement of silkworm breeding in Japan. Tamagawa Univ., Japan, 157-167.
- JOLLY M.S. (1983) Silkworm breeding in India. *In* Silkworm Genetic and Breeding. Natl. Semin. Silk Res. Dev., Bangalore, India, 1-9.
- KNIGHT R. (1973) The relation between hybrid vigour and genotype and environment interaction. *Theo. Appl. Genet.*, 43, 311-318.
- KRISHNASWAMI S. (1978) New technology of silkworm rearing. CSRTI, Bull. no. 2, Central Silk Board, Bangalore, India, 1-23.
- KRISHNASWAMI S., JOLLY M.S., SUBBA RAO S. (1964) Diallel analysis of quantitative characters in multivoltine races of silkworm. *Indian J. Genet.*, 24, 213-222.
- LERNER I.M. (1954) Genetic Homeostasis. John Wiley and Sons Inc., New York.
- MARUYAMA T. (1984) Breeding of silkworm races 010 and 610 having more filament weight and filament length. *Tech. Bull. Sericult. Exp. Sta.*, 119, 53-70.
- MINAGAWA I., OHTSUKA T. (1975) Relationships of actual performance of double cross hybrids and predicted values based on the mean value of the single crosses concerned in the silkworm, *Bombyx mori*. *Japan J. Breed.*, 25, 251-257.
- MIYAHARA T. (1978) Selection of long filament length basic variety, MK – Effect of selection on the later generations. *Acta Sericologica*, 106, 73-78.
- MOROHOSHI S. (1949) Developmental mechanism in *Bombyx mori*. Meibundo, Tokyo.
- MURAKAMI A. (1989) Genetic studies on tropical races of silkworm (*Bombyx mori*) with special reference to cross breeding strategy between tropical and temperate races. 2. Multivoltine silkworm strains in Japan and their origin. *JARQ*, 23, 123-127.
- MURAKAMI A., OHTSUKI Y. (1989) Genetic studies on tropical races of silkworm, *Bombyx mori*, with special reference to cross breeding strategy between tropical and temperate races. I. Genetic nature of the tropical multivoltine strain, Combodse. *JARQ*, 23, 37-45.
- NAGARAJU J. (1990) Studies on some genetic aspects of quantitative characters in tropical silkworm, *Bombyx mori*. Ph.D. thesis, University of Mysore, India.
- NAGARAJU J., PAVANKUMAR T. (1995) Effect of selection on cocoon filament length in divergently selected lines of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Sericult. Sci. Japan*, 64, 103-109.
- NAGATOMO T. (1942) On the inheritance of the voltinism in the silkworm. *J. Sericult. Sci. Japan*, 13, 114-115.
- NAKADA T. (1970) Researches on the sex-linked inheritance of the cocoon weight of reciprocal crossings. *J. Fac. Agric., Hokkaido Univ.*, 56, 348-358.
- NAKADA T. (1972) Researches on the sex-linked inheritance of cocoon weight in silkworm, *Bombyx mori* L. 3. Variability of the backcrossed generation. *J. Fac. Agric., Hokkaido Univ.*, 57, 41-50.
- OHI H., MIYAHARA J., YAMASHITA A. (1970) Analysis of various practically important characteristics in the silkworm in early breeding generations of hybrids. Variation among strains, correlation between parents and offspring as well as relation between each character. *Tech. Bull., Sericult. Exp. Sta., MAFF*, 93, 39-49.
- OROZCO (1976) Heterosis and genotype environment interaction. Theoretical and experimental aspects. *Bulletin technique, Département de génétique animale, INRA*, 24, 43-52.
- OSAWA K., HARADA C. (1944) Studies on the F_1 hybrids of the silkworm. III. On the effect of heterosis. *Bull. Sericult. Exp. Sta.*, 12, 183-211.
- OSHIKI T. (1979) Studies on the sex-linked manifestation of the quantitative characters in *Bombyx mori*. IV. Relationship between the sex-linked quantitative characters and the corpus allatum hormone. *J. Sericult. Sci. Japan*, 480, 360-364.
- RAPUSSAS H.R., GABRIEL B.P. (1976) Suitable temperature, humidity and larval density in the rearing of *Bombyx mori*. *Philippine Agric.*, 66, 130-138.
- ROBERTSON I.W. (1955) Selection response and the properties of genetic variation. *In* Coldspring Harbour Symp. Quant. Biol., 20, 166-177.
- RUBAN P.S., CUNNINGHAM E.P., SHARP P.M. (1988) Heterosis and nutrition interaction in *Drosophila*. *Theo. Appl. Genet.*, 76, 136-142.
- SANG J.H. (1964) Nutritional requirements of inbred lines and crosses of *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res.*, 5, 50-67.

- SANTIAGO E., DIMINGUEZ A., ALBORNOZ J., PINEIRO R., IZQUIERDO J.I. (1989) Environmental sensitivity and heterosis for egg laying in *Drosophila melanogaster*. *Theor. Appl. Genet.*, 78, 243-248.
- SATHENAHALLI S.B., GOVINDAN R., GOUD J.V. (1989) Heterosis studies for some quantitative traits in silkworm, *Bombyx mori*. *Indian J. Seric.*, 28, 100-102.
- SHERIDON A.K. (1981) Cross breeding and heterosis. *Anim. Breed. Abst.*, 49, 131-144.
- SHIMIZU S. (1966) Comparison of heterosis between male and female progeny in the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Sericult. Sci. Japan*, 35, 133.
- SHULL G.H. (1948) What is "Heterosis"? *Genetics*, 33, 439-446.
- SINGH C., HIROBE T. (1964) Studies on the hybrid vigour of backcrosses in the silkworm with special reference to the crosses (tropical $\times$ Japanese) under different rearing temperatures. *Bull. Fac. Agric. Tamagawa Univ.*, 12, 43-53.
- SINGH R., NAGARAJU J., PREMALATHA V., RAO R.M., VIJAYARAGHAVAN R., GUPTA S.K. (1990) Heterosis analysis in the silkworm, *Bombyx mori*. *Sericologia*, 30, 293-300.
- SINGH R., NAGARAJU J., VIJAYARAGHAVAN K. (1989) Studies on the inheritance of trimoulters in the silkworm, *Bombyx mori*. *Curr. Sci.*, 58, 324-326.
- SMITH H.F. (1936) A discriminant function for plant selection. *Ann. Eng.*, 7, 240.
- SOHN K.W. (1983) Studies on variability in single, three-way and double crosses of silkworm, *Bombyx mori*. Dissertation submitted to CSRTI, Mysore, India.
- SUBBA RAO G., SAHAI V. (1990) Combining ability and heterosis studies in bivoltine strains of silkworm, *Bombyx mori* (L). *U.P.J. Zool.*, 9, 150-164.
- SUZUKI K., MARUYAMA K. (1961) On the inheritance of the length of cocoon filament and the size of cocoon filament in silkworm. *Acta Sericologica*, 37, 114-118.
- TAZIMA Y. (1988) A viewpoint on the improvement of Mysore breeds. Paper presented at International Congress for Tropical Sericulture, Bangalore, India.
- TAYADE D.S. (1987) Heterosis effect on economic traits of new hybrids of silkworm, *Bombyx mori*, under Marathwada conditions. *Sericologia*, 27, 301-307.
- TOYAMA K. (1906) Breeding methods of silkworm. *Sangyo shimpō.*, 158, 282-286.
- UDUPA S., GOWDA V. (1988) Heterosis expression in silk productivity of different crosses of silkworm, *Bombyx mori*. *Sericologia*, 28, 395-399.
- UEDA S. (1963) Studies on the effects of rearing temperature upon the health of silkworm larvae and upon the amount of cocoon silk produced. III. On the effect of lower rearing temperature. *J. Sericult. Sci. Japan*, 33, 34-42.
- UEDA S., KIMURA R., SUZUKI K. (1969) Studies on the growth of the silkworm, *Bombyx mori*. II. The influence of the rearing condition upon the larval growth, productivity of silk substance and eggs and boiled off loss in the cocoon shell. *Bull. Sericult. Exp. Sta.*, 23, 290-293.
- WATANABE H. (1960) Temperature effects on the heterosis of starvation resistance in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Sericult. Sci. Japan*, 29, 59-62.
- WATANABE H. (1961) Studies on difference in the variability of larval body and cocoon weights between single cross and three-way cross or double cross hybrids in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Sericult. Sci. Japan*, 30, 463-467.
- YAMAMOTO T., ENOKIJIMA M., KAMIJYOU I., FUKUSAWA M., NARUYAMA M., NAKAYAMA K., MIURA Y. (1986) Comparison of several quantitative characters between trimoulters and tetramoulters segregated from the F₁ hybrids between the dominant trimoulter and the tetramoulter strain in the silkworm. *J. Sericult. Sci. Japan*, 55, 467-471.
- YOKOYAMA T. (1957) On the application of heterosis in Japanese sericulture. *Proc. Internat. Symp. Suppl. Vol., Cytologia*, 527-537.
- YOKOYAMA T. (1973a) The history of sericulture science in relation to industry. *In History of Entomology*. R.F. Smith, T.E. Mittler and C.N. Smith (Eds.), *Ann. Rev. Palo Alto, California*, 267-284.
- YOKOYAMA T. (1973b) Studies on the improvement in the efficiency of egg production by means of polyhybridization. *Silk Sci. Res. Inst.*, 22, 6-35.
- YOKOYAMA T. (1979) Silkworm selection and hybridization. *In Genetics in Relation to Insect Management*. Worked papers, Rockefeller Foundation, 71-83.

L'HYBRIDATION ET L'HÉTÉROISIS CHEZ LE VER À SOIE *BOMBYX MORI*

J. NAGARAJU^{1*}, RAJE URS² & R.K. DATTA³

1. Seribiotech Research Laboratory, 8, West of Chord Road, Mahalakshimpuram Post, II Stage, Bangalore - 560 086, Inde.

2. Central Silk Board, United Mansions, No. 39 Mahatma Gandhi Road, Bangalore - 560 001, Inde.

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

INTRODUCTION

L'hybridation est couramment utilisée pour l'amélioration du ver à soie comme moyen d'exploitation de l'hétérosis (Osawa et Harada, 1944 ; Harada, 1949, 1952, 1954, 1957, 1961 ; Yokoyama, 1957 ; Harada et coll., 1961 ; Krishnaswami et coll., 1985). L'utilisation des hybrides a connu son premier essor avec le ver à soie japonais et le maïs américain bien que la vigueur hybride ait été exploitée légèrement plus tôt chez le ver à soie que chez le maïs. La première introduction d'hybrides F₁ et la démonstration de leur supériorité par rapport aux souches parentales revient à Toyama (1906) au Japon. Les hybrides issus de croisements d'origine chinoise et japonaise furent si bien acceptés par les fermiers que, dès 1919, plus de 90 % des oeufs produits étaient d'origine hybride et, en 1928, la totalité des oeufs étaient d'origine hybride (Yokoyama, 1973a). Le poids moyen de la coque soyeuse, légèrement inférieur à 20 cg en 1804, fut porté, après plusieurs sélections, à une valeur légèrement supérieure en 1910, puis augmenta rapidement et atteignit plus de 40 cg en 1932, lorsque l'utilisation des hybrides se généralisa au Japon (Hirobe, 1985). Ainsi, la démonstration était-elle faite du potentiel des hybrides et de la contribution phénoménale de la vigueur hybride à l'amélioration du ver à soie. Cependant, à la différence de nombreuses espèces végétales comme le riz, chez lequel on exploite au niveau commercial des lignées fortement consanguines, on utilise chez le ver à soie uniquement des hybrides de lignées fortement consanguines (Yokoyama, 1979 ; Chang et coll., 1981 ; Gamo et Hirabayashi, 1983) ou de souches différentes (Krishnaswami et coll., 1964). Le terme "hétérosis" a été créé par Shull en 1914 (cité par Shull, 1948) pour décrire l'augmentation de la vigueur des souches croisées par rapport à leurs parents quelle que soit la cause sous-jacente de ce phénomène.

Le ver à soie domestique *Bombyx mori*, élevé dans de nombreux pays en raison de son intérêt commercial, est largement répandu et est divisé en différentes races géographiquement bien définies (Hirobe, 1968). Ces races présentent des différences génétiques, physiologiques, éthologiques, morphologiques, biochimiques et quantitatives (Yokoyama, 1979 ; Gamo et Ohtsuka, 1980 ; Gamo, 1983). En outre, de nombreux programmes de sélection intensive visant à améliorer la productivité et la qualité de la soie ont permis d'obtenir un certain nombre de lignées consanguines (Jolly, 1983 ; Datta, 1984). On a également isolé de nombreuses lignées consanguines présentant une amélioration spécifique pour un caractère donné (Miyahara, 1978 ; Maruyama, 1984). Les relations entre le voltinisme, la mue et les caractères quantitatifs ont été assez bien décrites (Nagatomo, 1942 ;

* Auteur auquel doit être adressée la correspondance. Tél. : 0091-80-3324179, Fax : 0091-80-3320752.

Morohoshi, 1949 ; Nakada, 1970 ; Murakami, 1989 ; Murakami et Ohtsuki, 1989). L'influence de l'environnement sur la manifestation de ces caractères a été démontrée (Morohoshi, 1949 ; Harada et coll., 1961 ; Singh et Hirobe, 1964 ; Tazima, 1988 ; Nagaraju, 1990).

Le but de cet article est de faire brièvement la synthèse des différentes formes d'expression hétérotiques pour les caractères économiques du ver à soie.

LA VIGUEUR HYBRIDE EN FONCTION DES CARACTÈRES

Au cours des différents stades du développement du ver à soie, de nombreux caractères sont en relation avec les aspects qualitatifs et quantitatifs du rendement en soie (Ohi et coll., 1970). Les caractères manifestant une hétérosis élevée sont les suivants :

- a) la durée du nourrissage des hybrides est inférieure à la valeur des parents ou des parents moyens (MPV) ;
- b) le taux de mortalité est inférieur à celui des parents ;
- c) le taux de cocons double est plus élevé que celui des parents ;
- d) le poids du cocon est plus élevé que celui de la MPV ;
- e) les coques soyeuses sont plus lourdes que celles de la MPV ;
- f) la longueur de la bave est plus élevée que celle de la MPV ;
- g) le poids de la bave est plus élevé que celui de la MPV.

Les résultats de Osawa et Harada (1944) donnent les valeurs de la vigueur hybride pour différents caractères en prenant la MPV comme 100 (Tableau I).

D'après Harada (1957), l'hétérosis chez le ver à soie décroît dans l'ordre suivant : poids de la coque soyeuse (27,8 %), poids du cocon (25,9 %), taux de survie (23 %), épaisseur de la bave (denier) (20,7 %), longueur de la bave (19 %) et taux de croissance (11 %) (Fig. 1).

Cependant, les résultats obtenus par différents chercheurs sur l'ampleur de l'hétérosis pour les différents caractères ne concordent pas. Subba Rao et Sahai (1990) ont observé, à partir d'une étude sur 30 hybrides bivoltins $\times$ bivoltins, un niveau d'hétérosis significatif (14,25) pour le rendement en cocons, caractère qui est fonction à la fois du taux de survie et du poids du cocon, devant le poids du cocon (3,89) et le poids du cocon (3,08) (Tableau II). Une étude similaire portant sur six hybrides polyvoltins $\times$ bivoltins réalisée par Nagaraju (1990) montre que l'hétérosis est maximale pour le poids larvaire (13,93 %), devant le taux de survie (12,7 %) et le poids du cocon (8,7 %) (Tableau III).

Des études réalisées par différents chercheurs montrent que le degré d'hétérosis varie fortement en fonction des caractères considérés. L'ampleur des différences d'expression de l'hétérosis suggère que les souches parentales utilisées pour l'hybridation diffèrent par leur constitution génétique ; ce qui se reflète dans les différences marquées pour ce qui concerne l'origine, le voltinisme et les caractères quantitatifs comme la durée larvaire, le poids du cocon, le poids de la coque, la longueur de la bave etc. (Harada, 1957 ; Yokoyama, 1957 ; Krishnaswami et coll., 1964 ; Chang et coll., 1981 ; Gamo et Hirabayashi, 1983 ; Tayade, 1987 ; Sathenahalli et coll., 1989).

Harada (1961) a mis en évidence une relation fonctionnelle entre les MPV et des hybrides F_1 . Le degré d'hétérosis manifesté est inversement proportionnel à la MPV et est d'autant plus faible que la MPV est élevée. D'après Harada (1961), lorsque les caractères quantitatifs des parents sont améliorés par un trop grand nombre de sélections, ils deviennent plus homogènes pour les composants géniques et l'hétérosis tend ainsi à devenir plus faible, comme on l'a observé pour le poids du cocon (Fig. 2) et la longueur de la bave (Fig. 3).

De ce fait, les caractères des F_1 se rapprochent progressivement de ceux des parents, comme Hayes l'a observé chez le maïs. Sur ce point, Smith (1936) a également montré que le nombre de feuilles chez les F_1 de *Nicotiana rustica* est toujours inférieur à la MPV. On a attribué la cause de ce résultat à la prépondérance de gènes récessifs accumulés pour les caractères favorisés par la sélection.

L'HETEROSIS EN FONCTION DES SYSTEMES DE CROISEMENT

La vigueur hybride est meilleure chez les croisements simples de populations génétiquement distinctes et diminue progressivement selon le modèle suivant : $F_1 > F_2 > F_3 > F_4$, le phénomène d'hétérosis disparaissant en génération F_{14} environ chez le ver à soie (Hirobe, 1985).

Les variétés de ver à soie peuvent être combinées en croisements simples ($A \times B$), trois-voies $[(A \times B) \times C]$ et en croisements doubles $[(A \times B) \times (C \times D)]$. En général, les hybrides issus de croisements simples donnent un taux de vigueur hybride plus élevé que les hybrides trois-voies et les croisements doubles. Des études portant sur la variation des caractères quantitatifs chez des souches parentales et les hybrides de différents systèmes de croisement montrent que la variabilité pour les caractères quantitatifs est plus faible chez les croisements simples que chez les souches parentales, les croisements trois-voies et les croisements doubles (Watanabe, 1961 ; Sohn, 1983 ; Yokoyama, 1973b).

La plupart des travaux réalisés jusqu'à présent (Hirobe, 1985 ; Udupa et Gowda, 1988 ; Nagaraju, 1990) montrent que les hybrides issus de croisements trois-voies et de croisements doubles sont inférieurs aux hybrides issus de croisements simples. Des résultats obtenus par Nagaraju (1990) avec des croisements trois-voies (polyvoltins $\times$ bivoltins) $\times$ bivoltins et (polyvoltins $\times$ polyvoltins) $\times$ bivoltins (Tableau IV) corroborent ces études.

Cette différence entre hybrides issus de croisements simples, trois-voies et doubles peut s'expliquer par le fait que l'un des parents des hybrides trois-voies et que les parents des hybrides doubles sont eux-mêmes des individus F_1 . De plus, la population produite par les hybrides trois-voies et doubles constitue un mélange de génotypes qu'il est, en principe, possible d'obtenir par croisement simple mais différent des croisements simples pour les trois raisons exposées ci-dessous (Falconer, 1981).

a) Si les lignées croisées ont été sélectionnées et si la supériorité éventuelle résultant du croisement simple est due à des interactions épistatiques, cette supériorité sera en partie perdue dans les croisements trois-voies et doubles.

b) Il existe une variation génétique à l'intérieur des croisements ; ce qui entraîne une perte d'uniformité phénotypique.

c) la variance entre les croisements diminue ; en conséquence, les meilleurs hybrides trois-voies et doubles ne sont pas aussi performants que les meilleurs hybrides de croisements simples.

Donald et coll. (1977) et Gaines et coll. (1970) ont observé que la moyenne des hybrides trois-voies chez le bétail conserve seulement 40 % de l'hétérosis des hybrides F_1 . Dans une étude de synthèse de l'hybridation et de l'hétérosis chez différentes espèces animales, Sheridan (1981) conclut que ces résultats peuvent s'expliquer par le modèle de l'épistasie chez les parents. Des résultats obtenus par différents chercheurs sur l'hétérosis chez des hybrides de vers à soie issus de croisements simples, trois-voies et doubles tendent à corroborer le modèle de l'épistasie des parents.

Chez le type trois-voies, il est difficile de faire un choix entre les hybrides (japonais $\times$ japonais) $\times$ chinois et les hybrides (chinois $\times$ chinois) $\times$ japonais. Cependant, du point de vue de la qualité du fil de soie, le deuxième type d'hybride donne de meilleurs résultats (Yokoyama, 1973b). Le type croisement double (japonais $\times$ chinois) $\times$ (japonais $\times$ chinois) donne des cocons inégaux, de forme et de longueur variables par rapport au type (japonais $\times$ japonais) $\times$ (chinois $\times$ chinois) qui est généralement préféré (Tableau V) (Yokoyama, 1973b). L'effet du croisement s'exprime de manière différente en fonction de l'ordre de croisement et des caractères quantitatifs, en particulier le poids de la coque, chez les croisements (japonais $\times$ japonais) $\times$ (chinois $\times$ chinois). L'effet de croisement est maximal lorsque les souches parentales sont combinées dans l'ordre suivant : $(1 \times 2) \times (3 \times 4)$ avec $4 > 3 > 2 > 1$ pour le poids de la coque.

Actuellement, les souches de vers à soie améliorées qui donnent une bave plus longue tendent à pondre moins d'oeufs (Ohi et coll., 1970). Par ailleurs, chez les hybrides issus de croisements doubles, le rendement en oeufs par papillon femelle est supérieur de 30 % à celui des hybrides issus de croisements simples (Yokoyama, 1973b). L'utilisation d'hybrides issus de croisements doubles représente donc environ 40 % de l'exploitation totale au Japon alors que cette pratique n'est pas encore bien adoptée en Inde. Un modèle proposé par Minagawa et Ohtsuka (1975) permet de prédire la

performance des hybrides trois-voies et des croisements doubles à partir de la performance des croisements simples des lignées d'origine.

L'HETEROSIS CHEZ LES CROISEMENTS RECIPROQUES

Chez le ver à soie, de nombreux caractères quantitatifs sont étroitement liés à la nature du voltinisme, à la période de maturité, caractères dont on sait qu'ils sont liés au sexe (Nagatomo, 1942 ; Morohoshi, 1949 ; Nakada, 1970, 1972 ; Tazima, 1988). L'expression de l'hétérosis varie donc chez les croisements réciproques de souches de vers à soie qui diffèrent pour ce qui concerne le voltinisme et la période de maturité. Chez le croisement réciproque de polyvoltin $\times$ bivoltin, la valeur du mâle est supérieure à celle de la femelle pour le poids de la coque (Tazima, 1988) (Tableau VIa). En outre, chez le croisement réciproque polyvoltin $\times$ bivoltin, le poids du cocon, le poids de la coque, la longueur et le poids de la bave sont inférieurs à ceux obtenus pour les croisements directs (Tazima, 1988) (Tableau VIb).

Cependant, ces différences dans les croisements réciproques n'apparaissent pas chez les croisements utilisant des souches parentales d'un même voltinisme. Nakada (1970) a observé que la période larvaire des femelles était plus courte que celle des mâles chez les hybrides de croisements réciproques. Le développement plus rapide des femelles des hybrides a un effet négatif sur le poids de la coque (Morohoshi, 1949 ; Nakada, 1972). Nagatomo (1942) a émis le premier l'hypothèse que les gènes de maturité liés au chromosome Z jouent un rôle important dans les différences obtenues chez les hybrides réciproques puisque le gène de la maturité larvaire est étroitement corrélé à la taille du corps, au poids du cocon, au poids de la coque et au poids du corps. Par la suite, Morohoshi (1949) a proposé un modèle d'allélisme multiple des gènes de maturité : maturité précoce (l_m), intermédiaire ($+^{lm}$) et tardive (L_m). Dans ce modèle, si l'on considère que les polyvoltins possèdent un gène de maturité précoce et que les bivoltins portent un gène de maturité tardive ($+^{lm}$) sur le chromosome Z, dans un croisement polyvoltin $\times$ bivoltin et chez les hybrides réciproques, on peut escompter des différences pour la maturité et les caractères s'y rapportant. Bien que cette explication soit une version simplifiée de la réalité, il semble qu'un mécanisme génétique complexe impliquant le voltinisme, les gènes de maturité, la température d'élevage et des interactions hormonales agisse sur la manifestation de ces caractères (Oshiki, 1979).

HETEROSIS ET ENVIRONNEMENT

D'après le concept de l'homéostasie génétique (Lerner, 1954), les hétérozygotes sont vraisemblablement mieux protégés que les homozygotes contre les variations environnementales. De ce fait, on peut penser que les hétérozygotes présentent moins de variations que les souches parentales pour un même environnement ou pour des environnements différents. Le degré de manifestation de l'hétérosis obtenu pour un croisement donné peut donc être influencé par l'environnement (Barlow, 1981). Le concept selon lequel les interactions génotype-environnement affectent l'amplitude de l'hétérosis a été abordé par différents chercheurs chez plusieurs espèces animales (Sang, 1964 ; Griffing et Zsiros, 1971 ; Knight, 1973 ; Orozco, 1976 ; Ruban et coll., 1988 ; Santiago et coll., 1989 ; Ehiobu et Goddard, 1989).

En général, dans un environnement sain (impliquant une température optimale de 25 °C, des feuilles de mûrier à forte valeur nutritive, un espace d'élevage optimum, l'absence de germes, un système de ventilation et 70 à 75 % d'humidité relative), les souches de ver à soie parentales donnent de meilleurs résultats pour le rendement en soie et ses attributs (Krishnaswami, 1978 ; Rapussas et Gabriel, 1976 ; Ueda, 1963 ; Ueda et coll., 1969). En conséquence, la MPV s'approche des valeurs moyennes de l'hybride avec une légère différence. En fait, si l'une des souches parentales d'un croisement est une souche bivoltine performante et l'autre une souche polyvoltine, l'hétérosis par rapport à la souche performante sera négative lorsque les souches parentales et les hybrides sont élevés dans un environnement sain.

Par ailleurs, lorsque les souches parentales et les hybrides sont élevés dans un environnement défavorable (par exemple, une température supérieure à 31 °C), la moyenne des hybrides sera nettement supérieure à celle des souches parentales. Dans ce cas, l'hétérosis par rapport à la MPV et

aux valeurs des meilleurs parents sera plus élevée (Fig. 4). Cette condition est similaire au modèle dit "du temple grec" proposé par Cunningham (1987) pour les caractères présentant un degré d'hétérosis plus élevé en environnement défavorable. La moyenne de six hybrides issus de croisements simples de souches polyvoltines et bivoltines élevées à température optimale (25 °C) et élevée (31 °C) fait apparaître des différences d'hétérosis pour le taux de survie et les caractères du cocon (Tableau VII).

Les résultats obtenus par Watanabe (1960) sur l'hétérosis pour la résistance au jeûne à trois températures (13 °C, 20 °C et 31 °C) corroborent cette hypothèse. Dans son étude, les hybrides F₁ présentent une surdominance pour la résistance au jeûne à tous les âges larvaires et quelle que soit la température. Aux premiers âges, qui enregistrent une croissance supérieure à 30 °C, l'hétérosis est plus importante à 13 °C (47,3 %) qu'à 30 °C (24,8 %) mais elle est plus élevée chez les larves du cinquième âge à 30 °C qu'à 20 °C (30,4 %). Harada et coll. (1961) ont observé des différences hétérotiques marquées pour les caractères concernant le dévidage chez une population hybride de souches japonaises (N501 et 3 autres souches) et chinoises (C502 et 5 autres souches) élevées à différentes saisons et sur des années différentes (Tableau VIII).

DIFFERENCES SEXUELLES DANS LA MANIFESTATION DE L'HETEROSIS

Le degré de manifestation de l'hétérosis ne semble pas présenter de différence significative entre les sexes chez les descendants hybrides. Les résultats obtenus par Shimizu (1966) montrent que les femelles donnent une hétérosis légèrement supérieure à celle des mâles pour les poids de la coque et du cocon (Table IX).

L'HETEROSIS PAR RAPPORT A LA SELECTION DES CARACTERES QUANTITATIFS

L'exposé ci-dessus montre que l'hétérosis a été exploitée chez le ver à soie par croisement de races, de lignées consanguines et de races géographiques différentes. Cependant, on sait également que l'amplitude d'hétérosis est fonction de l'historique de la sélection des populations isolées pour différents caractères. Les travaux de Maruyama (1984) montrent que lorsque les deux lignées 010 et 610 sélectionnées pour le poids de la coque sur 55 générations (de 1928 à 1982) sont croisées entre elles, la moyenne de l'hybride pour le caractère sélectionné (poids de la coque) est plus proche de la moyenne du meilleur parent (Fig. 5) et les valeurs hétérotiques par rapport à la MPV ne sont pas significatives (Tableau X). Par ailleurs, le poids du cocon, caractère non sélectionné pour cette expérience, donne des valeurs moyennes supérieures qui excèdent la moyenne des deux souches parentales et présentent un degré d'hétérosis élevé, en particulier à partir de la 9^e génération de sélection (Tableau X). Du fait de l'augmentation de la moyenne pour le poids du cocon, la richesse soyeuse est plus faible que chez les deux parents et l'hétérosis par rapport à la MPV pour ce caractère est négative pour la plupart des générations (Table X, Fig. 6).

Dans une autre expérience, Suzuki et Miyahara (1961) ont croisé les lignées 72 et MK qui sont caractérisées respectivement par une longueur de bave normale et une longueur de bave élevée. La moyenne de l'hybride pour la longueur de la bave est plus proche de celle du parent donnant une longueur de bave élevée et l'hétérosis par rapport à la MPV est importante (Tableau XI). Les valeurs moyennes des hybrides F₁ pour la longueur de la bave présentent une tendance similaire (Tableau XI). Par ailleurs, la longueur de la bave donne une hétérosis élevée aussi bien par rapport à la MPV que par rapport à la valeur du meilleur parent (BPV) (Tableau XI).

Il existe également des exemples montrant comment l'historique de sélection des populations dérivées d'un stock génétique commun influence la manifestation de l'hétérosis. Nagaraju et Pavankumar (1995) ont évalué les effets de combinaison chez deux lignées sélectionnées de manière divergente pour des longueurs de bave longue et courte sur onze générations à partir d'une même population de base. Les deux lignées sélectionnées pour la longueur de la bave donnent une différence de 172 mètres. L'effet de l'accumulation des différences de la taille de la bave chez les lignées parentales se reflète chez les hybrides issus des accouplements entre lignées. Les valeurs de l'hétérosis, exprimées en pourcentage par rapport à la MPV, sont présentées dans le tableau XII. La moyenne

obtenue chez les hybrides est inférieure à la MPV pour le caractère sélectionné ; ce qui indique une dominance directionnelle des allèles de la lignée sélectionnée pour une longueur de bave courte (SFL). L'effet de la sélection de la longueur de la bave est également évident chez les lignées sélectionnées lorsqu'elles sont croisées avec un parent témoin commun (Tableau XIII). Les différences génétiques observées chez la lignée après sélection confirme la théorie (Falconer, 1981) selon laquelle la subdivision d'une population de base obtenue par accouplements consanguins donne des lignées présentant des valeurs géniques différentes. La dominance directionnelle pour la SFL reflète probablement l'historique de la sélection directionnelle antérieure, orientée vers une augmentation de la vigueur, comme l'affirme Robertson (1955).

L'HETEROSIS EN FONCTION DU TYPE DE MUE

On a étudié la manifestation de l'hétérosis chez les croisements de souches trimuantes et tétramuantes (Yamamoto et coll., 1986 ; Singh et coll., 1990). Singh et coll. (1990) ont observé une hétérosis négative chez des ségrégants hybrides trimuants pour la plupart des caractères, à l'exception du dernier (Tableau XIV). Ce résultat n'est pas étonnant si l'on considère que les trimuants ont une période larvaire plus courte, filent des cocons plus petits et plus légers et donnent donc une longueur de bave plus courte. En revanche, les ségrégants hybrides tétramuants présentent une amplitude d'hétérosis élevée pour tous les caractères, à l'exception de la longueur de la bave (Tableau XIV). Chez le croisement réciproque, c'est-à-dire femelle trimuante $\times$ mâle tétramuant, on obtient seulement des tétramuants des deux sexes (Tableau XIV). L'amplitude de l'hétérosis chez cet hybride est élevée pour tous les caractères. Des résultats similaires ont été obtenus par Morohoshi (1949) chez des croisements monovoltins $\times$ bivoltins et bivoltins $\times$ monovoltins. L'obtention de trimuants femelles uniquement chez le croisement tétramuant $\times$ trimuant est due à la nature du gène trimuant, qui est lié au sexe, et la non obtention de trimuants dans le croisement trimuant femelle (polyvoltin) $\times$ tétramuant mâle (bivoltin) est due à une différence des gènes de maturité liés au sexe (+^{lm}, lm) chez les souches parentales qui agissent en combinaison avec les gènes de mue.

INFLUENCE OF VARIOUS AGRONOMICAL PRACTICES IN INDIA ON THE LEAF QUALITY IN MULBERRY, A REVIEW

K.M. PUROHIT & T. PAVAN KUMAR

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

Keywords: Mulberry, leaf quality, cultivars, spacing, manuring, irrigation, mulching, pruning.

INTRODUCTION

Not only the quantity, but also the quality of the mulberry leaf, involving various physical, chemical/biochemical characters, are known to influence and condition silkworm rearing. However, sericulturists, in their enthusiasm to produce large quantities of leaves to brush more disease-free layings and to produce more cocoons, often overlook that bulk production of leaves is not always consistent with their high nutritional status. The present paper endeavours to review and bring together the salient research findings on the cultivation of mulberry conducive to silkworm rearing for the optimum yield of silk of superior quality and, therefore, focuses attention on leaf quality. The quality of the leaf in this context is not only dependent on the mulberry cultivars, but equally so on their cultivation practices. While doing so, the paper also discusses the inadequacies of research on several related aspects of cultivation practices, and suggests future lines of action.

PHYSICAL CHARACTERS OF MULBERRY LEAVES

Since palatability of the leaf to the young and late-age larvae is the single most important criterion; fresh, green and healthy leaves of softer texture are generally preferred by the silkworm who generally avoids the coarse, hairy and dry/withered leaves. However, leaf quality must conform to the stage-wise requirements of the silkworms (Anonymous, 1975; Ullal and Narasimhanna, 1987; Benchamin and Nagaraj, 1987). It is reported that feeding diseased leaves leads to unequal development of larvae and increased larval duration with deleterious effects on cocoon characters (Sullia and Padma, 1987; Siddaramaiah and Hegde, 1988; Umesh Kumar *et al.*, 1993). This may be attributed to the poor nutritive value of diseased leaves, which have reduced moisture, crude protein and sugar contents (Madhava Rao *et al.*, 1981; Sundareswaran *et al.*, 1988).

CHEMICAL/BIOCHEMICAL CHARACTERS

The biochemical constituents influencing the food value of leaves include moisture, protein, carbohydrates, fats, minerals, organic acids, vitamins, etc. (Anonymous, 1975). For young larvae, leaves containing a higher percentage of moisture, proteins and carbohydrates and lower levels of crude fibre and minerals are desirable; while for late-age larvae, those having comparatively low moisture and high protein contents are preferred (Ito and Kobayashi, 1978; Ullal and Narasimhanna, 1987). It is found that deficiency of certain nutrients or an imbalance of nutrients in the diet affects the digestibility and metabolic activity of larvae (Waldbauer, 1964; Ito, 1972). Hence, silkworm larvae should be fed on leaves containing balanced nutrient components comprising amino acids (proteins), carbohydrates, lipids, vitamins, minerals, etc. (Ito, 1978). The water content of fresh mulberry leaves determines the dietary efficiency — 75% water content being the most favourable. The best larval growth is attained with 20% amino acid diet but the rate of silk production is better with 25-30%

amino acids. The coefficient of digestibility of crude protein of mulberry leaves through all instars is about 62% (Ito, 1978). The carbohydrate content of mulberry leaves varies from 18-25% on a dry weight basis. Of the carbohydrates, an important component for healthy growth of the silkworm is sucrose which stimulates larval feeding, followed by fructose, raffinose and glucose at the same concentration (Ito, 1960). The lipid content of dry matter of mulberry leaves varies from 3 to 6%, the coefficient of digestibility of crude lipids being 58.5% through first to fifth instars. The silkworm accumulates more lipids in its body than the amount digested. A lipid-soluble factor, known as β -sitosterol, present in mulberry leaves accelerates larval biting action (Hamamura *et al.*, 1961). On an average, mulberry leaves contain 10% minerals on a dry weight basis, which varies according to the sample analysed. About 28% of the ingested minerals are retained as body substances throughout the larval period. Fresh mulberry leaves contain sufficient vitamin B complex (except vitamin B12) and vitamin C to sustain normal growth in the silkworm, although it varies depending on the season, mulberry cultivars and fertilisers used (Ito, 1978).

The nutritional composition of mulberry leaves is influenced by a number of factors such as the mulberry cultivars and their ploidy level, climatic conditions, growth and maturity of leaves, spacing, manuring, irrigation, mulching, pruning, time and method of leaf harvest, transport and storage of leaves, etc.

A critical review of the works done in India and elsewhere brings out the following observations:

MULBERRY CULTIVARS

The nutritive value of mulberry leaves varies from cultivar to cultivar and cocoon parameters depend upon mulberry cultivars (Hassanein and El Shaarawy, 1962a, 1962b), Kanva-2 being superior to Mysore local (Narayanan *et al.*, 1966), S₁ superior to Berhampore local and S₁₅ (Krishnaswami *et al.*, 1970b; Sengupta *et al.*, 1973), S₁, S₇₉₉ and BSRM-5 better than Jing, Lup-40 and Telia (Anonymous, 1989; Sarker *et al.*, 1991, 1992). Among the four cultivars of mulberry, i.e., Kanva-2, S₅₄, Kosen and LM-2 studied with regard to cocoon quality of two bivoltine races (NB₇ and NB₁₈) and a hybrid race (PM $\times$ NB₁₈) in the Marathwada region, S₅₄ proved superior, recording higher larval and single cocoon weights as also cocoon yield (Tayade and Jawale, 1984). Through bioassay-cum-biochemical studies conducted with eight cultivars of mulberry such as S₅₄, C₁, MR₂, Kajali, Roso, Kosen, Japan and M₅ (Kanva-2) at Tiruchirappalli, Tamil Nadu, Thangamani and Vivekanandan (1984) observed that the multivoltine silkworm crossbreed L $\times$ KA fed on leaves of MR₂ cultivar containing higher percentage of moisture (70.6%), crude protein (29.46%) and total mineral (17.93%) and medium total soluble sugar (9.78%) showed greater filament length and effective rate of rearing (ERR), suggesting thereby that the higher leaf protein content might have contributed to the greater filament length. They considered MR₂, C₁, S₅₄, Kajali and Roso (in order of preference) more suitable for silkworm rearing. Recently, Saratchandra *et al.* (1992b), through bioassay studies, found S₃₆, RFS-135 and C₇₇₆ to be qualitatively superior to other cultivars like English Black, Sujampur-5, S₇₉₉, S₅₄ and Kanva-2.

The food value of mulberry cultivars generally depends upon the nutrient contents of leaves (Ito and Arai, 1963). Fukuda *et al.* (1959) reported that about 70% of silk protein produced by the silkworm was directly derived from the mulberry leaf protein. However, Gabriel and Rapsuas (1976), Pillai and Jolly (1985) and Raju *et al.* (1990) observed that higher protein content of mulberry cultivars did not reveal any significant improvement in cocoon characters. Although Pillai and Jolly (1985) found relatively less crude protein (20.8%) and total minerals (12.42%) in MR₂ than in K₂ (22.74% protein and 17.10% minerals), they confirmed the superiority of MR₂ cultivar with regard to cocoon parameters. Raju *et al.* (1990) considered cultivar S₃₀ as superior to S₄₁ vis-à-vis larval development and cocoon, although they found less moisture (68.87%), carbohydrate (25.3%), crude protein (20.29%), free amino acids (37.8%) and minerals (11.33%) in S₃₀ than in S₄₁ (the corresponding values respectively being 69.84%, 27.80%, 22.12%, 41.2% and 13.0%). Nonetheless, the findings of Thangamani and Vivekanandan (1984) and Bose *et al.* (1991) that MR₂ contains a higher amount of crude protein and minerals than K₂, and S₃₀ contains more moisture and crude protein than S₄₁ run

counter to Pillai and Jolly (1985) and Raju *et al.* (1990). The differences in their findings might be due to the variations in edapho-climatic conditions.

Polyploidy also plays an important role in influencing the leaf quality of mulberry. The tetraploid and triploid forms of mulberry containing higher amounts of moisture, total nitrogen, protein, carbohydrate and vitamins, are reported to have better quality leaves than the diploids (Seki and Oshikane, 1959; Tojyo, 1966; Mustafaev, 1968, 1970; Dzhaferov and Alekperova, 1978). Seki and Oshikane (1959) and Dzhaferov and Gadzhiev (1973) recorded shortened larval period and higher survival rate, weight of larvae, single cocoon weight, filament length with uniform denier and fecundity, when the silkworms were reared with tetraploid leaves compared to those fed on leaves of triploids and diploids. Mustafaev (1968, 1975) reported that the tetraploid mulberry leaves increased the cocoon weight by 4.4-9.1% and raw silk yield by 5-15%, while the triploid forms enhanced these characters by 2.3-6.6% and 0.2-6.2%, respectively, over the diploids. The same author (1968) also observed that the triploid forms increased the survival rate of silkworms by 1.4-2.0% and reduced the larval duration by 1.0-2.5 days compared to diploids. The reduction in larval duration and increased survival rate might be due to higher nutrient content in triploid leaves, favouring faster growth and development of silkworms with a better disease-resistance capacity.

Nevertheless, Badalov (1971), Das and Prasad (1974) and Sarkar *et al.* (1983) found the triploid mulberry to be qualitatively better than the diploids and tetraploids. Through chemo- and bioassay studies, while Das and Prasad (1974) found the triploids Tr₁₀ and Tr₈ to be qualitatively superior to the tetraploids T₁ and T₂₀ and the diploid Berhampore local, Sikdar (1993) established the triploids G₉, G₇ and G₃ as qualitatively better than the diploids OP₂, S₃₆, S₄₁ and Kanva-2. A feeding trial of a bivoltine hybrid KPG-B × P₅ on certain mulberry cultivars in West Bengal proved the triploid Tr₄ as the best, recording 5.8, 36.8, 46.38, 11.11, 10.05 and 43.28% gain in larval weight, ERR (number), ERR (weight), single cocoon and shell weights and absolute silk content, respectively, over the diploid Berhampore local (Anonymous, 1989). The triploids Tr₁₀, S₁₆₃₅ and C₁₇₃₀ also showed better performance.

Again, with the increase in ploidy level beyond tetraploid, the leaf quality deteriorated and in higher ploids such as the 12-ploid, Russian cultivar 1-16/50, the worst quality of leaf was reported (Dzhaferov and Gadzhiev, 1973).

However, Lombardi (1960) working with the Japanese cultivars, Kokuso 20, 21, 27, and a local mulberry cultivar of Italy as also Das and Sikdar (1970) using S₁₅, S₁₂₅, S₁₆₂ and a local cultivar of West Bengal, India, did not find the effect of mulberry cultivars on cocoon parameters. The differences in the nutrient contents of these cultivars might not have been sufficient to be manifested in the cocoon parameters.

The above review suggests that qualitatively better cultivars like MR₂, Tr₄, Tr₁₀, S₁₆₃₅, C₁₇₃₀, G₉, G₇, S₃₀, S₃₆, S₄₁, S₅₄, S₁, etc., may be fully exploited by the sericulturists to improve the cocoon yield and quality.

CLIMATIC CONDITIONS

Being influenced by the climatic factors, the nutritional quality of mulberry leaves varies from season to season (Yokoyama, 1962; Krishnaswami, 1986; Sarker *et al.*, 1992; Quader *et al.*, 1992). In the dry summer season, the leaves grow and mature rapidly but wither quickly due to a lower moisture content. In the rainy season, although the leaves grow and mature fast, they contain maximum moisture because of the saturated moisture content in the soil and higher atmospheric humidity and hence do not wither easily. But then, in the winter season, the growth of mulberry being comparatively slower due to reduced metabolic activities effected by lower soil and environmental temperature, the leaves mature gradually. Such leaves, containing optimum moisture, neither wither nor increase the humidity of the rearing bed. Sarker *et al.* (1992) observed maximum protein and soluble carbohydrates during May-June and least mineral and crude fibre contents during spring (February-March) harvests. Feeding trials with the silkworm race MBD-5 made in West Bengal during June-July, July-August, September-October, November-December, December-January and February-March showed the highest larval weight, ERR (number and weight), and absolute silk content during February-March, followed by the December-January rearing (Sengupta *et al.*, 1971). It indicates that the climatic

conditions in West Bengal during February-March is more conducive to silkworm rearing than in other seasons.

GROWTH AND MATURITY

Quality differences due to leaf maturity among tender, medium and mature leaves were reported (Ito and Arai, 1963; Arai and Ito, 1963; Narayanan *et al.*, 1967). Tender leaves contain higher percentages of moisture, protein and total carbohydrate but lower amounts of fat, minerals and crude fibre, compared to mature and declining leaves (Sreedhara *et al.*, 1988; Anonymous, 1989; Rupa *et al.*, 1993). Sreedhara *et al.* (1988) also observed maximum chlorophyll content between the 30th and the 48th day, non-reducing sugars between the 24th and the 42nd day and reducing sugars between the 13th and the 30th day of leaf development; these gradually declined with the increase in the age of the leaf. From the silkworm nutrition point of view, one-month-old mulberry leaves were found to be qualitatively superior to two-month-old leaves, which, in turn, were superior to three-month-old leaves (Fonseca *et al.*, 1972). In general, young silkworms are fed on tender leaves containing a high percentage of moisture (80-82%) to facilitate easy ingestion and late-age larvae on mature leaves having a comparatively low moisture content (73-75%), while over-mature and yellow leaves with poor nutrient contents are discarded (Anonymous, 1975; Ito and Kobayashi, 1978; Ullal and Narasimhanna, 1987). Gabriel and Rapsuas (1976) found that the larvae of the first three instars fed on tender leaves and last two instars on mature leaves led to robustness and gain in weight compared to those continuously fed on either young or old leaves throughout the larval period. However, it is reported that feeding the silkworms on tender leaves throughout the larval period did not have any deleterious effect on cocoon crop, rather it reflected positively on the larval weight, ERR, cocoon and shell weights, filament length, total silk content, etc. (Narayanan *et al.*, 1967; Krishnaswami *et al.*, 1970a; Askari and Sharan, 1982; Anonymous, 1991). Despite the above, feeding young silkworms on tender leaves and late-age larvae on mature leaves gained wider acceptance among sericulturists. This lends credence to the tenet that the growth phases of the silkworm having been explicitly compartmentalised, nutrition requirements need to be supportive (Ito and Kobayashi, 1978).

SPACING

Differences in spacing have an influence on the biochemical constituents of mulberry. The widely spaced plants receive adequate supply of sunlight, nutrients and water, unless the spacing is too wide to cause the hazardous drying out of soil, thereby creating a favourable condition for the formation of biochemically important substances. Thus the nutritive value of leaves grown under wider spacing is comparatively better than those grown under closer spacing. A higher crude protein content was reported in the leaves of mulberry grown with a spacing of $90 \times 90 \text{ cm}^2$ than those with a spacing of $90 \times 60 \text{ cm}^2$, while the moisture and total mineral contents were higher in $90 \times 60 \text{ cm}^2$ spacing than those with $90 \times 90 \text{ cm}^2$ (Krishnaswami *et al.*, 1970c). Choudhury *et al.* (1991) also observed significantly higher soluble and crude protein contents in the leaves of irrigated mulberry grown with a spacing of $60 \times 60 \text{ cm}^2$ than in those grown with a spacing of $60 \times 30 \text{ cm}^2$, the leaf yield being at par. Das *et al.* (1993) reported a significant improvement in leaf-cocoon ratio and absolute silk content when silkworms were fed on leaves of rainfed mulberry grown at $120 \times 90 \text{ cm}^2$ spacing compared to those with $90 \times 90 \text{ cm}^2$ spacing, the yield being at par. However, Sengupta *et al.* (1973) did not find any significant effect of spacings ($45 \times 7.5 \text{ cm}^2$, $45 \times 23 \text{ cm}^2$ and $45 \times 45 \text{ cm}^2$) in mulberry cultivation on the cocoon yield and quality. On the other hand, Krishnaswami *et al.* (1971) observed a significant increase in the larval and cocoon weights, ERR (by number and weight) and absolute silk content by feeding mulberry leaves grown under closer plant spacing ($45 \times 7.5 \text{ cm}^2$) compared to wider spacing ($45 \times 45 \text{ cm}^2$). But they did not furnish any suitable explanation to that effect. In fact, faced with such conflicting reports and in the absence of a comprehensive bioassay-cum-biochemical study, it is rather hard to explain the effect of spacing on leaf quality. Pending further confirmation on the findings of Das *et al.* (1993), $90 \times 90 \text{ cm}^2$ spacing for rainfed (Krishnaswami, 1986a) and $60 \times 60 \text{ cm}^2$ spacing for irrigated mulberry (Choudhury *et al.*, 1991) are popularly practised by sericulturists in India.

MANURING

Improvement in the nutritional quality of mulberry leaves in terms of increased leaf moisture, crude protein and carbohydrate and decreased mineral contents through the use of nitrogenous fertilisers was reported by Pain (1965), Sengupta *et al.* (1972, 1973), Ray *et al.* (1973) and Quader *et al.* (1990). Foliar spray of 0.5% urea solution also effectively improves these biochemical contents of leaves (Quader *et al.*, 1992). Further, bioassay studies revealed that feeding silkworms on leaves grown under 200 kg N/ha/yr significantly increased the larval weight, single cocoon and shell weights, filament length and denier (Narayanan *et al.*, 1966; Sidhu *et al.*, 1969). A significant correlation between the nitrogen content in the leaf and the silkworm body weight, cocoon and shell weights was also observed by Sudo *et al.* (1981). It is generally conceived that mulberry leaves produced with high doses of nitrogenous fertilisers are bad in quality (Yokoyama, 1962). However, Krishnaswami *et al.* (1971) and Sengupta *et al.* (1972) reported that application of as high as 900 kg N/ha/yr to mulberry did not cause any deleterious effect or result in cocoon crop failure, rather it improved the cocoon yield and quality. The latter workers also observed that although it tended to increase the protein content of the leaf and enhanced the yield by about 6% for every additional 100 kg N/ha (beyond 300 kg), there was no pronounced effect of the levels of nitrogen beyond 300 kg/ha/yr on the cocoon parameters.

Several recommendations were made for producing good quality and quantity of leaves. In south India, the general recommendation is application of 10 tonnes of farmyard manure (FYM)/ha/yr in a single dose and NPK @ 100:50:50 kg/ha/yr with N in two equal split-doses for rainfed mulberry (Kasiviswanathan *et al.*, 1977a; Krishnaswami, 1986a), while under irrigated conditions it is recommended to apply FYM @ 20 tonnes/ha/yr as a basal dose and NPK @ 300:120:120 kg/ha/yr with N in five equal split-doses and P and K in two equal split doses (Kasiviswanathan *et al.*, 1977b; Krishnaswami, 1986a). Recently, Das *et al.* (1993) reported that under rainfed conditions application of NPK @ 150:50:25 kg/ha/yr significantly increased the leaf yield over the NPK dose of 100:50:50 kg/ha/yr, the leaf quality being similar. In West Bengal, for irrigated mulberry, application of 22 tonnes of FYM/ha/yr and NPK @ 336:180:112 kg/ha/yr with nitrogen in four equal split-doses is recommended (Ray *et al.*, 1973). For the Jammu and Kashmir region, Fotedar *et al.* (1988) advocated to apply 400 kg N and 50 kg K/ha/yr with N in three equal split-doses along with 20 tonnes of FYM/ha/yr in a single dose. The variation in fertiliser dose might be attributed to differences in the native soil fertility, agro-climatic conditions and the soil moisture regimes (rainfed or irrigated) encountered in the various sericultural zones.

Further, the nutrition requirements of young- and late-age larvae being different, for young silkworms, it is desirable that the supply of nitrogenous fertilisers to mulberry be decreased to a certain extent and phosphorus and potash along with farmyard manure be applied in sufficient quantity to harvest leaves having relatively high concentration of carbohydrates (Anonymous, 1975). It is reported that application of 40 MT FYM/ha/yr in two equal split-doses and NPK @ 225:150:150 kg/ha/yr in eight equal split doses corresponding to eight crops (at 45 days' intervals), under irrigated conditions in Karnataka, besides producing 29 tonnes of chawki (young larva) leaf/ha/yr containing 80% moisture, 25% crude protein and 13% total sugar (as against 6-7 tonnes chawki leaf/ha/yr having 76% moisture, 21% crude protein and 11% total sugar, obtained from a general mulberry garden), resulted in the highest moulting in silkworms even after reducing the number of feeds (Mishra *et al.*, 1993).

There is no recommendation whatsoever of manurial and fertiliser dose with respect to rainfed mulberry in West Bengal and for that matter in eastern India, except for applying the dose recommended for south India in toto. Further, most of the works are not based on the NPK uptake by mulberry which needs to be taken care of while fixing the dose.

IRRIGATION

It is reported that irrigation, in addition to enhancing the leaf production of mulberry by 68%, improved its quality (Kasiviswanathan and Iyengar, 1965). Feeding silkworms on leaves grown under irrigated conditions increased the larval weight, single cocoon and shell weights as also denier

(Narayanan *et al.*, 1966), indicating thereby the superiority of irrigated mulberry over those cultivated under rainfed dry farming conditions. Nevertheless, Mukherjee *et al.* (1972) observed no appreciable change in protein, sugar and mineral contents, although they found increased leaf moisture and starch due to irrigation. On the other hand, Rangaswami *et al.* (1976), Narasimhamurthy *et al.* (1987) and Anonymous (1989) reported that the leaves obtained from irrigated mulberry contained higher leaf moisture, total protein, total carbohydrate and lipids and were more nutritious compared to those obtained from rainfed mulberry.

To produce good quality and quantity of leaves it is advocated to apply 3.81-5.08 ha cm of water by the furrow method, at 10 days' interval for sandy loam soil and at 15 days' interval for clayey loam soil, during December to April in south India (Krishnaswami, 1986a; Choudhury and Giridhar, 1987), while in West Bengal application of 4.57 ha cm of water for clayey loam soil at fortnightly intervals between December and May is recommended (Mukherjee *et al.*, 1972). The variation in the level and interval of irrigation is due to the higher water holding capacity of the clayey loam soil compared to the sandy loam soil. It is also reported that drip and sprinkler systems of irrigation besides saving 33% of irrigation water produced similar quality and quantity of leaves compared to the furrow method with 3.81 ha cm of irrigation (Saratchandra *et al.*, 1992a). The same authors (1992a) further reported that bioassay studies with leaves obtained from different systems and levels of irrigation did not reveal any significant variation in the cocoon yield parameters except shell ratio percentage, indicating little or no variation in leaf quality.

No recommendation has been forthcoming as to the level, method and interval of irrigation for the red lateritic zone of West Bengal, which needs urgent attention.

MULCHING

Under rainfed conditions, soil surface mulching along the inter- and intra-row spaces of mulberry with black polyethylene, paddy straw, dry mulberry twigs, thatch grass, water hyacinth and coconut leaf, in addition to conserving the soil moisture by 1.34-6.3% and enhancing the leaf yield by 24.2-48.0% (under the first three mulches) and 46.5-58.3% (under the last three mulches), improved the leaf moisture content by 1.39-1.76% compared to bare soil (Purohit *et al.*, 1990, 1992). The dry weed and black polyethylene mulches also increased the total leaf nitrogen content by 10.9 and 2.2%, respectively, yet bioassay studies did not reveal any significant improvement in larval development and cocoon characters except silk ratio (under black polyethylene mulch) over the control (Das *et al.*, 1990).

A full-proof study on the leaf quality of mulberry due to mulching is lacking.

PRUNING

The quality of mulberry leaves differs due to different cultivation forms (Dasgupta, 1961; Bhuyian, 1981). Tree mulberry leaves are richer in crude protein, soluble carbohydrate and crude fibre and poorer in moisture content compared to the leaves obtained from bush mulberry (Anonymous, 1975; Qaiyyum *et al.*, 1991). It was also reported from Japan that in tree mulberry pruning of the top one-third of young summer shoots, which developed following the shoot harvest in July, increased the chlorophyll, total soluble protein, ribulose biphosphate carboxylase (RuBPCase), RNA and starch content in the leaves, while in the old shoots that had developed since spring, a similar type of pruning in late summer produced no appreciable change except in the RNA content (Yamashita and Fujino, 1986). Reduced leaf output and higher moisture content (74.5%) were observed in dwarf mulberry (height of main stem 90 cm) when the branches on the head of the main stem were pruned to the base, compared to the unpruned control and those pruned at 1.0-1.25 m length, suggesting thereby that lower cuts (0.0-0.75 m) are good for chawki rearing and longer cuts (1.0-1.25 m) for third instar rearing (Koul and Bhagat, 1991). Further, in view of the differences in biochemical constituents of bush and tree mulberry leaves it was suggested to feed the young larvae on leaves from bush forms and the late-age larvae on those from tree mulberry (Qaiyyum *et al.*, 1991). However, Rahman and Mandal (1977) found no effect of tree, low-cut and bush mulberry leaves on the weight of silkworm larvae, race Nistari.

The height and frequency of pruning in bush mulberry also influence the quality of leaves. Sudradjat (1989) observed that although pruning at different heights (20, 70, 120 cm) did not influence the quantity of leaves, pruning at a height of 70 cm produced leaves containing more protein, calcium and phosphorus compared to those pruned at 20 and 120 cm above ground level. Choudhury *et al.* (1991) reported higher leaf yield and significant increase in soluble sugar and protein contents in leaves with the increase in crown height up to 40 cm above ground level and by adopting the step-up method of shoot harvest with a base cut once a year. A similar trend in the level of soluble sugar and starch in the leaf of mulberry pruned at 35 cm above ground level vis-à-vis basal pruned plants was observed by Sen *et al.* (1991). Further, the survival rate, cocoon yield and absolute silk content of bivoltine hybrid silkworms (NB₁₈ × NB₇) were reported to have significantly increased by 11.5, 17.0 and 18.0%, respectively, by feeding the young- (first to third instars) and late-age (fourth to fifth instars) larvae on leaves from high stem (35 cm above ground level) and basal pruned plants, respectively, compared to those fed on leaves from basal pruned plants throughout the larval life (Vinod Kumar and Benchamin, 1990).

As regards the frequency of pruning, Krishnaswami *et al.* (1970c) observed that mulberry pruned three times (February, June and October) besides giving higher yield, produced leaves with high concentrations of protein and carbohydrate compared to two and four times pruning. Yet, the recommendation of one bottom pruning for rainfed mulberry with wider spacing (90 × 90 cm²) and five bottom prunings for irrigated mulberry with closer spacing (Kasiviswanathan and Krishnaswami, 1979; Choudhury and Giridhar, 1987) received wider acceptance among sericulturists. However, recent studies in West Bengal revealed that bottom pruning during May and August and leaf plucking in February and November in irrigated mulberry with a spacing of 60 × 60 cm², besides enhancing leaf yield by 10% over the common practice of four bottom prunings, produced similar leaf quality (Anonymous, 1991).

The latest findings of Choudhury *et al.* (1991), Sen *et al.* (1991) and Anonymous (1991) need further confirmation.

TIME AND METHOD OF LEAF HARVEST

It is said that due to active transpiration and photosynthesis the leaves harvested late in the afternoon contain comparatively less moisture and more carbohydrates and such leaves wither more readily than the leaves harvested early in the morning (Ullal and Narasimhanna, 1987). However, from the overall results of six rearings with leaves collected at 6 a.m., 12 noon and 4 p.m., and preserved in an underground leaf chamber, Sengupta *et al.* (1971) reported that the time of leaf harvest had no significant effect on the larval and cocoon characters except that the leaves harvested in the afternoon had a significant effect only on the yield per 10,000 larvae. But considering the seasons, they found that the leaves harvested in the afternoon had a significant effect on the qualitative and quantitative characters of the cocoons during the hotter seasons (June-July, July-August) and not in the cooler seasons (October-November to February-March). This may be attributed to possible higher accumulation of nutrients during the day and faster breakdown during the night in the hotter months whereas during winter such variation might be little due to very low temperature.

Regarding the method of leaf harvest vis-à-vis leaf quality, Kasiviswanathan *et al.* (1973) reported that the detached leaves (leaf plucking) led to more moisture loss compared to intact leaves (shoot harvest). Silkworms fed on plucked leaves up to the second instar (chawki rearing) and then shoot feeding from the third instar onwards showed better larval development, cocoon yield and quality than those fed on plucked leaves throughout the larval life (Anonymous, 1986).

TRANSPORTATION AND PRESERVATION OF LEAVES

Often a considerable delay is caused between leaf harvesting and silkworm feeding during rearing. If not properly stored, the leaves lose their moisture and become unsuitable for feeding the silkworm. Therefore, individual leaves should be kept in a bamboo basket lined with and covered with a wet gunny cloth while harvesting and transporting to the rearing house. The shoot soon after the harvest should be covered with a wet gunny cloth or polythene sheet. Kasiviswanathan *et al.* (1973)

reported that the loss of moisture being much less, the leaves remained succulent with 74.95% moisture under a wet gunny cloth and 68.7% under polythene cover even after 24 hr of storage. Earlier, Mandal and Krishnaswami (1965) observed no appreciable changes in sugar and protein contents in the leaves during a period of storage up to 24 hr. However, Narasimhamurthy *et al.* (1987) found a significant decrease in total protein and carbohydrate contents of leaves after 12 hr of preservation (in a leaf chamber) although there was no appreciable change in the polysaccharide and lipid contents vis-à-vis fresh leaves. The reduction in protein and carbohydrate contents of leaves might be due to increased proteolysis (breakdown of protein to amino acids) and consumption of a certain amount of carbohydrates for oxidative metabolism during respiration. The loss of moisture in harvested mulberry leaves also varies from variety to variety. Sastry *et al.* (1988) reported that the loss of moisture content in harvested mulberry leaves within 7 hr (9 a.m. to 4 p.m.) was least in S₃₀ (17.16% $\pm$ 0.94%) followed in ascending order by S₃₆ (23.17% $\pm$ 0.98%), S₅₄, S₄₁, K₂ and local mulberry variety.

DISCUSSION AND SUGGESTIONS

The above review reveals certain lacunae in our knowledge of leaf quality in mulberry. Further research should, therefore, be undertaken in the following aspects in order to bridge the gap/confirm/alter the findings/suggestions made by several workers.

(i) Certain mulberry cultivars were tested for their yield and quality exclusively in south India, while others were tried only in West Bengal/eastern India. The qualitatively better cultivars of both regions should be brought together and subjected to multilocal trial to have a comparative and consolidated account on their yield and quality vis-à-vis rearing performance. It appears that although some of the cultivars such as MR₂, Tr₄, Tr₁₀, S₁₆₃₅, S₁, C₁₇₃₀, C₇₇₆ and Tr₈ (27,000-35,000 kg leaf/ha/yr) produce superior quality leaves, their yield is less than that of S₃₀, S₃₆ and S₅₄ (42,000-47,000 kg/ha/yr) (cf. Anonymous, 1983). Investigations should, therefore, be carried out to induce higher yield properties in those cultivars which have better leaf quality and low yield.

(ii) The results of isolated studies that the leaves grown under wider spacing contained higher crude protein and soluble sugar contents (Krishnaswami, 1970c; Choudhury *et al.*, 1991) but those grown under closer spacing showed better larval development and cocoon characters (Krishnaswami *et al.*, 1971) need to be explained. Thus, for a better understanding of the subject, the leaf quality due to spacing must be assessed by combining bioassay and chemoassay studies in one and the same experiment.

(iii) In India, most of the works on fertilisers in mulberry did not take into cognisance the NPK uptake by the plants, while determining the optimum dose for leaf quality and yield. It is an important aspect which needs a good deal of attention to confirm/alter the present recommendation of NPK doses in different agro-climatic zones of India. The recent recommendation of NPK for chawki mulberry gardens need also be confirmed. Investigations may be carried out to determine the optimum fertiliser dose for rainfed mulberry in West Bengal (eastern India) vis-à-vis yield and quality.

(iv) The assessment of quality and quantity of leaf due to drip, sprinkler, furrow and subsoil irrigation may be made under various edapho-climatic conditions to confirm/alter the findings of Saratchandra *et al.* (1992a).

(v) The results of mulching in mulberry so far do not reflect the details on leaf quality. Therefore, bioassay-cum-biochemical investigations for proper assessment of leaf quality due to mulching may be undertaken.

(vi) Isolated studies on pruning in mulberry do not portray any clear picture on leaf quality. An integrated experiment combining the findings of Choudhury *et al.* (1991), Sen *et al.* (1991) and Anonymous (1991) vis-à-vis the common practice, along with bioassay-cum-biochemical investigations may help us to evolve the best pruning technique to improve leaf quality and quantity without adversely affecting the economics.

CONCLUSION

From this text, it appears that 'quality' is still a complex concept and when applied to mulberry it has acquired conflicting interpretations. There is no definite yardstick or standard by which 'quality'

can be measured. It can only be perceived by visual observation and this baffles even the veteran scientists/sericulturists to prescribe any particular guideline or standard for determining quality. However, on the basis of the available information, the following may be suggested for production of good leaf quality and quantity.

- (i) Growing mulberry cultivars such as MR₂, Tr₄, Tr₁₀, S₁₆₃₅, C₁₇₃₀, G₉, G₇, G₃, S₃₀, S₃₆, S₄₁, S₅₄, S₁, etc.
- (ii) Adoption of the recommended spacings for irrigated and rainfed mulberry.
- (iii) Timely application of the recommended doses of manures and fertilisers for the chawki and general mulberry gardens.
- (iv) Irrigation with recommended quantity of water at the prescribed intervals.
- (v) Adoption of soil moisture conservation measures such as the use of surface mulches, with the cessation of monsoon, for rainfed mulberry.
- (vi) One bottom pruning for rainfed mulberry and 4-5 bottom prunings for irrigated mulberry in India.
- (vii) Adoption of the leaf plucking method of harvest for chawki rearing and whole shoot harvest method for late-age silkworm rearing and preservation of leaves under a wet gunny cloth cover.

ACKNOWLEDGEMENTS

The first author (KMP) expresses his sincere thanks to Dr K. Sengupta, ex-Director of the Central Silk Board, India, and to Dr G. Panigrahi, FLS, ex-Joint Director, Botanical Survey of India, Calcutta, for critically going through the manuscript and offering constructive criticism and valuable suggestions.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1975) Textbook of Tropical Sericulture. Japan Overseas Co-operation Volunteers, Tokyo, Japan, pp. 1-594 + App. 1-3.
- ANONYMOUS (1983) Annual Report (1982-83). Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India, p. 75.
- ANONYMOUS (1986) Annual Report (1985-86). Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, India, pp. 17-20, 40-43.
- ANONYMOUS (1989) Annual Report (1988-89). Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, India, pp. 66-67, 134-135.
- ANONYMOUS (1991) Annual Report (1990-91). Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, India, pp. 34-36, 41-45, 129-130.
- ARAIN., ITO T. (1963) Food value of mulberry leaves for the silkworm, *Bombyx mori* L., determined by means of artificial diets. II. Comparison between soft and hard leaves. Bull. Sericult. Exp. Sta., 18(4), 247-250.
- ASKARI S., SHARAN R.K. (1982) Studies on the effect of feeding leaves of varying maturity on the developmental stages of *Bombyx mori*. J. Adv. Zool., 3(2), 90-94.
- BADALOV N.G. (1971) Results of testing the tetraploid mulberry, Khanlar toot, for silkworm feeding in spring, summer and autumn. In Polyploidiya u Shelkovitsy, 155-162.
- BENCHAMIN K.V., NAGARAJ C.S. (1987) Silkworm rearing techniques. In Appropriate Sericulture Techniques. Ed. M.S. Jolly, Mysore, India, pp. 63-106.
- BOSE P.C., MAJUMDER S.K., SENGUPTA K. (1991) A comparative biochemical study of six mulberry varieties. Indian J. Seric., 30(1), 83-87.
- BHUYAN N.I. (1981) Improvement of silkworm multiplication and silk production under Bangladesh condition. Bangladesh Agricultural University, Mymensingh, 60-61.
- CHOUDHURY P.C., GIRIDHAR K. (1987) Mulberry cultivation. In Appropriate Sericulture Techniques. Ed. M.S. Jolly, Mysore, India, pp. 17-34.
- CHOUDHURY P.C., SHUKLA P., GHOSH A., MALLIKARJUNA B., SENGUPTA K. (1991) Effect of spacing, crown height and method of pruning on mulberry leaf yield, quality and cocoon yield. Indian J. Seric., 30(1), 46-53.

- DAS B.C., PRASAD D.N. (1974) Evaluation of some tetraploid and triploid mulberry varieties through chemical analysis and feeding experiment. *Indian J. Seric.*, 13(1), 17-22.
- DAS B.C., SIKDAR A.K. (1970) Evaluation of some improved strains of mulberry by feeding experiment. *Indian J. Seric.*, 9(1), 26-30.
- DAS P.K., CHOUDHURY P.C., GHOSH A., MALLIKARJUNA B., SURYANARAYANA N., SENGUPTA K. (1990) Effect of green manuring, dry weed and black polythene mulching on soil moisture conservation, growth and yield of mulberry and their economics under rainfed condition. *Indian J. Seric.*, 29(2), 263-272.
- DASGUPTA K.P. (1961) Feeding mulberry leaves to silkworm, a comparative analytical study on the effect of feeding with different types of mulberry leaves obtained by different methods of cultivation of silkworm *Bombyx mori* L. *Indian Silk*, 1(4), 14-22.
- DZHAFAROV N.A., ALEKPEROVA O.P. (1978) Fodder qualities of the leaves of interspecific polyploid mulberry hybrids. *Shelk*, 4, 5.
- DZHAFAROV N.A., GADZHIEV D.O. (1973) Leaf quality in polyploid forms of mulberry. *Dokl. Akad. Nauk Az. SSR*, 28(4), 87-91.
- FONSECA D., LUIZPAOLIERI A., IRANGELNOGUEIRA (1972) Nutrition of the silkworm, *Bombyx mori* L. - The influence of the age of the mulberry leaf on the silkworm growth and development. *Biol. Ind. Anim.*, 29(2), 425-433.
- FOTEDAR R.K., CHAKRABORTY S., DARZI G.M., DHAR K.L., AHSAN M.M. (1988) Effect of nitrogen levels on the growth and yield of mulberry. *Indian J. Seric.*, 27(1), 7-15.
- FUKUDA T., SUDO M., MATUDA M., HAYASHI T., HORIUHI M.F. (1959) Formation of silk protein during the growth of the silkworm larvae, *Bombyx mori* L. *In Proc. 4th Intern. Cong. Biochem.*, 12, 90-112.
- GABRIEL B.P., RAPSUAS H.R. (1976) The growth and development of *Bombyx mori* at different leaf maturity and variety of mulberry. *Philippine Agric.*, 60(3/4), 139-146.
- HAMAMURA Y., HAYASHIYA K., NAITO K. (1961) Food selection by silkworm larvae, *Bombyx mori* - β -sitosterol as one of the biting factors. *Nature*, 190, 880-881.
- HASSANEIN M.H., EL SHAARAWY M.F. (1962a) Studies on the effect of feeding different races of silkworm with certain mulberry varieties on the silk glands and cocoon characters. *Revue du Ver à Soie, J. Silkworm*, 14, 187-205.
- HASSANEIN M.H., EL SHAARAWY M.F. (1962b) The physiological effect of feeding with different mulberry varieties on certain races of the silkworm (*Bombyx mori* L.). *Revue du Ver à Soie, J. Silkworm*, 14(4), 261-317.
- ITO T. (1960) Effect of sugars on feeding of larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 5, 95-107.
- ITO T. (1972) An approach to nutritional control mechanism in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Israel J. Entomol.*, 7, 1-6.
- ITO T. (1978) Silkworm nutrition. *In The Silkworm: An important Laboratory Tool*. Ed. Y. Tazima, Kodansha Ltd., Tokyo, Japan, pp. 121-157.
- ITO T., ARAI N. (1963) Food values of mulberry leaves for the silkworm, *Bombyx mori* L., determined by means of artificial diets. I. Relationship between kinds of mulberry leaves and larval growth. *Bull. Sericult. Exp. Sta.*, 18(4), 226-229.
- ITO T., KOBAYASHI M. (1978) Rearing of the silkworm. *In The Silkworm: An Important Laboratory Tool*. Ed. Y. Tazima, Kodansha Ltd., Tokyo, Japan, pp. 83-102.
- KASIVISWANATHAN K., IYENGAR M.N.S. (1965) Preliminary observations on varietal-cum-irrigational response to different levels of 'N' on the seasonal and total yield of mulberry. *Indian J. Seric.*, 4, 22-33.
- KASIVISWANATHAN K., IYENGAR M.N.S. (1970) Effects of plant densities, methods of leaf harvest and nitrogen fertilization on the leaf yield of irrigated mulberry in Mysore State. *Indian J. Seric.*, 9(1), 43-48.
- KASIVISWANATHAN K., IYENGAR M.N.S., VENKATARAMU C.V. (1977a) Studies on dry farming of mulberry in Mysore (Parts I-IV). *Indian J. Seric.*, 16(1), 34-42.
- KASIVISWANATHAN K., KRISHNASWAMI S. (1979) Studies on the effect of frequency of shoot prunings on the yield of mulberry. *Indian J. Seric.*, 18(1), 30-36.

- KASIVISWANATHAN K., KRISHNASWAMI S., VENKATARAMU C.V. (1973) Effects of storage on the moisture content of mulberry leaves. *Indian J. Seric.*, 12, 13-21.
- KASIVISWANATHAN K., KRISHNASWAMI S., VENKATARAMU C.V. (1977b) Studies on varietal-cum-spacing and nitrogen fertilization on the leaf yield of mulberry under irrigated conditions in Karnataka State, India. *Indian J. Seric.*, 16(1), 10-18.
- KOUL A., BHAGAT R.L. (1991) Effect of winter pruning on the spring leaf yield in mulberry. *Indian J. Seric.*, 30(2), 131-134.
- KRISHNASWAMI S. (1986a) Mulberry Cultivation in South India. Central Silk Board, Bangalore, pp. 1-19.
- KRISHNASWAMI S. (1986b) New Technology of Silkworm Rearing. Central Silk Board, Bangalore, pp. i-iv + 1-23.
- KRISHNASWAMI S., AHSAN M., SRIHARAN T.P. (1970a) Studies on the quality of mulberry leaves and silkworm cocoon crop production. Part 2. Quality differences due to leaf maturity. *Indian J. Seric.*, 9(1), 11-25.
- KRISHNASWAMI S., KUMARARAJ S., VIJAYARAGHAVAN K., KASIVISWANATHAN K. (1971) Silkworm feeding trials for evaluating the quality of mulberry leaves as influenced by variety, spacing and nitrogen fertilization. *Indian J. Seric.*, 10(1), 79-89.
- KRISHNASWAMI S., NOAMANI M.K.R., AHSAN M. (1970b) Studies on the quality of mulberry leaves and silkworm cocoon crop production. Part 1. Quality differences due to varieties. *Indian J. Seric.*, 9(1), 1-10.
- KRISHNASWAMI S., ROY D., MUKHERJEE S.K. (1970c) Yield and nutritive value of mulberry leaves as influenced by planting season, spacing and frequency of pruning. *Indian J. Seric.*, 9(1), 38-42.
- LOMBARDI P.L. (1960) Attuale stato della gelsicoltura italiana. Sistemazione per eventuali allevamenti successivi con riferimento anche ai tipi giapponesi importati. Ile Conférence technique séricicole internationale, Murcie, Avril, Revue du Ver à Soie, J. Silkworm, 12(1), 41-50.
- MADHAVA RAO Y.R., KODANDARAM M.S., SRINIVASAN E.B. (1981) Effect of leaf spot disease on the composition (food contents) of mulberry (*Morus alba* L.) leaves. *J. Mysore Univ.*, 28, 21-23.
- MANDAL L.N., KRISHNASWAMI S. (1965) Changes in the nutritive value of mulberry leaves on storage after harvest. World Congress on Silk Production, Beirut.
- MISHRA R.K., CHOUDHURY P.C., GHOSH A., SINGH G.B., DATTA R.K. (1993) Cultivation technology for chawki mulberry garden. *Indian Silk*, 31(12), 11-13 & 20.
- MUKHERJEE S.K., RAY D., PAI A.K. (1972) Influence of different levels of irrigation on the yield of bush mulberry raised under Bengal and Mysore systems of plantation. *Indian J. Seric.*, 9(1), 33-36.
- MUSTAFAEV A.S. (1968) Study on the effect of leaf quality of experimentally obtained triploid mulberry forms on the biological indices of Chinese silkworms. *Dokl. Akad. Nauk Azerb. SSR*, 22(4), 49-54.
- MUSTAFAEV A.S. (1970) Biological and economic properties of triploid forms of mulberry. In *Polyploidiya u Shelkovitsy*, Moscow, 30-35.
- MUSTAFAEV A.S. (1975) Study on the effect of leaf quality of experimentally obtained allotriploid forms of mulberry on biological indices of the silkworm. *Izv. Akad. Nauk Az. SSR Ser. Biol. Nauk*, 2, 60-63.
- NARASIMHAMURTY C.V., DONATUS E., PILLAI S.V. (1987) Chemical composition of mulberry during preservation and leaf storage. *Sericologia*, 27(4), 623-627.
- NARAYANAN E.S., KASIVISWANATHAN K., IYENGAR M.N.S. (1966) Effects of varietal feeding, irrigation levels and nitrogen fertilization on the larval development and cocoon characters of *Bombyx mori* L. *Indian J. Seric.*, 5, 13-17.
- NARAYANAN E.S., KASIVISWANATHAN K., IYENGAR M.N.S. (1967) Preliminary observations on the effects of feeding leaves of varying maturity on the larval development and cocoon characters of *Bombyx mori* L. *Indian J. Seric.*, 6(1), 109-113.
- PAI A.K. (1965) Effect of NPK fertilizers and their combinations on the yield and nutritive value of mulberry. *Indian J. Seric.*, 4(1), 1-8.

- PILLAI S.V., JOLLY M.S. (1985) An evaluation on the quality of mulberry varieties raised under hill conditions and the crop results of *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 24(2), 48-52.
- PUROHIT K.M., RAY D., SUBBA RAO G. (1990) Effect of mulches on soil temperature, soil moisture, growth and leaf yield of mulberry during winter under rainfed condition in West Bengal. Indian J. Seric., 29(1), 64-71.
- PUROHIT K.M., RAY D., SUBBA RAO G. (1992) Influence of phyto-mulches on soil temperature, moisture conservation, growth and leaf yield of rainfed mulberry during winter in West Bengal. Indian J. Seric., 31(1), 41-47.
- QAIYYUM M.A., QUADER M.A., ALI R., BARI M.A. (1991) Studies on leaf yield and nutritive value in different cultivation forms of BSRM-5 variety of mulberry. Bull. Seric. Res., 2, 82-86.
- QUADER M.A., QAIYYUM M.A., SARKER A.A., RAB M.A. (1990) Effect of NPK fertilizers in combination with foliar spray of urea on leaf yield and nutritional composition of mulberry. Bull. Seric. Res., 1, 1-5.
- QUADER M.A., QAIYYUM M.A., SARKER A.A., RAB M.A., AHMED S.U. (1992) Varietal response to NPK fertilizers in combination with foliar spray of urea on leaf yield and leaf quality of mulberry. Bull. Seric. Res., 3, 64-66.
- RAHMAN M.F., MANDAL K.A.M.S.H. (1977) Effect of different types of mulberry leaves on the weight of silkworm larvae, *Bombyx mori* L., race Nistari C/40. Bangladesh J. Zool., 5(1), 79-82.
- RAJU S., PALLAVI S.N., REDDY M.M., SURYANARAYANA N., SINGHAL B.K., SENGUPTA K. (1990) Evaluation of four new mulberry varieties through silkworm rearings under irrigated condition. Indian J. Seric., 29(2), 240-247.
- RANGASWAMI G., NARASIMHANNA M.N., KASIVISWANATHAN K., SASTRY C.R., JOLLY M.S. (1976) Sericulture Manual. Vol. 1: Mulberry Cultivation. FAO Agricultural Services Bulletin, 15/1, Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome, pp. i-v + 1-150.
- RAY D., MANDAL L.N., PAI A.K., MONDAL S.K. (1973) Effect of NPK and farmyard manure on the yield and nutritive values of mulberry leaf. Indian J. Seric., 12(1), 7-12.
- RUPA T.R., RAO M.S., REDDY K.S. (1993) Positional nutrient status of mulberry (*Morus alba* L.) leaves. Indian J. Seric., 32(1), 125-127.
- SARATCHANDRA B., RAJANNA L., PARAMESHA C., JAYAPPA T., SABITHA M.G., PHILOMENA K.L., RAMESH S.P. (1992a) Studies on the comparative efficiency of drip, sprinkler and furrow irrigation systems on mulberry leaf yield and water economy. Sericologia, 32(1), 95-100.
- SARATCHANDRA B., RAJANNA L., PHILOMENA K.L., PARAMESHA C., RAMESH S.P., JAYAPPA T., SABITHA M.G. (1992b) An evaluation of elite mulberry varieties for yield and quality through bioassay. Sericologia, 32(1), 127-134.
- SARKAR A., DAS B.C., MONDAL S.K. (1983) Growth, yield and feeding value of initial diploid, triploid and tetraploid mulberry. Seminar on Silk Research and Development, Bangalore, p. 6.
- SARKER A.A., QUADER M.A., RAB M.A., AHMED S.U. (1992) Studies on the nutrient composition of some indigenous and exotic mulberry varieties. Bull. Seric. Res., 3, 8-13.
- SARKER A.A., YEASMIN T., QUADER M.A., ABSAR N. (1991) Studies on vitamin and amino acid constituents of mulberry leaves. Bull. Seric. Res., 2, 103-106.
- SASTRY C.R., JOLLY M.S., SUBRAMANYAM M.R., MADHAVA RAO Y.R. (1988) Studies on the varietal differences in the loss of moisture from harvested mulberry leaves. Indian J. Seric., 27(2), 85-91.
- SEKI H., OSHIKANE K. (1959) Studies in polyploid mulberry trees. (III): The evaluation of breded polyploid mulberry leaves and the results of feeding silkworm on them. Res. Rep. Fac. Text. Seric. Shinshu Univ., 9, 6-15.
- SEN R., BENCHAMIN K.V., JOLLY M.S. (1991) Studies on the quality of leaf under two pruning systems in mulberry. Indian J. Seric., 30(1), 17-22.
- SENGUPTA K., MUKHERJEE S.K., SIKDAR A.K., MUSTAFI J.C., SENGUPTA D. (1973) A co-ordinated study on the effect of variety, spacing in cultivation and levels of nitrogen fertilization of mulberry on the cocoon yield and cocoon characters of multivoltine silkworm, *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 12(1), 39-45.

- SENGUPTA K., RAY D., SINGH B.D., KRISHNASWAMI S. (1972) Studies on the effect of high dose nitrogen fertilization of soil on the yield, chemical composition and nutritive value of mulberry leaf as evaluated from rearing results. *Indian J. Seric.*, 11(1), 28-32.
- SENGUPTA K., SINGH B.D., MUSTAFI J.C. (1971) A study on the effect of time of harvest of mulberry leaf on silkworm (*Bombyx mori* L.) cocoon crop and cocoon quality. *Indian J. Seric.*, 10(1), 1-5.
- SIDDARAMAIAH A.L., HEGDE R.K. (1988) Effect of feeding of *Cercospora* infected leaves of mulberry on silkworm development. *Mysore J. Agric. Sci.*, 22, 498-504.
- SIDHU N.S., KASIVISWANATHAN K., IYENGAR M.N.S. (1969) Effects of feeding leaves grown under NPK fertilization on the larval development and cocoon characters of *Bombyx mori* L. *Indian J. Seric.*, 8(1), 55-60.
- SIKDAR A.K. (1993) Chemo- and bio-assay of high yielding triploids and diploids of mulberry (*Morus* spp.). *Indian J. Seric.*, 32(2), 169-174.
- SREEDHARA V.M., SHANTAKUMARI M., BORAI AH G. (1988) Preliminary studies on the changes in the levels of protein, sugar, chlorophyll and moisture content in the developed leaves of mulberry, *Morus indica*. *International Congress on Tropical Sericulture Practice*, Bangalore, Feb. 18-23.
- SUDO M., SOH Y., OKAJIMA T. (1981) The relation between the leaf quality at different leaf order, silkworm growth and cocoon quality. *J. Sericult. Sci. Japan*, 50(4), 306-310.
- SUDRADJAT (1989) The effect of pruning height on the growth and production of mulberry leaves in Pakatoo, South Sulawesi (Indonesia). *Bul. Penelitian Hutan*, 0(510), 45-55.
- SULLIA S.B., PADMA S.D. (1987) Acceptance of mildew affected mulberry leaves by silkworm (*Bombyx mori* L.) and its effect on cocoon characteristics. *Sericologia*, 27(4), 693-696.
- SUNDARESWARAN P., GOVINDAIAH, SRINIVASAN E.B., JOLLY M.S. (1988) Effect of leaf rust disease on the nutritive composition of mulberry (*Morus alba* L.). *Indian J. Seric.*, 27, 159-160.
- TAYADE D.S., JAWALE M.D. (1984) Studies on the comparative performance of silkworm races against varieties of mulberry under Marathwada conditions. *Sericologia*, 24(3), 361-364.
- THANGAMANI R., VIVEKANANDAN M. (1984) Physiological studies and leaf nutrient analysis in the evaluation of best mulberry varieties. *Sericologia*, 24(3), 317-324.
- TOJYO I. (1966) Studies on polyploid mulberry tree. III: On the morphology, growth and moisture of leaves. *Bull. Sericult. Exp. Sta. Japan*, 20(3), 221-230.
- ULLAL S.R., NARASIMHANNA M.N. (1987) *Handbook of Practical Sericulture*. 3rd ed., Central Silk Board, Bangalore, pp. i-xiii + 1-166.
- UMESH KUMAR N.N., SHARMA D.D., SHREE M.P. (1993) Effect of feeding fungus infected mulberry leaves on the commercial characters of silkworm (*Bombyx mori* L.). *Indian J. Seric.*, 32(1), 107-109.
- VINOD KUMAR, BENCHAMIN K.V. (1990) Evaluation of mulberry leaf quality under two systems of pruning for young and late age silkworm rearing. *Indian J. Seric.*, 29(2), 168-173.
- WALDBAUER G.P. (1964) The consumption, digestion, and utilization of solanaceous and non-solanaceous plants by larvae of the tobacco hornworm, *Protoparce sexta* (Johan) (Lepidoptera: Sphingidae). *Entomol. Exp. Appl.*, 21, 254-260.
- YAMASHITA T., FUJINO A. (1986) Effects of pruning of young and old shoots on ribulose biphosphate carboxylase and other constituents in leaves of the mulberry tree (*Morus alba* L.). *J. Exp. Bot.*, 37(185), 1836-1841.
- YOKOYAMA T. (1962) *Synthesized Science of Sericulture*. Central Silk Board, Bombay, India, pp. 18-25.

INFLUENCE DE DIVERSES PRATIQUES AGRONOMIQUES EN INDE SUR LA QUALITE DE LA FEUILLE CHEZ LE MURIER

K.M. PUROHIT & T. PAVAN KUMAR

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

INTRODUCTION

L'élevage du ver à soie est conditionné non seulement par la quantité mais aussi par la qualité des feuilles de mûrier, qui fait intervenir plusieurs caractères physiques, chimiques et biochimiques. Cependant, les sériciculteurs, dans leur souci de produire de grandes quantités de feuilles afin d'obtenir davantage de pontes saines et produire davantage de cocons, négligent souvent le fait que la production en masse de feuilles n'est pas toujours compatible avec leur qualité nutritionnelle. Cet article a pour but de faire le point sur les principaux résultats de recherches sur les méthodes de culture du mûrier appropriées à l'élevage du ver à soie permettant un rendement optimal en soie de qualité supérieure et porte essentiellement sur la qualité de la feuille. Dans ce contexte, la qualité de la feuille dépend non seulement des cultivars de mûrier mais également des pratiques culturales. Cet article met également en évidence les lacunes sur différents aspects liés aux pratiques culturales et propose de nouvelles lignes d'action.

CARACTERES PHYSIQUES DES FEUILLES DE MURIER

La rapidité de la feuille est le critère le plus important pour les larves jeunes et matures ; la larve préfère généralement les feuilles fraîches, vertes et saines de texture tendre et évite les feuilles dures, velues et sèches ou flétries. En outre, la qualité de la feuille doit répondre aux besoins nutritionnels des vers à soie, ces besoins variant en fonction de leur âge (Anonyme, 1975 ; Ullal et Narasimhanna, 1987 ; Benchamin et Nagaraj, 1987). Le nourrissage avec des feuilles malades entraîne un développement inégal des larves et une augmentation de la durée larvaire et a des effets négatifs sur les caractères du cocon (Sullia et Padma, 1987 ; Siddaramaiah et Hegde, 1988 ; Umesh Kumar et coll., 1993). Ceci pourrait être attribué à la valeur nutritive médiocre des feuilles malades, dont les contenus en eau, en protéines brutes et en sucres sont insuffisants (Madhava Rao et coll., 1981 ; Sundareswaran et coll., 1988).

CARACTERES CHIMIQUES ET BIOCHIMIQUES

Les facteurs biochimiques affectant la valeur nutritive des feuilles comprennent l'humidité, les protéines, les hydrates de carbone, les graisses, les minéraux, les acides organiques, les vitamines, etc. (Anonyme, 1975). Pour les jeunes larves, il convient de fournir des feuilles présentant un contenu élevé en eau, en protéines et en hydrates de carbone et un contenu faible en fibres brutes et en minéraux tandis que les larves des derniers âges préfèrent les feuilles présentant une teneur comparativement faible en eau et une teneur élevée en protéines (Ito et Kobayashi, 1978 ; Ullal et Narasimhanna, 1987). Un apport insuffisant de certains éléments nutritifs ou un déséquilibre alimentaire dans la nourriture affectent la digestion et l'activité métabolique des larves (Waldbauer, 1964 ; Ito, 1972). Les larves de ver à soie doivent donc être nourries avec des feuilles présentant des contenus équilibrés en éléments

nutritifs comme les acides aminés (protéines), les hydrates de carbone, les lipides, les vitamines, les minéraux, etc. (Ito, 1978). Le contenu en eau des feuilles de mûrier fraîches détermine l'efficacité alimentaire, le contenu optimal étant de 75 %. On obtient une croissance larvaire maximale avec un aliment contenant 20 % d'acides aminés, cependant le taux de production est meilleur avec un aliment contenant 25 à 30 % d'acides aminés. Le coefficient de digestion des protéines brutes des feuilles de mûrier est d'environ 60 % à tous les âges (Ito, 1978). Le contenu des feuilles en hydrates de carbone varie de 18 à 25 % en poids sec. Parmi les hydrates de carbone, le saccharose, qui stimule le nourrissage, est un composant important et indispensable à la bonne croissance des vers à soie ; viennent ensuite le fructose, le raffinose et le glucose à la même concentration (Ito, 1960). Le contenu en lipides des matières sèches des feuilles de mûrier varie de 3 à 6 %, le coefficient de digestion des lipides brutes étant de 58,5 % à tous les âges. Le ver à soie accumule davantage de lipides dans son corps qu'il n'en digère. Un facteur soluble dans les lipides, appelé β -sitostérol, présent dans la feuille de mûrier, accélère l'action de masticage de la larve (Hamamura et coll., 1961). Les feuilles de mûrier contiennent en moyenne 10 % de minéraux en poids sec, ce pourcentage variant suivant l'échantillon analysé. Environ 28 % des minéraux ingérés sont conservés sous forme de substances corporelles pendant toute la durée du stade larvaire. Les feuilles de mûrier fraîches contiennent un complexe de vitamines B (à l'exception de la vitamine B12) et de la vitamine C en quantités suffisantes pour permettre au ver à soie de se développer normalement, bien que cela varie en fonction de la saison, du cultivar de mûrier et de l'engrais utilisé (Ito, 1978).

La composition nutritionnelle des feuilles de mûrier est également influencée par un certain nombre de facteurs comme les cultivars de mûrier et leur degré de ploidie, les conditions climatiques, la croissance et la maturité des feuilles, l'espacement, la fumure, l'irrigation, le paillage, la taille et la méthode de récolte des feuilles, le transport et le stockage de celles-ci, etc.

L'analyse critique des travaux effectués en Inde et ailleurs fait ressortir les observations suivantes :

CULTIVARS DE MURIER

La valeur nutritive de la feuille de mûrier varie d'un cultivar à l'autre et les paramètres du cocon dépendent des cultivars de mûrier (Hassanein et El Shaarawy, 1962a, 1962b). Kanva-2 est supérieur à Mysore local (Narayanan et coll., 1966) ; S₁ est supérieur à Berhampore local et à S₁₅ (Krishnaswami et coll., 1970b ; Sengupta et coll., 1973) ; S₁, S₇₉₉ et BSRM-5 sont supérieurs à Jing, à Lup-40 et à Telia (Anonyme, 1989 ; Sarker et coll., 1991, 1992). Parmi les quatre cultivars de mûrier Kanva-2, S₅₄, Kosen et LM₂ étudiés du point de vue de la qualité du cocon chez deux races bivoltines (NB₇ et NB₁₈) et une race hybride (PM $\times$ NB₁₈) dans la région de Marathwada, S₅₄ s'est avéré supérieur, enregistrant une augmentation du poids larvaire, du poids du cocon et du rendement en cocons (Tayade et Jawale, 1984). Thangamani et Vivekanandan ont réalisé une étude biologique et biochimique sur huit cultivars de mûrier, à savoir S₅₄, C₁, MR₂, Kajali, Roso, Kosen, Japan et M₅ (Kanva-2) à Tiruchirappalli (Tamil Nadu, Inde). Ils ont observé que le croisement polyvoltin L $\times$ KA nourri avec des feuilles du cultivar MR₂, qui contiennent des pourcentages élevés en eau (70,6 %), en protéines brutes (29,46 %) et en minéraux totaux (17,93 %) et un pourcentage moyen en sucres solubles totaux (9,78 %), présentait une augmentation de la longueur de la bave et du taux effectif d'élevage : ce qui suggère que le contenu élevé des feuilles en protéines pourrait contribuer à l'amélioration de la longueur de la bave. Ils estiment que MR₂, C₁, S₅₄, Kajali et Roso (par ordre de préférence) sont plus appropriés à l'élevage du ver à soie. Récemment, Saratchandra et coll. (1992b) ont observé, dans une étude biologique, que S₃₆, RFS-135 et C₇₇₆ étaient qualitativement supérieurs à d'autres cultivars comme English Black, Sujapur-5, S₇₉₉ et Kanva-2.

La valeur nutritive des cultivars de mûrier dépend généralement des contenus en éléments nutritifs des feuilles (Ito et Arai, 1963). Fukuda et coll. (1959) ont observé qu'environ 70 % de la protéine de soie produite par le ver à soie étaient directement dérivés des protéines de la feuille de mûrier. Cependant, Gabriel et Rapsuas (1976), Pillai et Jolly (1985) et Raju et coll. (1990) ont observé qu'un contenu élevé en protéines dans les cultivars n'entraînait pas d'amélioration significative des caractères du cocon. Bien que Pillai et Jolly (1985) aient relevé un contenu relativement plus faible

en protéines brutes (20,8 %) et en minéraux totaux (12,42 %) chez MR₂ que chez K₂ (22,74 % de protéines et 17,10 % de minéraux), ils confirment la supériorité du cultivar MR₂ pour ce qui concerne les paramètres du cocon. Raju et coll. (1990) considèrent le cultivar S₃₀ supérieur à S₄₁ pour ce qui concerne le développement larvaire et le cocon; bien qu'ils aient relevé des contenus plus faibles en eau (68,87 %), en hydrates de carbone (25,3 %), en protéines brutes (20,29 %), en acides aminés libres (37,8 %) et en minéraux (11,33 %) chez S₃₀ que chez S₄₁ (chez lequel les valeurs correspondantes sont respectivement de 69,84 %, 27,80 %, 22,12 %, 41,2 % et 13,0 %). Néanmoins, Thangamani et Vivekanandan (1984) et Bose et coll. (1991) ont observé des teneurs plus élevées en protéines brutes et en minéraux chez MR₂ que chez K₂ et des teneurs plus élevées en eau et en protéines brutes chez S₃₀ que chez S₄₁, résultats qui sont en contradiction avec les observations de Pillai et Jolly (1985) et Raju et coll. (1990). Ces différences de résultats pourraient être dues à des variations des facteurs édapho-climatiques.

La polyploïdie joue également un rôle important dans la qualité de la feuille de mûrier. Les formes tétraploïde et triploïde du mûrier, qui contiennent des quantités élevées d'eau, d'azote total, de protéines, d'hydrates de carbone et de vitamines, ont des feuilles de meilleure qualité que les diploïdes (Seki et Oshikane, 1959; Tojyo, 1966; Mustafaev, 1968, 1970; Dzhafarov et Alekperova, 1978). Seki et Oshikane (1959) et Dzhafarov et Gadzhiev (1973) ont observé une diminution de la période larvaire et une augmentation du taux de survie, du poids larvaire, du poids du cocon, de la longueur de la bave – pour un denier uniforme – et de la fécondité chez les larves nourries avec des feuilles de tétraploïdes par rapport aux larves nourries avec des feuilles de triploïdes ou de diploïdes. Mustafaev (1968, 1975) a observé que le nourrissage avec des feuilles de mûriers tétraploïdes entraînait une augmentation du poids du cocon de 4,4 à 9,1 % et du rendement en soie grège de 5 à 15 %, tandis que les formes triploïdes donnent des augmentations de 2,3 à 6,6 % et de 0,2 à 6,2 % pour ces caractères par rapport aux diploïdes. Le même auteur (1968) a également observé que le nourrissage avec des formes triploïdes entraînait une augmentation du taux de survie des vers à soie de 1,4 à 2,0 % et une diminution de la durée larvaire de 1,0 à 2,5 jours par rapport aux diploïdes. La réduction de la durée larvaire et l'augmentation du taux de survie pourraient être dues au fait que les feuilles des triploïdes ont des contenus en éléments nutritifs plus élevés; ce qui favorise la croissance, le développement et la résistance des vers à soie aux maladies.

Néanmoins, Badalov (1971), Das et Prasad (1974) et Sarkar et coll. (1983) ont observé que le mûrier triploïde était qualitativement supérieur aux diploïdes et aux tétraploïdes. Dans des études chimiques et biologiques, Das et Prasad (1974) ont observé que les triploïdes Tr₁₀ et Tr₈ étaient qualitativement supérieurs aux tétraploïdes T₁ et T₂₀ et au diploïde Berhampore local, tandis que Sikdar (1993) a établi la supériorité des triploïdes G₉, G₇ et G₃ par rapport aux diploïdes OP₂, S₃₆, S₄₁ et Kanva-2. Un test de nourrissage sur l'hybride bivoltin KPG-B × P₅ avec certains cultivars de mûrier du Bengale occidental a permis de démontrer que le triploïde Tr₄, qui enregistre des augmentations de 5,8, 36,8, 46,38, 11,11, 10,05 et 43,28 % respectivement pour le poids larvaire, le taux effectif d'élevage (en nombre), le taux effectif d'élevage (en poids), le poids du cocon, le poids de la coque et le rendement absolu en soie, est supérieur au diploïde Berhampore local (Anonyme, 1989). Les triploïdes Tr₁₀, S₁₆₃₅ et C₁₇₃₀ donnent également de meilleures performances.

Lorsque le niveau de ploïdie dépasse la tétraploïdie, la qualité de la feuille se détériore et on a observé des feuilles de qualité très médiocre chez des mûriers à forte ploïdie comme le cultivar russe 1-16/50 dodécaploïde (Dzhafarov et Gadzhiev, 1973).

Cependant, Lombardi (1960), dans une étude avec les cultivars japonais Kokuso 20, 21, 27 et un cultivar de mûrier italien local, et Das et Sikdar (1970), dans une expérience utilisant S₁₅, S₁₂₅, S₁₆₂ et un cultivar local du Bengale occidental (Inde), n'ont pas observé d'effets des cultivars de mûrier sur les paramètres du cocon. Il est probable que les différences de contenus en éléments nutritifs n'aient pas été suffisamment importantes pour se refléter dans les paramètres du cocon.

Cette synthèse suggère que les cultivars qualitativement supérieurs comme MR₂, Tr₄, Tr₁₀, S₁₆₃₅, C₁₇₃₀, G₉, G₇, S₃₀, S₃₆, S₄₁, S₅₄, S₁, etc. peuvent être exploités par les sériciculteurs souhaitant améliorer le rendement et la qualité des cocons.

CONDITIONS CLIMATIQUES

La qualité nutritive des feuilles étant influencée par les facteurs climatiques, elle varie d'une saison à l'autre (Yokoyama, 1962 ; Krishnaswami, 1986 ; Sarker et coll., 1992 ; Quader et coll., 1992). Au cours de la saison de l'été sec, les feuilles poussent et deviennent rapidement matures mais se flétrissent rapidement en raison de leur faible contenu en eau. A la saison pluvieuse, bien que les feuilles poussent et deviennent rapidement matures, elles contiennent un taux maximum d'humidité du fait de la saturation du sol en eau et de l'humidité élevée de l'atmosphère et sont donc moins sensibles à la flétrissure. Par contre, en hiver, les activités métaboliques diminuant du fait de la baisse de la température du sol et de l'atmosphère, la croissance des mûriers est comparativement lente et les feuilles se développent graduellement. Ces feuilles, qui ont un contenu optimal en eau ne se flétrissent pas et n'augmentent pas non plus le taux d'humidité de la litière d'élevage. Sarker et coll. (1992) ont observé que les teneurs en protéines et en hydrates de carbone étaient maximales lors des récoltes de mai-juin et que les teneurs en minéraux et en fibres brutes étaient minimales lors des récoltes de printemps (février à mars). Des tests de nourrissage effectués sur la race de ver à soie MBD-5 dans le Bengale occidental pour les périodes juin-juillet, juillet-août, septembre-octobre, novembre-décembre, décembre-janvier et février-mars montrent que les valeurs du poids larvaire, du taux effectif d'élevage (en nombre et en poids) et le contenu absolu en soie sont maximales lors de l'élevage de février-mars, devant l'élevage de décembre-janvier (Sengupta et coll., 1971). Ceci indique que les conditions climatiques du Bengale occidental sont plus propices à l'élevage du ver à soie en février-mars qu'aux autres saisons.

CROISSANCE ET MATURITE

On a observé des différences qualitatives dues à la maturité de la feuille entre les feuilles tendres, moyennes et matures (Ito et Arai, 1963 ; Arai et Ito, 1963 ; Narayanan et coll., 1967). Les feuilles tendres contiennent des pourcentages plus élevés d'eau, de protéines et d'hydrates de carbone et des teneurs plus faibles en graisses, en minéraux et en fibres brutes que les feuilles matures et sénescentes (Sreedhara et coll., 1988 ; Anonyme, 1989 ; Rupa et coll., 1993). Sreedhara et coll. (1988) ont également observé que la teneur en chlorophylle était maximale entre le 30^e et le 48^e jour, la teneur en sucres réducteurs entre le 24^e et le 42^e jour et la teneur en sucres réducteurs entre le 13^e et le 30^e jour du développement de la feuille ; ces teneurs diminuent progressivement à mesure que la feuille vieillit. Du point de vue de la nutrition du ver à soie, les feuilles de mûrier âgées d'un mois sont qualitativement supérieures aux feuilles âgées de deux mois, elles-mêmes supérieures aux feuilles âgées de trois mois (Fonseca et coll., 1972). En général, les jeunes larves sont nourries avec des feuilles tendres contenant un pourcentage d'eau élevé (80 à 82 %) afin de faciliter l'ingestion et les larves des derniers âges sont nourries avec des feuilles matures qui ont une teneur en eau comparativement plus faible (73 à 75 %), tandis que les feuilles sénescentes et jaunies, dont les teneurs en éléments nutritifs sont médiocres, sont éliminées (Anonyme, 1975 ; Ito et Kobayashi, 1978 ; Ullal et Narasimhanna, 1987). Gabriel et Rapsuas (1976) ont observé que les larves des trois premiers âges nourries avec des feuilles tendres et les larves des deux derniers âges nourries avec des feuilles matures étaient robustes et présentaient un gain de poids par rapport aux larves nourries exclusivement soit avec des feuilles tendres, soit avec des feuilles matures pendant la totalité du stade larvaire. Cependant, le nourrissage des vers à soie avec des feuilles tendres pendant tout le stade larvaire n'a pas d'effet négatif sur le rendement en cocons et tend à se refléter positivement sur le poids larvaire, le taux effectif d'élevage, le poids du cocon, le poids de la coque, la longueur de la bave, la richesse soyeuse totale, etc. (Narayanan et coll., 1967 ; Krishnaswami et coll., 1970a ; Askari et Sharan, 1982 ; Anonyme, 1991). En dépit de ces observations, le nourrissage des jeunes larves avec des feuilles tendres et des larves adultes avec des feuilles matures est mieux accepté par les sériciculteurs. Ceci tend à confirmer la théorie selon laquelle les phases de croissance du ver à soie étant nettement compartimentées, les besoins nutritionnels doivent être satisfaits en conséquence (Ito et Kobayashi, 1978).

ESPACEMENT

Les différences d'espacement ont une influence sur les composants biochimiques du mûrier. Les plants fortement espacés bénéficient d'un ensoleillement et d'un apport adéquats en éléments nutritifs et en eau, sauf lorsque l'espacement est trop large et entraîne un assèchement du sol, condition favorable à la formation de substances biochimiques importantes. La valeur nutritive des feuilles de mûriers cultivés en espacement large est comparativement supérieure à celle des feuilles issues de mûriers plantés en espacement réduit. On a observé un contenu plus élevé en protéines brutes chez les feuilles de mûriers cultivés à un espacement de 90×90 cm que chez les feuilles de mûriers plantés à un espacement de 90×60 cm et des contenus plus élevés en eau et en minéraux totaux chez les feuilles de mûriers plantés à un espacement 90×60 cm que chez les feuilles de mûriers plantés à un espacement de 90×90 cm (Krishnaswami et coll., 1970c). Choudhury et coll. (1991) ont également observé que la teneur en protéines solubles et en protéines brutes était plus élevée chez les feuilles de mûriers irrigués plantés à 60×60 cm que chez les feuilles de mûriers plantés à un espacement de 60×30 cm, pour un rendement en feuilles équivalent. Das et coll. (1993) ont observé une amélioration significative du rapport cocon/feuille et du rendement absolu en soie lorsque les vers à soie sont nourris avec des feuilles de mûriers cultivés en régime pluvial et plantés à un espacement de 120×90 cm par rapport aux vers à soie nourris avec des feuilles de mûriers plantés à un espacement de 90×90 cm, pour un rendement équivalent. Cependant, Sengupta et coll. (1973) n'ont pas observé d'effet significatif entre les différences d'espacement ($45 \times 7,5$ cm, 45×23 cm et 45×45 cm) sur le rendement et la qualité des cocons. Par ailleurs, Krishnaswami et coll. (1971) ont observé une augmentation significative du poids de la larve, du poids du cocon, du taux effectif d'élevage (en nombre et en poids) et du rendement absolu en soie après nourrissage avec des feuilles de mûriers plantés en espacement rapproché (45×75 cm) par rapport aux feuilles de mûriers plantés en espacement large (45×45 cm) mais n'ont pas apporté d'explications sur ces résultats. En fait, à la lecture d'observations aussi contradictoires et en l'absence d'une étude biologique et biochimique globale, il est difficile d'expliquer l'effet de l'espacement sur la qualité de la feuille. En attendant la confirmation des résultats de Das et coll. (1993), les sericiculteurs d'Inde utilisent généralement l'espacement de 90×90 cm en régime pluvial (Krishnaswami, 1986a) et l'espacement de 60×60 cm en terrain irrigué (Choudhury et coll., 1991).

FUMURE

Pain et coll. (1965), Sengupta et coll. (1972, 1973), Ray et coll. (1973) et Quader et coll. (1990) ont observé que l'utilisation d'engrais azotés entraînait une amélioration de la qualité nutritive des feuilles se traduisant par une augmentation de la teneur en eau, en protéines brutes et en hydrates de carbone et une diminution du contenu en minéraux. La vaporisation foliaire d'une solution d'urée à 0,5 % améliore également ces teneurs biochimiques chez la feuille (Quader et coll., 1992). De plus, des études biologiques révèlent que le nourrissage des larves avec des feuilles cultivées en sol amendé à raison de 200 kg N/ha/an entraînait une augmentation significative du poids larvaire, du poids du cocon, du poids de la coque, de la longueur de la bave et du denier (Narayanan et coll., 1966 ; Sidhu et coll., 1969). Une corrélation significative entre le contenu en azote de la feuille et le poids du ver à soie, le poids du cocon et le poids de la coque a été observée par Sudo et coll. (1981). Il est généralement admis que les feuilles de mûriers cultivés avec des apports élevés en engrais azotés sont de qualité médiocre (Yokoyama, 1962). Cependant, Krishnaswami et coll. (1971) et Sengupta et coll. (1972) ont observé que l'application d'une dose s'élevant à 900 kg/ha/an n'avait pas d'effets négatifs et n'entraînait pas de pertes de récolte de cocons mais, au contraire, que cet apport permettait une amélioration du rendement et de la qualité des cocons. Ces chercheurs ont également observé que, si l'azote tend à améliorer la teneur en protéines de la feuille et à augmenter le rendement d'environ 6 % par 100 kg N/ha supplémentaires (au-delà de 300 kg), une augmentation de la teneur en azote au-delà de 300 kg/ha/an n'a pas d'effet marqué sur les paramètres du cocon.

Plusieurs recommandations ont été faites pour produire des feuilles de qualité en grandes quantités. Dans le sud de l'Inde, il est généralement recommandé d'appliquer 10 tonnes de fumier de ferme/ha/an en une fois et du NPK à raison de 100:50:50 kg/ha/an avec de l'azote en deux doses égales

pour les terrains non irrigués (Kasiviswanathan et coll., 1977a ; Krishnaswami, 1986a) et d'appliquer du fumier de ferme à raison de 20 tonnes/ha/an en une dose de base et du NPK à raison de 300:120:120 kg/ha/an, le N étant appliqué en cinq doses égales et le P et le K en deux doses égales, pour les terrains irrigués (Kasiviswanathan et coll., 1977b ; Krishnaswami, 1986a). Récemment, Das et coll. (1993) ont observé que, en terrain non irrigué, l'application de NPK à raison de 150:50:25 kg/ha/an entraînait une augmentation significative du rendement en feuilles par rapport à la dose de 100:50:50 kg/ha/an, pour des feuilles de qualité identique. Dans le Bengale occidental, en terrain irrigué, on recommande une application de 22 tonnes de fumier de ferme/ha/an et de NPK à raison de 336:180:112 kg/ha/an, l'azote étant appliqué en quatre doses égales (Ray et coll., 1973). Pour la région du Jammu-et-Cachemire, Fotedar et coll. (1988) ont préconisé l'application de 400 kg N et 50 kg K/ha/an, l'azote étant appliqué en trois doses égales, et de 20 tonnes de fumier de ferme/ha/an en une seule fois. Les variations de dosage des engrais pourraient être attribuées aux différences de fertilité entre les sols, de conditions agro-climatiques et de régime d'humidité des sols (absence ou présence d'irrigation) rencontrées dans les différentes zones séricicoles.

De plus, les besoins nutritionnels des larves jeunes et matures étant différents, il convient, pour les jeunes larves, de diminuer, dans une certaine mesure, l'apport en engrais azotés et d'appliquer du phosphore, de la potasse et du fumier de ferme en quantités suffisantes pour obtenir une récolte de feuilles présentant une teneur relativement élevée en hydrates de carbone (Anonyme, 1975). L'application de 40 tonnes de fumier de ferme/ha/an en deux doses égales et de NPK à raison de 225:150:150 kg/ha/an en huit doses égales correspondant à huit récoltes (à 45 jours d'intervalle), en terrain irrigué dans le Karnataka, entraîne, outre la production de 29 tonnes de feuilles pour jeunes larves/ha/an contenant 80 % d'eau, 25 % de protéines brutes et 13 % de sucres totaux (contre 6 à 7 tonnes de feuilles contenant 76 % d'eau, 21 % de protéines brutes et 11 % de sucres totaux dans une plantation normale), un taux maximal de mue chez les vers à soie même après réduction du nombre de nourissages (Mishra et coll., 1993).

Aucune recommandation n'a cependant été formulée pour ce qui concerne les doses de fumure et d'engrais nécessaires en terrain non irrigué pour le Bengale occidental, ni pour l'est de l'Inde, à l'exception d'une application de la dose recommandée pour la totalité du sud de l'Inde. De plus, la plupart des travaux ne sont pas basés sur l'absorption du NPK par le mûrier, information toutefois nécessaire pour déterminer les dosages.

IRRIGATION

Outre une augmentation de 68 % de la production de feuilles, l'irrigation entraîne également une amélioration de sa qualité (Kasiviswanathan et Iyengar, 1965). Le nourissage des larves avec des feuilles de mûriers cultivés en terrain irrigué donne une augmentation du poids larvaire, du poids du cocon, du poids de la coque ainsi que du denier (Narayanan et coll., 1966) ; ce qui démontre la supériorité du mûrier irrigué par rapport au mûrier cultivé en terrain non irrigué et sec. Mukherjee et coll. (1972) n'ont pas observé de modification sensible des teneurs en protéines, en sucres totaux et en minéraux ; ils ont toutefois noté une amélioration de la teneur en eau et en amidon chez les feuilles de mûriers irrigués. Par ailleurs, les feuilles de mûriers irrigués ont des teneurs en eau, en protéines totales, en hydrates de carbone totaux et lipides plus élevées et sont plus nutritives que les feuilles de mûriers non irrigués (Rangaswami et coll., 1976 ; Narasimhamurthy et coll., 1987 ; Anonyme, 1989).

Pour produire en grandes quantités des feuilles de bonne qualité, on préconise d'utiliser l'irrigation à la raie et d'appliquer 3,81 à 5,08 ha cm d'eau à intervalles de 10 jours en terrain de glaise sableuse et à intervalles de 15 jours en terrain de glaise argileuse de décembre à avril dans le sud de l'Inde (Krishnaswami, 1986a ; Choudhury et Giridhar, 1987), tandis que, dans le Bengale occidental, on recommande une application de 4,57 ha cm d'eau en terrain de glaise argileuse à intervalles de 15 jours de décembre à mai (Mukherjee et coll., 1972). Les variations des doses et des intervalles d'irrigation sont dues au fait que les terrains de glaise argileuse ont une capacité de rétention de l'eau plus importante que les terrains de glaise sableuse. Les systèmes d'irrigation au goutte-à-goutte et par aspersion permettent, outre une économie de 33 % de l'eau d'irrigation, de produire des feuilles de qualité et en quantité identiques à celles obtenues avec le système d'irrigation à la raie qui utilise 3,81 ha cm d'irrigation (Saratchandra et coll., 1992a). Saratchandra et coll. (1992a) ont également

observé, dans un test biologique, que le nourrissage avec des feuilles provenant de différents systèmes et différentes doses d'irrigation n'entraînait aucune variation des paramètres du rendement chez le cocon, à l'exception de la richesse soyeuse ; ce qui indique qu'il y a très peu, voire aucune, variation de la qualité de la feuille.

PAILLAGE

En régime pluvial, le paillage de la surface du sol et le recouvrement des espaces entre les rangées et à l'intérieur des rangées de mûrier avec des bâches en polyéthylène, de la paille de riz, des brindilles de mûrier sèches, du chaume, du lis d'eau et des feuilles de cocotier permettent non seulement d'augmenter l'humidité du sol de 1,34 à 6,3 % et le rendement en feuilles de 24,2 à 48,0 % (pour les trois premiers paillages) et de 46,5 à 58,3 % (pour les trois derniers paillages), mais également d'améliorer le contenu en eau des feuilles de 1,39 à 1,76 % par rapport aux sols nus (Purohit et coll., 1990, 1992). L'utilisation d'herbe sèche pour recouvrir le sol permet également d'augmenter de 10,9 % le contenu en azote total de la feuille et l'utilisation de bâches en polyéthylène de 2,2 % ; cependant, les tests biologiques n'ont fait apparaître aucune amélioration significative du développement larvaire et des paramètres du cocon, à l'exception de la richesse soyeuse (pour les bâches en polyéthylène), par rapport au témoin (Das et coll., 1990).

Il reste à faire une étude globale de l'effet du paillage sur la qualité foliaire.

TAILLE

La qualité des feuilles de mûrier varie en fonction des formes de culture (Dasgupta, 1961 ; Bhuyian, 1981). Les feuilles de mûriers cultivés sous forme d'arbres sont plus riches en protéines brutes, en hydrates de carbone solubles et en fibres brutes et plus pauvres en eau que les feuilles issues de mûriers cultivés en arbustes (Anonyme, 1975 ; Qaiyyum et coll., 1991). Il a également été observé au Japon que, chez les mûriers cultivés sous forme d'arbres, la taille du premier tiers des jeunes pousses d'été, qui se développent après la récolte des pousses en juillet, entraînait une augmentation des contenus en chlorophylle, en protéines solubles totales, en carboxylase biphosphate ribulose (RuBPCase), en ARN et en amidon des feuilles ; tandis que ce même type de taille à la fin de l'été, appliqué aux pousses âgées qui se sont développées depuis le printemps, ne donne aucune variation sensible, sauf pour ce qui concerne le contenu en ARN (Yamashita et Fujino, 1986). On a observé une diminution du rendement en feuilles et une augmentation du contenu en eau (74,5 %) chez les mûriers nains (hauteur de la tige principale : 90 cm) lorsque les branches situées à l'extrémité de la tige principale sont taillées jusqu'à la base, par rapport aux témoins non taillés et aux plants taillés sur une longueur de 1,0 à 1,25 m ; ce qui suggère que les tailles courtes (0,0 à 0,75 m) sont appropriées à l'élevage des jeunes larves et que les tailles longues (1,0 à 1,25 m) sont appropriées à l'élevage des larves du troisième âge (Koul et Bhagat, 1991). De plus, étant donné les différences observées chez les composants biochimiques des feuilles de mûriers cultivés en arbustes et sous forme d'arbre, on a proposé de nourrir les jeunes larves avec des feuilles d'arbustes et les larves des derniers âges avec des feuilles d'arbres (Qaiyyum et coll., 1991). Cependant, Rahman et Mandal (1977) n'ont observé aucun effet de ces différentes formes de culture sur le poids des larves de la race Nistari.

La hauteur et la fréquence de la taille des mûriers cultivés en arbustes affectent également la qualité des feuilles. Sudradjat (1989) a observé que, bien que la taille à différentes hauteurs (20, 70, 120 cm) n'influence pas la quantité produite, la taille à une hauteur de 70 cm donne des feuilles contenant davantage de protéines, de calcium et de phosphore que celles issues de plants taillés à 20 et 120 cm au-dessus du sol. Choudhury et coll. (1991) ont observé une augmentation du rendement en feuilles et des contenus en sucres solubles et en protéines des feuilles lorsque la hauteur de la couronne est portée à 40 cm au-dessus du sol et en adoptant la méthode graduelle de récolte des pousses avec une taille basale une fois par an. Sen et coll. (1991) ont observé une tendance similaire pour la teneur en sucres totaux et en amidon chez les feuilles de mûriers taillés à 35 cm au-dessus du niveau du sol par rapport aux plants taillés à la base. De plus, le taux de survie, le rendement en cocons et le contenu absolu en soie des hybrides bivoltins NB₁₈ × NB₇ enregistrent une augmentation significative respectivement de 11,5, 17,0, et 18,0 % lorsqu'ils sont nourris avec des feuilles de mûriers taillés à

35 cm au-dessus du sol aux trois premiers âges et avec des feuilles de mûrier taillées à la base aux deux derniers âges, par rapport aux larves nourries avec des feuilles de mûriers taillées à la base pendant la totalité du stade larvaire (Vinod Kumar et Benchamin, 1990).

Pour ce qui concerne la fréquence de la taille, Krishnaswami et coll. (1970c) ont observé que les mûriers taillés trois fois par an (février, juin et octobre) enregistraient une augmentation du rendement et donnaient des feuilles présentant des teneurs en protéines et hydrates de carbone élevées par rapport aux mûriers taillés deux et quatre fois par an. Les fréquences recommandées et généralement acceptées par les sériciculteurs sont d'une taille basale pour les mûriers non irrigués et plantés en espacements larges (90 × 90 cm) et de cinq tailles basales pour les mûriers irrigués plantés en espacements rapprochés (Kasiviswanathan et Krishnaswami, 1979 ; Choudhury et Giridhar, 1987). Cependant, des études récentes réalisées dans le Bengale occidental révèlent que la taille basale en mai et en août et le ramassage des feuilles en février et en novembre chez les mûriers irrigués plantés à un espacement de 60 × 60 cm permettait d'augmenter le rendement en feuilles de 10 % par rapport à la méthode habituelle de quatre tailles basales, pour une production de feuilles de même qualité (Anonyme, 1991).

Les derniers résultats obtenus (Choudhury et coll., 1991 ; Sen et coll., 1991 ; Anonyme, 1991) demandent confirmation.

PERIODE ET METHODE DE RAMASSAGE DES FEUILLES

D'après Ullal et Narasimhanna (1987), en raison de la transpiration active et de la photosynthèse, les feuilles récoltées à la fin de l'après-midi contiennent moins d'eau et plus d'hydrates de carbone et que ces feuilles se flétrissent plus rapidement que les feuilles récoltées en début de matinée. Cependant, d'après des résultats obtenus sur six élevages avec des feuilles récoltées à 6h00, 12h00, 16h00 et conservées en chambre souterraine, Sengupta et coll. (1971) ont observé que l'heure de récolte des feuilles n'avait pas d'effet significatif sur les paramètres de la larve et du cocon, sauf pour ce qui concerne les feuilles récoltées à 16h00 qui enregistrent un effet significatif uniquement sur le rendement pour 10 000 larves. Pour ce qui concerne les saisons, ils ont observé que les feuilles récoltées l'après-midi ont un effet significatif sur les caractères qualitatifs et quantitatifs du cocon pendant les saisons chaudes (juin-juillet, juillet-août) mais pas pendant les saisons fraîches (octobre-novembre à février-mars). Ceci pourrait être dû à l'accumulation plus importante d'éléments nutritifs pendant la journée et à un arrêt plus rapide pendant la nuit au cours des mois chauds alors que cette variation est modérée en hiver du fait de la très basse température.

Pour ce qui concerne l'effet de la méthode de récolte sur la qualité de la feuille, Kasiviswanathan et coll. (1973) ont observé que les feuilles coupées (ramassage des feuilles) contenaient davantage d'eau que les feuilles intactes (ramassage des rameaux). Les vers à soie nourris avec des feuilles coupées jusqu'au deuxième âge (élevage chawki) puis avec des rameaux à partir du troisième âge présentaient un meilleur développement larvaire et donnaient un meilleur rendement en cocons en quantité et en qualité que ceux nourris avec des feuilles coupées pendant la totalité du stade larvaire (Anonyme, 1986).

TRANSPORT ET CONSERVATION DES FEUILLES

Il y a souvent un délai considérable entre le moment de la récolte des feuilles et le nourrissage des vers à soie lors de l'élevage. Si elles ne sont pas stockées dans de bonnes conditions, les feuilles perdent leur eau et deviennent impropres au nourrissage des vers à soie. Les feuilles détachées doivent donc être conservées dans un panier en bambou doublé et recouvert de toile de jute humide pendant la récolte et le transport jusqu'au local d'élevage. Immédiatement après la récolte, les rameaux doivent être recouverts d'une toile de jute ou d'une feuille de polyéthylène. Kasiviswanathan et coll. (1973) ont observé que la perte d'eau était beaucoup plus faible et que les feuilles restaient succulentes avec 74,95 % d'eau lorsqu'elles étaient recouvertes d'une toile de jute et 68,7 % sous feuille de polyéthylène même après 24 heures de stockage. Dans des études plus anciennes, Mandal et Krishnaswami (1965) n'ont observé aucune variation sensible des teneurs en sucres et en protéines des feuilles stockées sur une période allant jusqu'à 24 heures. Cependant, Narasimhamurthy et coll. (1987) ont obtenu une diminution significative des teneurs en protéines totales et en hydrates de carbone des feuilles après

12 heures de conservation (dans une chambre foliaire) bien qu'il n'y ait pas de variation sensible des teneurs en polysaccharides et en lipides par rapport aux feuilles fraîches. La réduction des teneurs en protéines et en hydrates de carbone des feuilles pourrait être due à l'augmentation de la protéolyse (dissociation des protéines en acides aminés) et à la consommation d'une certaine quantité d'acides aminés pour le métabolisme oxydatif pendant la respiration. La perte d'eau chez les feuilles de mûrier coupées varie d'une variété à l'autre. Sastry et coll. (1988) ont observé que la perte de teneur en eau en 7 heures (de 9h00 à 16h00) chez les feuilles de mûrier récoltées était minimale chez S30 ($17,16 \pm 0,94$ %), devant, par ordre croissant, S36 ($23,17 \pm 0,98$ %), S54, S41, K2 et la variété de mûrier locale.

DISCUSSION ET SUGGESTIONS

La synthèse présentée ici fait apparaître des lacunes dans notre connaissance de la qualité de la feuille chez le mûrier. Des recherches complémentaires devraient donc être entreprises afin de combler ces lacunes, confirmer ou infirmer les résultats ou propositions de nombreux chercheurs sur les aspects suivants.

1) On a étudié le rendement et la qualité de certains cultivars de mûrier exclusivement dans le sud de l'Inde, tandis que d'autres cultivars n'ont été étudiés que dans le Bengale occidental et l'est de l'Inde. Les cultivars qualitativement supérieurs de ces deux régions devraient être rapprochés et soumis à un test sur plusieurs sites simultanément afin de disposer de données comparatives et consolidées sur leur rendement et leur qualité par rapport à la performance d'élevage. Bien que certains cultivars comme MR2, Tr4, Tr10, S1635, S1, C1730, C776 et Tr8 (27 000 à 35 000 kg feuilles/ha/an) produisent des feuilles de qualité supérieure, leur rendement est inférieur à celui de S30, S36 et S54 (42 000 à 47 000 kg/ha/an) (cf. Anonyme, 1983). Des études devraient donc être réalisées afin d'induire les propriétés liées au rendement élevé chez les cultivars donnant des feuilles de qualité supérieure et un rendement faible.

2) Il faudrait expliquer les résultats obtenus dans des études isolées démontrant que les feuilles de mûriers cultivés à espacements large ont des teneurs en protéines brutes et en sucres solubles plus élevées (Krishnaswami, 1970c ; Choudhury et coll., 1991) mais que celles des mûriers cultivés en espacements rapprochés donnaient un meilleur développement larvaire et de meilleurs caractères du cocon (Krishnaswami et coll., 1971). Pour une meilleure compréhension de ce sujet, l'effet de l'espacement sur la qualité de la feuille doit être évalué en combinant des tests biologiques et biochimiques dans une seule et même expérience.

3) En Inde, la plupart des travaux sur les engrais chez le mûrier ne tiennent pas compte de l'absorption de NPK par les plantes dans l'évaluation de la dose optimale pour le rendement et la qualité des feuilles. C'est un aspect important qui nécessite des études approfondies afin de confirmer ou d'infirmer les recommandations actuelles pour le dosage de NPK dans les différentes zones agro-climatiques d'Inde. La recommandation faite récemment concernant le dosage de NPK pour les plantations de mûriers destinés aux jeunes larves doit également être confirmée. Des études devraient être réalisées afin de déterminer la dose d'engrais optimale pour améliorer le rendement et la qualité dans les plantations non irriguées du Bengale occidental (est de l'Inde).

4) Il conviendrait d'évaluer l'effet sur la qualité et de la quantité de feuilles des différentes méthodes d'irrigation (goutte-à-goutte, aspersion, raie et souterraine) dans différentes conditions édapho-climatiques afin de confirmer/infirmer les résultats de Saratchandra et coll. (1992a).

5) Aucun des résultats obtenus sur le paillage chez le mûrier ne concerne les effets sur la qualité de la feuille. Il conviendrait donc d'entreprendre des tests biologiques et biochimiques afin d'évaluer en détail les effets du paillage sur la qualité de la feuille.

6) Les études isolées sur la taille chez le mûrier ne permettent pas de se faire une idée précise sur son effet sur la qualité de la feuille. Une expérience intégrée et comparative des résultats de Choudhury et coll. (1991), Sen et coll. (1991) et Anonyme (1991) et de la méthode habituellement employée combinée avec des tests biologiques et biochimiques pourrait permettre de mettre au point la technique de taille optimale pour améliorer la production foliaire sur les plans qualitatif et quantitatif sans affecter la rentabilité.

CONCLUSION

De cette analyse, il ressort que la "qualité" reste un concept complexe donnant lieu à des interprétations conflictuelles s'agissant du mûrier. Il n'existe pas d'étalon ou de standard pour mesurer cette "qualité". Elle ne peut être perçue que par des observations empiriques et ceci dérouté même les scientifiques et sériciculteurs confirmés lorsqu'il s'agit d'élaborer des recommandations ou des standards de la qualité. Cependant, sur la base des informations disponibles, on peut proposer les recommandations suivantes pour une production de feuilles de qualité et un bon rendement :

1) Culture de cultivars de mûrier comme MR₂, Tr₄, Tr₁₀, S₁₆₃₅, C₁₇₃₀, G₉, G₇, G₃, S₃₀, S₃₆, S₄₁, S₅₄, S₁, etc.

2) Adoption des espacements recommandés pour les plantations irriguées et non irriguées.

3) Application au moment favorable des doses recommandées de fumures et d'engrais dans les plantations destinées à l'élevage des jeunes larves et celles destinées aux larves adultes.

4) Irrigation avec les quantités recommandées d'eau aux intervalles prescrits.

5) Adoption des mesures de conservation de l'eau dans le sol ; par exemple, couverture du sol dès l'arrêt de la mousson pour les mûriers non irrigués.

6) Une taille basale pour les mûriers non irrigués et 4 à 5 tailles basales pour les mûriers irrigués en Inde.

7) Adoption de la méthode de la coupe des feuilles pour l'élevage des jeunes larves et du ramassage des rameaux pour les larves adultes ; conservation des feuilles dans une toile de jute.

CHROMOSOMAL FEATURES AT DIFFERENT MEIOTIC STAGES DURING SPERMATOGENESIS IN *BOMBYX MORI*

Y. BANNO*, Y. KAWAGUCHI, K. KOGA & H. DOIRA

Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-Ku, Fukuoka 812, Japan.

A number of cytological studies have been carried out on the chromosomes in Bombyx mori, but a detailed series of photomicrographs during meiosis has not been published for this species. In the present study, testes were dissected from male larvae of a standard strain (p22) at different ages between day 2 of the 4th instar and day 6 of the 5th instar, spread and observed for the chromosomal configuration during meiosis. At the first stage of meiotic prophase (leptotene) the chromosomes looked like a mesh. Even at the next stage (zygotene) the chromosomes were only partially recognized as threads. The pachytene chromosomes, now completely paired, were to some extent distinguishable from each other by their relative lengths. The paired chromosomes began to separate at the diplotene stage and chiasmata were clearly seen at the diakinesis stage. Tetrads (28 in number) were easily detected at metaphase I. During anaphase I, each tetrad separated into two dyads which migrated towards the poles, and at telophase I the nucleolar complexes appeared. At metaphase II the chromosomes became very small and could be readily discriminated from those at other stages.

Keywords: Meiosis, chromosomes, spermatogenesis, *Bombyx mori*.

INTRODUCTION

Fine drawings of meiotic chromosomes of *Bombyx mori* were first made by Kawaguchi (1928) using paraffin-sections of spermatocytes and oocytes. Since then, by more advanced techniques for microscopic observation and chromosomal preparation, several lines of critical information related to meiosis in *B. mori* have been provided (Murakami and Imai, 1974; Traut, 1976; Kawazoe, 1987; Kawamura, 1990, 1994; Kawamura and Niino, 1991; Banno *et al.*, 1993, 1995). However, the complete story of meiotic events with photographs for this species has not so far been described. This situation prompted us to record more completely the changes in chromosomal configuration during the total course of meiotic events in this species. The present article focuses on spermatogenesis, since our previous investigation (Banno *et al.*, 1995) indicated that the male germ cells serve as better material for the observation of meiotic chromosomes than those of females. The appropriate period for the preparation of testis specimens was found to be from day 2 of the 4th instar until day 5 of the final instar of male larvae for the silkworm strain used in this study.

MATERIALS AND METHODS

The strain used was p22, which is a standard line maintained by sib matings in Kyushu University since 1924 (Doira *et al.*, 1992). Larvae of this strain were reared on mulberry leaves at 25 °C. The duration of the 4th instar, 4th molt and 5th instar were 3, 1.5 and 6 days, respectively, under the present conditions (spinning started on day 5 of the last instar). At appropriate periods specified later, testes were taken out of the larvae and processed by the method essentially according to Imai *et al.* (1977).

* Corresponding author.

In brief, the tissues were immersed in a hypotonic KCl solution (5%) for 30 to 90 min. in a Petri dish and transferred to a glass slide, whereon these were washed with 60% ethanol/acetic acid (3:1 v/v), crushed with forceps and wet with 2 drops of fixative 60% ethanol/acetic acid (1:1 v/v). The slide was allowed to dry at room temperature and before complete drying the latter solution was added again. This was repeated four or five times and finally the slide was left overnight. The tissues were then stained with 3% Giemsa in 40 mM sodium-potassium phosphate buffer, pH 6.8, for 30 to 60 min. at room temperature and rinsed in running water. For somatic chromosomes, embryonic cells at the blastokinesis stage (on day 4 after fertilization for p22) were dissected onto a slide and processed by the method of Kawazoe (1987). All of the specimens were observed under a Zeiss Axioplan microscope (Germany) and photographed using Neopan F film. Prints of about 850 magnification in diameter were made on Mitsubishi photographic paper F3 and F4.

RESULTS AND DISCUSSION

Chromosomal figures during spermatogenesis were recorded as summarized in Figures 1 to 3. First, the somatic chromosomes of the strain were investigated using embryonic cells and the number was confirmed to be $2n = 56$ (Figure 1, A), the normal chromosome number for *B. mori*. Then, the chromosomal figures during spermatogenesis were recorded as follows. The dates in parentheses indicate the confirmed, most adequate ages of p22 larvae for the preparation of testes in which chromosomes at the respective pre-meiotic and meiotic stages were present.

Pre-meiotic stage (day 2 of the 4th instar):

The chromosomes in the spermatogonium, again $2n = 56$ in number (B), were thoroughly rod- or dot-shaped, making the counting easy but preventing the characterization of individual members. This situation is often reported as resulting from the holokinetic nature of the chromosomes in this insect (Murakami and Imai, 1973). Sometimes, an appearance like a secondary constriction was seen in the region close to a distal end of a chromosome (arrows in B), but its frequency depended upon the specimen.

Interphase and leptotene (day 3 of the 4th instar):

The chromosomes seen in C were at the transient interphase preceding the long prophase. No regular arrangement of chromosomes was detected and further analyses were difficult. Many cells on this day contained leptotene chromosomes which formed a mesh, seemingly composed of thin thread-like structures (D).

Zygotene (from day 3 of the 4th instar to day 1 of the 4th molt):

Generally, synapsis (pairing of homologous chromosomes) starts from both chromosomal ends at the zygotene stage to form bivalents, which can be called tetrads since each chromosome undergoes replication prior to the onset of prophase. In the present specimens, the chromosomes yielded more distinct thread-like structures (E) than before, which seemed to be expanded as synapsis progressed, although further details could not be analyzed.

Pachytene (days 1 to 3 of the 5th instar):

As soon as synapsis is completed all along homologous chromosomes, the stage is said to be pachytene, when crossing-over events may occur (Holm and Rasmussen, 1980). Now the chromosome number was 28 (F and Figure 2, G). As this stage progressed, the threads became shorter and more condensed (compare Figure 1, F and Figure 2, G). In some specimens (Figure 2, H), the chromosomes were partly distinguished from each other by their relative lengths. This was impossible for the whole set of chromosomes, although it is pachytene when the individual chromosomes in many organisms are characterized by their distinct lengths and chromomere patterns.

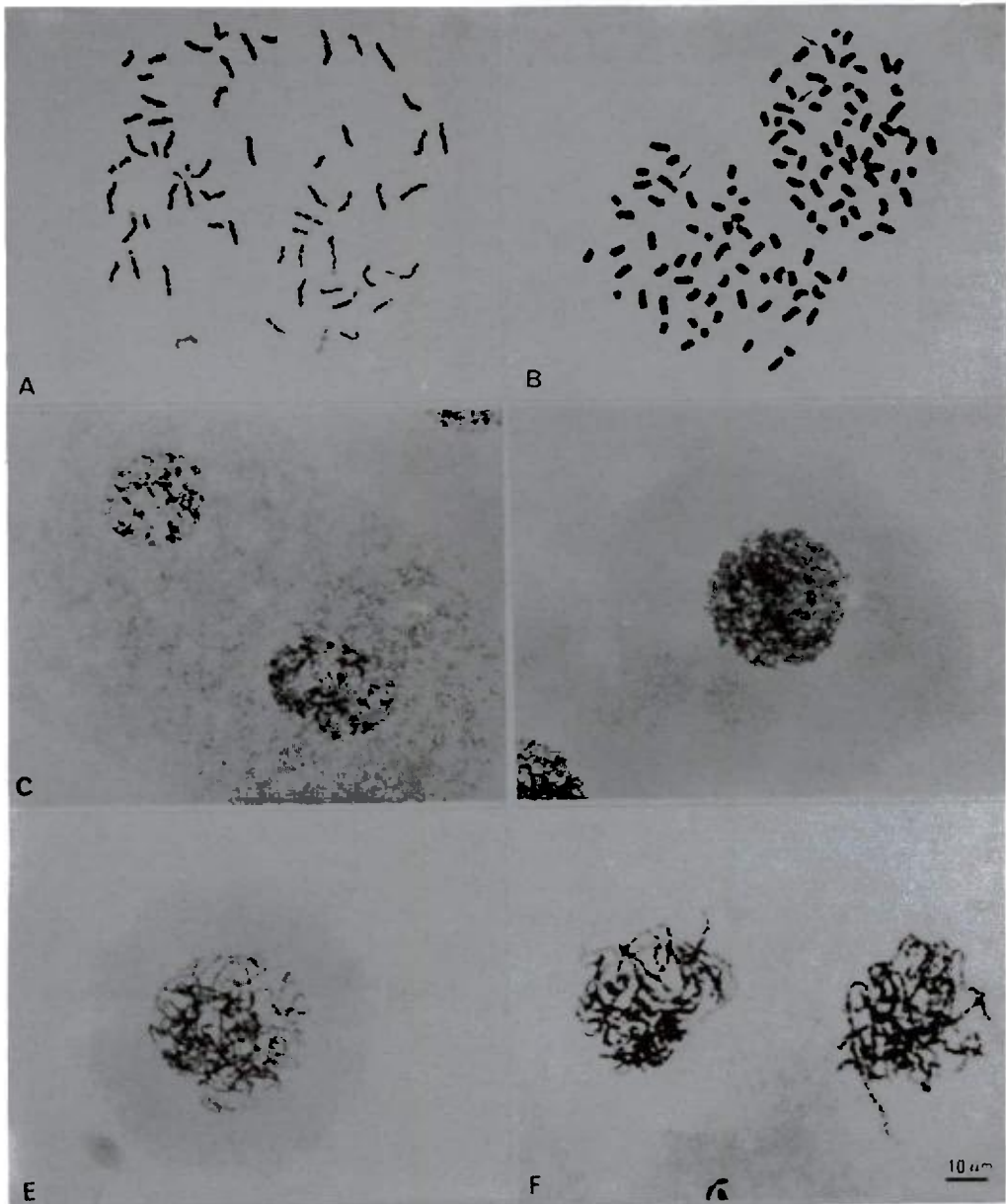


Fig. 1: Chromosomal configuration during mitosis and meiosis.

A: metaphase of mitosis in embryonic cells. **B:** metaphase of mitosis in spermatogonia. Arrows indicate secondary constriction. **C to F:** different stages of meiosis in spermatocytes; **C:** interphase; **D:** leptotene; **E:** zygotene; **F:** pachytene (early). Scale seen in F is common to all figures.

Fig. 1 : Configuration des chromosomes au cours de la mitose et de la méiose.

A : métaphase de la mitose dans les cellules embryonnaires. **B :** métaphase de la mitose dans les spermatogonies. Les flèches indiquent la constriction secondaire. **C à F :** différents stades de la méiose chez les spermatocytes ; **C :** interphase ; **D :** leptotène ; **E :** zygotène ; **F :** pachytène (début). L'échelle donnée en F est commune à toutes les figures.

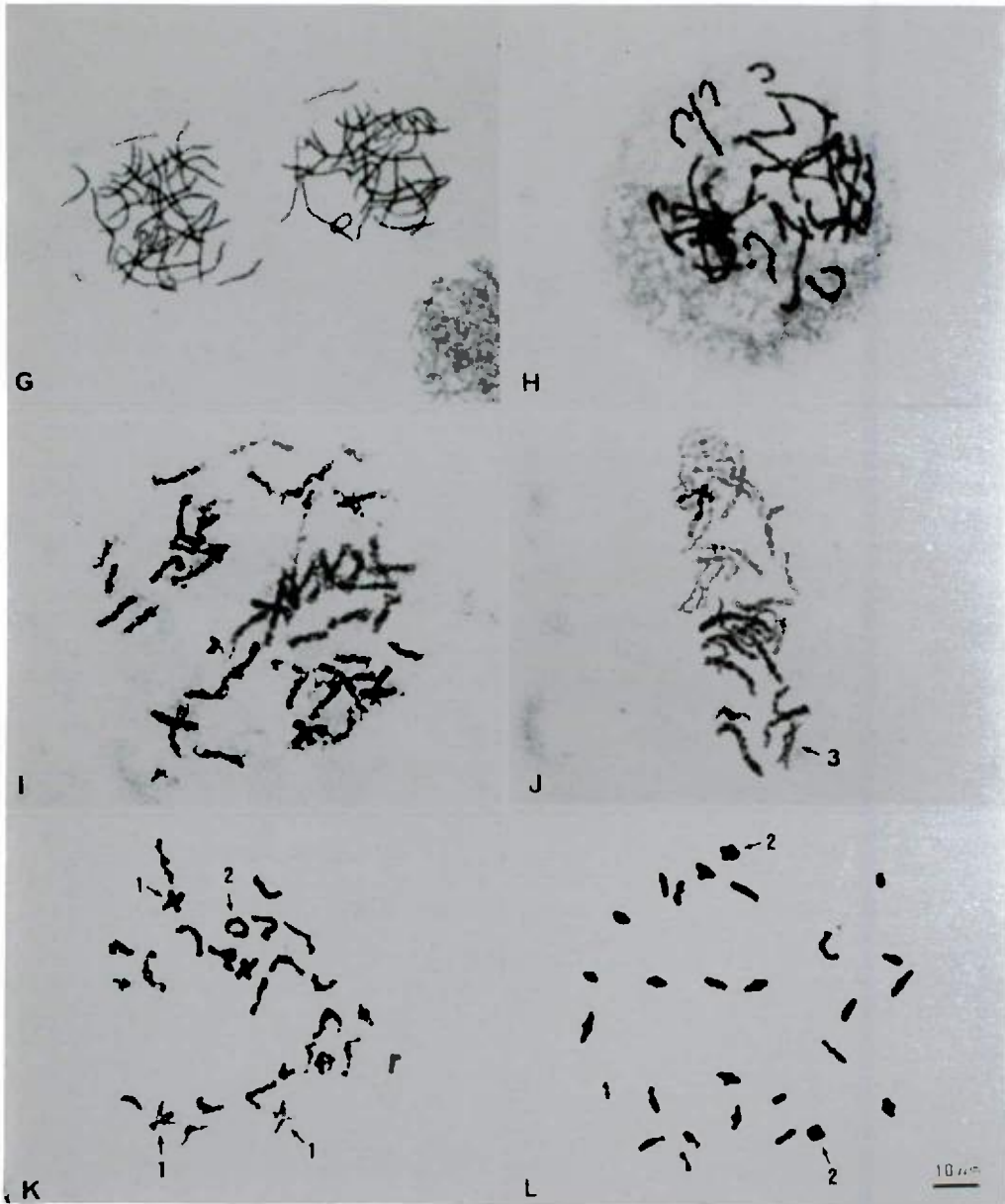


Fig. 2: Chromosomal configuration during meiosis (continued).

G: pachytene (middle); H: pachytene (late); I: diplotene seen in 2 cells; J: diplotene (late); K: diakinesis; L: diakinesis (late). See text for arrows 1, 2 and 3. Scale bar seen in L. is common to all figures.

Fig. 2 : Configuration des chromosomes au cours de la méiose (suite).

G : pachytène (milieu) ; H : pachytène (fin) ; I : diplotène chez 2 cellules ; J : diplotène (fin) ; K : diacinese ; L : diacinese (fin). Se reporter au texte pour la signification des flèches 1, 2 et 3. L'échelle donnée en L est commune à toutes les figures.

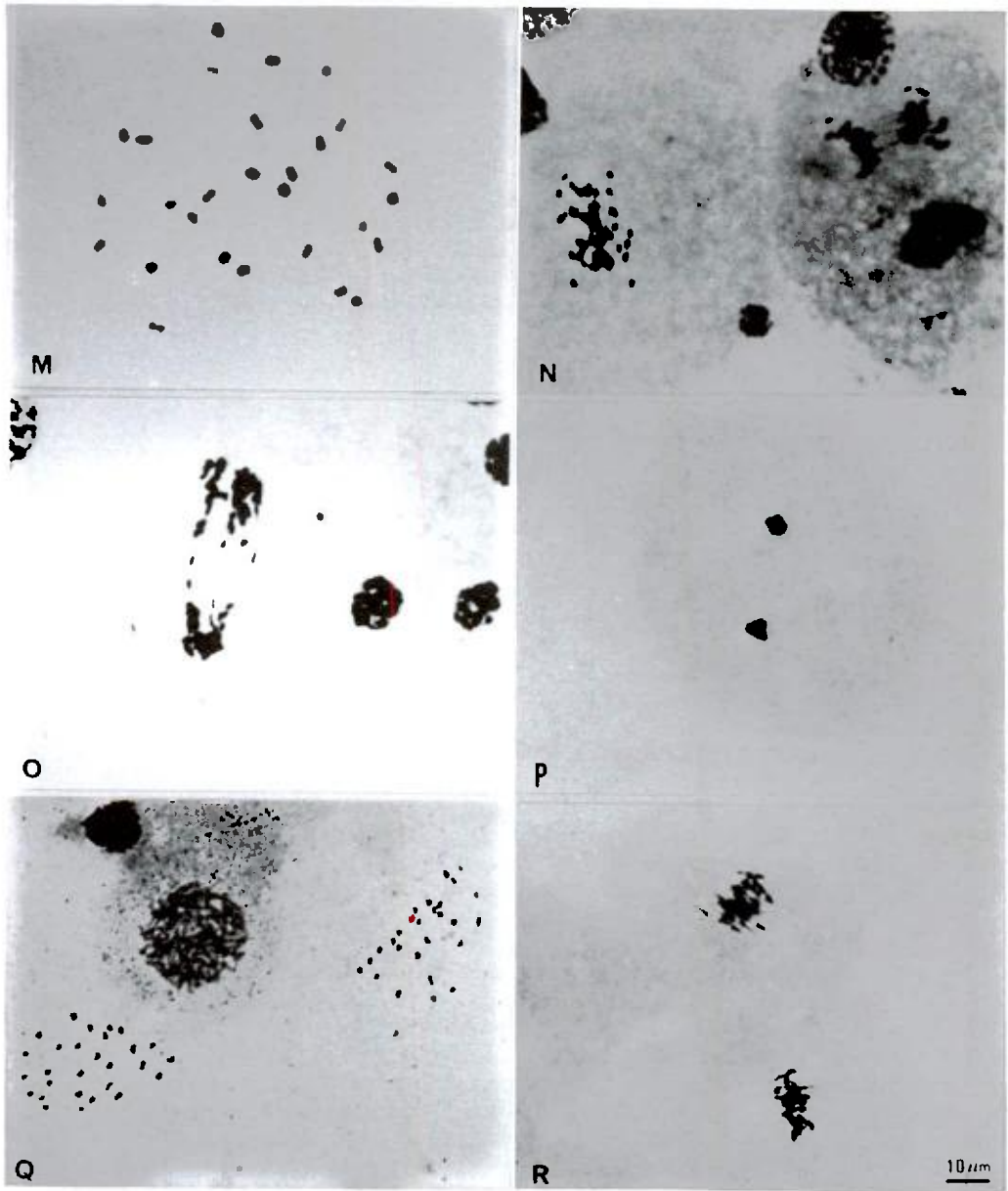


Fig. 3 : Chromosomal configuration during mitosis and meiosis (continued).

M: metaphase I ; **N:** anaphase I (early) ; **O:** telophase I ; **P:** telophase I ; **Q:** metaphase II ; **R:** anaphase II. Scale seen in R is common to all figures.

Fig. 3 : Configuration des chromosomes au cours de la mitose et de la méiose (suite).

M : métaphase I ; **N :** anaphase I (début) ; **O :** télophase I ; **P :** télophase I ; **Q :** métaphase II ; **R :** anaphase II. L'échelle donnée en R est commune à toutes les figures.

Diplotene (day 3 of the 5th instar):

Usually chromosomes at diplotene undergo the formation of chiasmata that are believed to be the results of crossing-over events. A large number of specimens were needed to recognize the diplotene chromosomes (I and J) because of the small availability of cells with chromosomes at this stage. This indicates that the diplotene stage in the male germ cells of *B. mori* is likely to be very short in duration.

Diakinesis (day 3 of the 5th instar):

The tetrads at late diplotene and diakinesis often took on cruciform or ring configurations (arrows 1 and 2, respectively, in K and L). These are known to be due to the separation of homologous chromosomes and the appearance of chiasmata. The separation initiated at diplotene is generally not complete, for homologous chromosomes are held together at one or more chiasmata. A single chiasma within a tetrad will bring about a cruciform configuration of chromosomes. Two chiasmata at distal regions will give rise to a ring configuration; both were typically seen in the present specimens. If there are three or more chiasmata, tetrads become a structure like the succession of circles shown by arrow 3 in J. No such structure has been detected so far at diakinesis.

Metaphase I (day 4 of the 5th instar):

The chromosomes at metaphase I in *B. mori* were almost bell-shaped like those in other lepidopterans (Suomalainen, 1953), and 28 tetrads could be counted (Figure 3, M). In organisms with localized centromeres, each chromosome at metaphase I has one constriction that marks the position of the centromere and the chromosomes are classified based on the site of constriction. This was impossible in the present study, as well as in previous preparations from *B. mori* (Murakami and Imai, 1974), since no chromosomes exhibited distinct constrictions.

Anaphase I to telophase I (day 4 of the 5th instar):

Each of the tetrads began to separate into a pair of dyads at the beginning of anaphase I (N) and eventually the chromosomes reached telophase I (O), when 2 condensed sister nuclei were observed (P). After this stage comes a brief interphase, which is in turn followed by metaphase II.

Metaphase II (day 5, at the onset of spinning of the 5th instar):

Although the chromosomal features at metaphase II (Q) were similar to those at metaphase I, the size of each chromosome was considerably smaller than at metaphase I and this size difference was utilized as an index for discriminating the stages with short intervals (Banno *et al.*, 1995).

Anaphase II (day 5 of the 5th instar):

The final photomicrograph (R) illustrates that the chromatids at anaphase II have just started to migrate toward the opposite poles. Each chromosome took on a triangular configuration. Chromosomes at the final stage of meiosis (telophase II) are not shown.

In the majority of species the time after metaphase II is known to occupy only 10% or less of the total time required for meiosis. Also in the present case, anaphase I, metaphase II and anaphase II were completed within a very short period of time, and therefore rare in our preparations.

This report presents for the first time a consecutive pictorial account of meiosis in the male reproductive organ of *B. mori*. This will provide a foundation for additional study to clarify unsolved problems about meiotic processes occurring in the oocyte and for future use of molecular hybridization as a tool for cytogenetic analysis.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research, No. 06660067, from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan.

REFERENCES

- BANNO Y., KAWAGUCHI Y., DOIRA H. (1993) Cytogenetical analysis of chromosomal aberration due to translocation between the 23rd and 25th linkage groups in the silkworm, *Bombyx mori*. *Hereditas*, 118, 259-263.
- BANNO Y., KAWAGUCHI Y., KATSUMI K., DOIRA H. (1995) Postreductional meiosis in male of the mutant with chromosomal aberration "T(23;25)Nd" of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Sericult. Sci. Japan*, 64, 410-414.
- DOIRA H., FUJII H., KAWAGUCHI Y., KIHARA H., BANNO Y. (1992) Genetical stocks and mutations of *Bombyx mori* important genetic resources. Kyushu University, Fukuoka, Japan, p. 73.
- HOLM P.B., RASMUSSEN S.W. (1980) Chromosome pairing, recombination nodules and chiasma formation in diploid *Bombyx* males. *Carlsberg Res. Commun.*, 45, 483-548.
- IMAI T.H., ROSS H.C., ROBERT W.T. (1977) Karyotype evolution in Australian ants. *Chromosoma*, 59, 341-393.
- KAWAGUCHI E. (1928) Zytologische Untersuchungen am Seidenspinner und seinen Verwandten. I. Gametogenese von *Bombyx mori* L. und *Bombyx mandarina* M. und ihrer Bastarde. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. Bd.*, 7, 519-552.
- KAWAMURA N. (1990) Is the egg size determining gene, *Esd*, on the W chromosome identical with the sex-linked giant egg gene, *Ge*, in the silkworm? *Genetica*, 81, 205-210.
- KAWAMURA N. (1994) Male meiosis in polyploid silkworms, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). *J. Insect Morphol. and Embryol.*, 23, 311-317.
- KAWAMURA N., NIINO T. (1991) Identification of Z-W bivalent in the silkworm, *Bombyx mori*. *Genetica*, 83, 121-123.
- KAWAZOE A. (1987) Comparative karyotype analysis of the silkworms, *Bombyx mori* Linnaeus and *B. mandarina* Moore (Lepidoptera: Bombycidae). *La Kromosomo* II, 46, 1521-1532.
- MURAKAMI A., IMAI T.H. (1974) Cytological evidence for holocentric chromosomes of silkworm, *Bombyx mori* and *B. mandarina* (Bombycidae, Lepidoptera). *Chromosoma*, 47, 167-178.
- SUOMALAINEN E. (1953) The kinetochore and the bivalent structure in the lepidoptera. *Hereditas*, 39, 88-96.
- TRAUT W. (1976) Pachytene mapping in the female silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera). *Chromosoma*, 58, 275-284.

CARACTERISTIQUES DES CHROMOSOMES A DIFFERENTS STADES MEIOTIQUES DE LA SPERMATOGENESE CHEZ *BOMBYX MORI*

Y. BANNO*, Y. KAWAGUCHI, K. KOGA & H. DOIRA

Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-Ku, Fukuoka 812, Japon.

Un certain nombre d'études cytologiques ont été réalisées sur les chromosomes chez Bombyx mori, mais aucune série détaillée de microphotographies au cours de la méiose n'a été publiée pour cette espèce. Dans cette étude, des testicules de larves mâles d'une souche standard (p22) ont été disséqués à différents âges entre le 2^e jour du 4^e âge et le 6^e jour du 5^e âge et préparés pour examen de la configuration chromosomique au cours de la méiose. Au premier stade de la prophase méiotique (leptotène), les chromosomes présentent une structure en réseau. Même au stade suivant (zygotène), les chromosomes ne présentent que partiellement une apparence de filaments. Les chromosomes pachytènes, complètement apparus à ce stade, se distinguent plus ou moins les uns des autres par leur longueur relative. Les chromosomes appariés commencent à se séparer au stade diplotène et les chiasmas sont clairement visibles au stade diacinèse. Les tétrades (au nombre de 28) sont faciles à détecter à la métaphase I. Au cours de l'anaphase I, chaque tétrade se divise en deux dyades qui migrent vers les pôles ; à la télophase I, les complexes nucléolaires apparaissent. A la métaphase II, les chromosomes deviennent minuscules et sont faciles à distinguer de ceux des autres stades.

INTRODUCTION

Les premières représentations fines de chromosomes méiotiques de *Bombyx mori* ont été dessinées par Kawaguchi (1928) à partir de coupes en paraffine de spermatocytes et d'ovocytes. Depuis, des techniques plus avancées basées sur l'observation au microscope et la préparation des chromosomes ont permis d'obtenir des renseignements importants concernant la méiose chez *B. mori* (Murakami et Imai, 1974 ; Traut, 1976 ; Kawazoe, 1987 ; Kawamura, 1990, 1994 ; Kawamura et Niino, 1991 ; Banno et coll., 1993, 1995). Cependant, la chronologie complète des événements méiotiques n'a pas encore été décrite à l'aide de photographies pour cette espèce. Ceci nous a incité à procéder à une étude approfondie des modifications de la configuration chromosomique pendant toute la durée des événements méiotiques chez cette espèce. Cet article porte essentiellement sur la spermatogenèse car nous avons démontré dans une étude précédente (Banno et coll., 1995) que les cellules germinales mâles constituaient un meilleur matériel pour l'observation des chromosomes méiotiques que celles des femelles. Pour la souche de ver à soie utilisée ici, la période la plus appropriée pour la préparation des échantillons de testicules se situe entre le 2^e jour du 4^e âge et le 5^e jour du dernier âge des larves mâles.

MATERIELS ET METHODES

La souche utilisée est p22, lignée standard maintenue par accouplement frères-soeurs à l'Université de Kyushu depuis 1924 (Doira et coll., 1992). Les larves de cette souche ont été élevées sur feuilles de mûrier à 25 °C. Les durées du 4^e âge, de la 4^e mue et du 5^e âge sont respectivement

* Auteur auquel doit être adressée la correspondance.

de 3, 1,5 et 6 jours dans ces conditions d'élevage (le filage du cocon débute au 5e jour du dernier stade). Les testicules ont été prélevés à certains stades donnés, précisés ultérieurement, traités essentiellement suivant la méthode d'Imai et coll. (1977). Pour résumer brièvement, les tissus ont été immergés dans une solution de KCl hypotonique (5 %) pendant 30 à 90 minutes dans une boîte de Pétri et transférés sur une lame en verre, sur laquelle ils ont été lavés avec 60 % éthanol/acide acétique (3:1 v/v), écrasés avec une pince et humidifiés avec deux gouttes de 60 % éthanol/acide acétique fixatif (1:1 v/v). La lame a été mise à sécher à température ambiante et, avant la fin du séchage, la deuxième solution a été à nouveau ajoutée. Ce protocole a été répété trois fois, la lame a ensuite été mise à sécher pendant une nuit. Les tissus ont ensuite été colorés avec 3 % de Giemsa dans un tampon phosphate de sodium-potassium 40 mM, pH 6,8, pendant 30 à 60 minutes à température ambiante et rincés à l'eau courante. Pour les chromosomes somatiques, des cellules embryonnaires au stade blastocinèse (le 4e jour après la fécondation pour p22) ont été disséquées sur une lame et traitées selon la méthode de Kawazoe (1987). Tous les spécimens ont été observés au microscope (Zeiss Axioplan, Allemagne) et photographiés à l'aide d'un film Neopan F. Les photographies à un grossissement d'environ 850 en diamètre ont été tirées sur papier photo Mitsubishi F3 et F4.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'arrangement des chromosomes au cours de la spermatogenèse a été relevé et est présenté dans les figures 1 à 3. Les chromosomes somatiques de la souche considérée ont tout d'abord été étudiés dans les cellules embryonnaires et les observations ont permis de confirmer le nombre de $2n = 56$ (Fig. 1, A), qui est le nombre chromosomique normal pour *B. mori*. La numération chromosomique pendant la spermatogenèse a ensuite été effectuée selon la méthode suivante : les dates entre parenthèses indiquent les âges qui ont été confirmés et sont les plus appropriés chez les larves de p22 pour la préparation des testicules et au cours desquels les chromosomes des stades pré-méiotiques et méiotiques sont présents.

Stade pré-méiotique (2e jour du 4e âge) :

Les chromosomes contenus dans le spermatogonium ($2n = 56$) (B) ont une forme de bâtonnet ou de point, ce qui rend la numération facile mais empêche la caractérisation individuelle de chacun des éléments. Cette situation est généralement expliquée par la nature holocinétiq ue des chromosomes chez cet insecte (Murakami et Imai, 1973). Parfois, on observe une structure ressemblant à une constriction secondaire dans la zone proche de l'extrémité distale d'un chromosome (flèches en B) ; structure dont la fréquence est fonction du spécimen étudié.

Interphase et leptotène (3e jour du 4e âge) :

Les chromosomes observés en C sont au stade transitoire de l'interphase qui précède la longue prophase. Nous n'avons pas pu détecter d'arrangement régulier des chromosomes et la suite des analyses a été difficile. A ce stade (3e jour), de nombreuses cellules contiennent des chromosomes leptotènes arrangés en réseau apparemment composé de fines structures ressemblant à des filaments (D).

Zygotène (du 3e jour du 4e âge au 1er jour de la 4e mue) :

En général, la synapse (appariement des chromosomes homologues) commence à partir des deux extrémités chromosomiques au stade zygotène pour former des bivalents que l'on peut appeler tétrades puisque chacun des chromosomes subit une réplication avant le début de la prophase. Dans les spécimens étudiés ici, les chromosomes produisent davantage de structures ressemblant à des fils (E) que précédemment ; il semble que ces structures s'étendent à mesure que la synapse progresse, bien que nous n'ayons pas pu réaliser une analyse approfondie.

Pachytène (du 1er au 3e jour du 5e âge) :

Une fois la synapse terminée sur tous les chromosomes homologues, le stade suivant, au cours duquel se produisent les événements de crossing-over, est dénommé pachytène (Holm et Rasmussen, 1980). A ce stade, le nombre de chromosomes est de 28 (F et Fig. 2, G). A mesure que ce stade

progresses, les filaments raccourcissent et se condensent (comparer Fig. 1, F et Fig. 2, G). Chez certains spécimens (Fig. 2, H), les chromosomes se distinguent partiellement les uns des autres à leurs longueurs relatives. Il n'a pas été possible d'établir cette distinction pour la totalité des chromosomes, bien qu'au stade pachytène les chromosomes individuels de nombreux organismes se caractérisent par leurs longueurs distinctes et à l'arrangement de leurs chromomères.

Diplotène (3e jour du 5e âge) :

Habituellement, les chromosomes au stade diplotène subissent la formation de chiasmas qui résultent probablement des événements de crossing-over. Un grand nombre de spécimens est nécessaire pour reconnaître les chromosomes diplotènes (I et J) en raison de la faible quantité de cellules ayant des chromosomes à ce stade. Ceci indique que le stade diplotène chez les cellules germinales mâles de *B. mori* est vraisemblablement d'une durée très courte.

Diacinèse (3e jour du 5e âge) :

Les tétrades de la fin du diplotène et du stade diacinèse prennent souvent une configuration cruciforme ou circulaire (flèches 1 et 2 respectivement en K et L). On sait que ces tétrades sont dues à la séparation des chromosomes homologues et à l'apparition des chiasmas. La séparation déclenchée au diplotène n'est généralement pas terminée car les chromosomes homologues sont maintenus ensemble par un ou plusieurs chiasmas. Un seul chiasma à l'intérieur d'une tétrade produit une configuration cruciforme des chromosomes. Deux chiasmas situés dans des régions distales donneront naissance à une configuration circulaire ; ces deux configurations typiques ont pu être observées dans les spécimens étudiés ici. Lorsqu'il y a trois chiasmas ou plus, les tétrades prennent l'aspect d'une succession de cercles, comme le montre la flèche 3 en J. Aucune structure de ce type n'avait encore été détectée au stade diacinèse.

Métaphase I (4e jour du 5e âge) :

Les chromosomes au stade métaphase I chez *B. mori* ont plus ou moins la forme d'une cloche, comme ceux des autres lépidoptères (Suomalainen, 1953), et on a pu dénombrer 28 tétrades (Fig. 3, M). Chez les organismes possédant des centromères localisés, chaque chromosome de la métaphase I présente une constriction qui marque la position du centromère ; ce qui permet de classer les chromosomes en fonction du site de constriction. Ceci n'a pas été possible dans cette étude, ni dans les préparations antérieures de *B. mori* (Murakami et Imai, 1974), car aucun chromosome ne présente de constriction distincte.

Anaphase I à télophase I (4e jour du 5e âge) :

Chacune des tétrades commence à se diviser en paire de dyades au début de l'anaphase I (N) et les chromosomes passent en télophase I (O) lorsqu'on observe deux noyaux jumeaux condensés (P). Après ce stade intervient une brève interphase suivie de la métaphase II.

Métaphase II (5e jour du 5e âge, début du filage) :

Bien que les caractéristiques chromosomiques de la métaphase II (Q) soient similaires à celles de la métaphase I, la taille de chacun des chromosomes diminue considérablement par rapport à la métaphase I. Cette différence de taille sert d'indice pour distinguer les stades à intervalles courts (Banno et coll., 1995).

Anaphase II (5e jour du 5e âge) :

La dernière microphotographie (R) montre que les chromatides à l'anaphase II viennent de commencer à migrer vers des pôles opposés. Chaque chromosome prend une configuration triangulaire. Les chromosomes au stade final de la méiose (télophase II) ne sont pas présentés.

Chez la plupart des espèces, le laps de temps qui suit la métaphase II ne prend pas plus de 10 % du temps total nécessaire à la méiose. De même, dans le cas présent, l'anaphase I, la métaphase II et l'anaphase II sont terminées en un temps très court et sont donc rares dans nos préparations.

Ce rapport présente pour la première fois un descriptif chronologique illustré de la méiose chez l'organe de reproduction mâle de *B. mori*. Ceci servira de base pour une étude ultérieure visant à

clarifier certains problèmes encore non résolus concernant les processus méiotiques qui interviennent dans l'ovocyte ainsi que pour l'utilisation future de l'hybridation moléculaire comme outil d'analyse cytogénétique.

STUDY ON THE HAEMOLYMPH LYSOZYME ACTIVITY AND ITS INHERITANCE IN DIFFERENT BREEDS OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L., IN F₁ CROSSES

A. BOZCHKOVA¹, P. TZENOV² & Y. NATCHEVA²

1. Veterinary Research Institute, 1 Ilinden Street, Vratza 3000, Bulgaria.

2. Sericultural Experiment Station, 24 Mito Orozov Street, Vratza 3000, Bulgaria.

*The haemolymph lysozyme activity in 16 silkworm (*Bombyx mori* L.) breeds from different geographical and genetic origins, as well as the inheritance of the lysozyme activity in the F₁ crosses, were studied. The haemolymph lysozyme activity was determined according to the method of Lie et al. (1985), employing agar-plate techniques and the tests were carried out in agarose gel containing the bacterium, *Micrococcus lysodeikticus*. The analyses showed that there were significant differences between the different breeds and hybrids as regards the haemolymph lysozyme activity. Generally, the breeds having larvae without markings and spherical-shaped cocoons (Chinese type) displayed a higher lysozyme activity than those observed in the breeds with larvae having markings and spindle- or oblong-shaped cocoons (Japanese type), but some breeds of the Japanese type manifested a higher lysozyme activity. The F₁ crosses showed a partial dominance or overdominance for HP or LP as regards the lysozyme activity.*

Keywords: Silkworm, *Bombyx mori* L., breed, hybrid, haemolymph, lysozyme activity, inheritance.

INTRODUCTION

To find a possible correlation between enzyme activities and the values of the most important quantitative characters as well as to identify the strains, similar in their phenotype, the haemolymph and midgut activities of different enzymes have been studied in the silkworm, *Bombyx mori* L., by a number of researchers (Asakawa and Hamano, 1989; Chatterjee *et al.*, 1992; Kanekatsu *et al.*, 1993).

Lysozymes are a wide group of enzymes, cleaving β (1-4) and β (1-2) glycoside linkages (Pollock and Sharon, 1970).

Lee and Brey (1995) reported a rapid up-regulation of lysozyme gene transcription which was observed in immuno-competent insect tissues such as fat body, haemocytes and cuticular epidermal tissue, following a bacterial (Gr⁺) injection. Buharin and Vasiliev (1977) also reported that lysozyme manifested high activity mainly against the Gram-positive bacteria. The direct lytic activity against the bacterial cell wall liberated peptidoglycan fragments is involved in eliciting the inducible immune response in insects, e.g., the synthesis and secretion of antibacterial peptides and proteins (Dunn *et al.*, 1985; Morishima *et al.*, 1994). Therefore lysozyme is an important agent of the natural resistance in insects.

However, the lysozyme activity in different breeds and hybrids of *Bombyx mori* L. has not been studied thoroughly (Nagorna *et al.*, 1987). The present study was carried out to determine the haemolymph lysozyme activity in 16 silkworm breeds having different geographical and genetic origins, as well as the inheritance of the haemolymph lysozyme activity in 10 F₁ crosses.

MATERIALS AND METHODS

I. Breeds and hybrids used:

The studies were conducted at the Sericultural Experiment Station (Vratza, Bulgaria) and at the Veterinary Research Institute (Vratza, Bulgaria) by using a group of 16 breeds of tropical, Bulgarian, Japanese and Chinese origin (Table I) as well as 10 hybrids between some of the breeds. Part of the breeds were maintained without any purposive selection (Bonde 517), other breeds were selected as

Table I. Characteristics of the breeds used in the study.

Tableau I. Caractéristiques des souches utilisées dans cette étude.

Breed <i>Souche</i>	Voltinism <i>Voltinisme</i>	Larvae <i>Larves</i>	Cocoons <i>Cocons</i>	Origin <i>Origine</i>
Bonde 517	Multivoltine <i>Polyvoltin</i>	Without marking <i>Sans marquage</i>	Yellow, spindle <i>Jaune, fuselé</i>	South East Asia <i>Asie du sud-est</i>
Kom 1	Uni/bivoltine <i>Mono/bivoltin</i>	With marking <i>Marquage</i>	White, oblong <i>Blanc, allongé</i>	Japan, 1013 of Shunre <i>Japon, 1013 de Shunre</i>
AS	Uni/bivoltine <i>Mono/bivoltin</i>	With marking <i>Marquage</i>	White, spindle <i>Blanc, fuselé</i>	Japan, Asa-hi <i>Japon, Asa-hi</i>
Vratza 35	Uni/bivoltine <i>Mono/bivoltin</i>	With marking <i>Marquage</i>	White, oblong <i>Blanc, allongé</i>	Bulgaria, Hebar 1 × Tashkent <i>Bulgarie, Hebar 1 × Tashkent</i>
Vratza 53	Uni/bivoltine <i>Mono/bivoltin</i>	With marking <i>Marquage</i>	White, oblong <i>Blanc, allongé</i>	Bulgaria, Vr 35 × KS <i>Bulgarie, Vr 35 × KS</i>
Vratza 51	Uni/bivoltine <i>Mono/bivoltin</i>	With marking <i>Marquage</i>	White, oblong <i>Blanc, allongé</i>	Bulgaria, As × Vratza 35 <i>Bulgarie, As × Vratza 35</i>
Super 1	Bivoltine <i>Bivoltin</i>	With marking <i>Marquage</i>	White, spindle <i>Blanc, fuselé</i>	Japan, 1010 of N 124 <i>Japon, 1010 de N 124</i>
KS	Bivoltine <i>Bivoltin</i>	With marking <i>Marquage</i>	White, spindle <i>Blanc, fuselé</i>	Japan, Kinshu <i>Japon, Kinshu</i>
Vratza 52	Uni/bivoltine <i>Mono/bivoltin</i>	Without marking <i>Sans marquage</i>	White, spindle <i>Blanc, fuselé</i>	Bulgaria, ShV × 157 K <i>Bulgarie, ShV × 157 K</i>
ShV	Bivoltine <i>Bivoltin</i>	Without marking <i>Sans marquage</i>	White, spherical <i>Blanc, sphérique</i>	Japan, Showa <i>Japon, Showa</i>
Tv	Uni/bivoltine <i>Mono/bivoltin</i>	Sex-limited for larval traits <i>Suivant le sexe</i>	White, spherical <i>Blanc, sphérique</i>	Japan, Tokai <i>Japon, Tokai</i>
Hessa 2	Bivoltine <i>Bivoltin</i>	Without marking <i>Sans marquage</i>	White, spherical <i>Blanc, sphérique</i>	Japan, 1060 of Hosho <i>Japon, 1060 de Hosho</i>
Vratza 54	Uni/bivoltine <i>Mono/bivoltin</i>	Without marking <i>Sans marquage</i>	White, spherical <i>Blanc, sphérique</i>	Bulgaria, ShV × Vratza 38 <i>Bulgarie, ShV × Vratza 38</i>
Mereffa 2	Uni/bivoltine <i>Mono/bivoltin</i>	Without marking <i>Sans marquage</i>	White, spherical <i>Blanc, sphérique</i>	Bulgaria, Vr 119 × Ukr 11 <i>Bulgarie, Vr 119 × Ukr 11</i>
Kom 2	Uni/bivoltine <i>Uni/bivoltin</i>	Without marking <i>Sans marquage</i>	White, spherical <i>Blanc, sphérique</i>	Japan, 1014 of Shogetsu <i>Japon, 1014 de Shogetsu</i>
Hebar 2	Bivoltine <i>Bivoltin</i>	Without marking <i>Sans marquage</i>	White, spherical <i>Blanc, sphérique</i>	Japan, 1016 of Showa <i>Japon, 1016 de Showa</i>

a pure population by conducting a purposive breed to improve productive characters (Kom 1, AS, Super 1, KS, ShV, TV, Hessa 2, Kom 2, Hebar 2) and the other breeds were originated by using the complex cross method of breeding (Vratza 35, Vratza 53, Vratza 51, Vratza 52, Vratza 54, Mereffa 2). The tested larvae were reared during the spring season, following the standard procedure (Petkov, 1978).

II. Enzyme assay:

Preparation of haemolymph:

Fifty larvae (irrespective of sex) of each breed and hybrid just after the fourth ecdysis were used for the enzyme assay. They were immobilized on ice for a few minutes. Haemolymph was collected through the ventral neck membrane with a micropipette and immediately pooled in sample tubes. Haemolymph samples were collected individually from each larva. Samples prepared by this method were immediately analysed. The haemolymph lysozyme activity was determined as described by Lie *et al.* (1985) and the method was as follows:

Seventeen ml of a 2% agarose gel (0201 H Agarose Koch-Light Laboratory Ltd., England) in 0.07 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ buffer, pH 6.2, containing a photometrically determined amount of 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of *Micrococcus lysodeikticus*, were prepared in plates with $d = 140$ mm.

Two-fold dilutions of hen egg white lysozyme (EWL)* with an original concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ were employed as standards. The standards were dissolved in phosphate buffered saline (PBS). On each plate a total of 32 wells (5 mm diameter) were prepared. The lysozyme sources were applied in 50 μl volumes.

The plates were incubated at 37 °C in a humid chamber for 18 hours (overnight) until transparent lysed zones appeared. The diameters of the cleared zones were determined by employing a so-called Measuring-Viewer**. Within working levels of lysozyme, i.e., 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -0.025 $\mu\text{g}/\text{ml}$, the diameters of the zones were proportional to the $\log$ of the lysozyme activity.

III. Inheritance analyses:

The haemolymph lysozyme activity inheritance in F_1 was determined by using the formula described by Mather (1949).

$$d/a = \frac{F_1 - MP}{\frac{1}{2}(HP - LP)}$$

where,

d/a: dominant additive correlation,

MP: midparent value,

HP: higher parent value,

LP: lower parent value,

F_1 : hybrid value

According to Mather (1949), when d/a is less than 1, there is a partial dominance; when d/a is average of 1, there is a complete dominance; when d/a is higher than 1, there is an overdominance.

In order to check the possible relationship between the haemolymph lysozyme activity and the resistance to adverse rearing conditions, four replicates consisting of 250 larvae each of the tropical race Bonde 517 and a typical Japanese breed, namely Super 1, and a typical Chinese breed, namely Hessa 2, were reared at standard (23 °C) and high (30 °C) temperature during the fourth and fifth instars. The survival ratio of larvae and the moth emergence percentage were determined. The data obtained were analysed statistically (Snedecor, 1961).

* National Institute of Infectious and Parasitic Diseases of the Academy of Medicine, Bulgaria.

** Schaferm Teinpapier, Planen Vogtl., Bestell, WR, 485.

RESULTS AND DISCUSSION

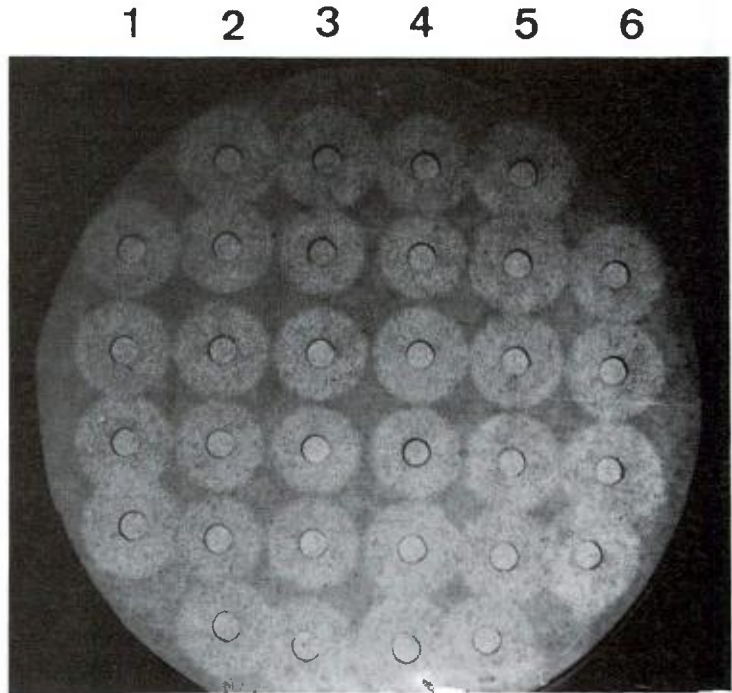
The appearance of the plates with the diameters of the cleared zones is shown in Figure 1. The haemolymph lysozyme activity values and the lysozyme activity inheritance in F₁ are presented in Table II.

Fig. 1: Lysozyme assay in agarose gel containing *Micrococcus lysodeikticus*.

1, 2, 3, 4, 5, 6: samples of haemolymph from 32 silkworms of the breed Vratza 35 (lysed zones).

Fig. 1 : Dosage du lysozyme sur gel d'agarose contenant *Micrococcus lysodeikticus*.

1, 2, 3, 4, 5, 6 : échantillons d'hémolymphes de 32 vers à soie de la souche Vratza 35 (zones lysées).



It is evident from Table II that as regards the haemolymph lysozyme activity there were considerable differences between the different breeds and hybrids. The breed ShV displayed the highest haemolymph lysozyme activity of 2.59 µg/ml, whereas the strain Super 1 manifested the lowest haemolymph lysozyme activity, namely 0.06 µg/ml. The haemolymph lysozyme activity was 0.90 µg/ml in the tropical breed Bonde 517.

In the group of breeds with larvae having markings and spindle- or oblong-shaped white cocoons (Japanese type) the haemolymph lysozyme activity was the highest in the breeds Vratza 35 (0.85 µg/ml) and KS (0.75 µg/ml), and the lowest haemolymph lysozyme activity was observed in the breed Super 1 (0.06 µg/ml). In the group of the breeds having larvae without markings and white spherical-shaped cocoons (Chinese type) the haemolymph lysozyme activity was the highest in the breeds ShV (2.59 µg/ml), Kom (1.03 µg/ml) and Hebar 2 (1.20 µg/ml) and the lysozyme activity was the lowest in Vratza 52 (0.17 µg/ml).

The mean value of the haemolymph lysozyme activity in the breeds with spindle- and oblong-shaped cocoons was 0.47 µg/ml, whereas a higher mean value of lysozyme activity was observed in the breeds having spherical-shaped cocoons (0.76 µg/ml).

Other authors detected some significant differences between different strains of the silkworm, *Bombyx mori* L., with respect to the activity of enzymes like amylase, arginase and sucrase (Hirata and Gamo, 1969; Hara *et al.*, 1984; Asakawa and Hamano, 1989; Chatterjee *et al.*, 1992; Kanekatsu

et al., 1993). The results obtained in this study suggest that the differences observed in the haemolymph lysozyme activity between the different breeds could be successfully used as a reliable marker for differentiation of silkworm breeds, similar to their phenotype.

Table II. Haemolymph lysozyme activity and its inheritance in F₁.

Tableau II. Activité lysozyme de l'hémolymph et transmission héréditaire chez les F₁.

Breeds (hybrids)	Haemolymph lysozyme activity (µg/ml)	d/a
<i>Souches</i> (hybrides)	<i>Activité lysozyme</i> <i>de l'hémolymph</i> (µg/ml)	<i>d/a</i>
Bonde 517	0.90	-
Kom 1	0.23***	-
AS	0.28***	-
Vratza 35	0.85	-
Vratza 53	0.65*	-
Vratza 51	0.51***	-
Super 1	0.06***	-
KS	0.73	-
Vratza 52	0.17***	-
ShV	2.59***	-
TV	0.18***	-
Hessa 2	0.18***	-
Vratza 54	0.38***	-
Mereffa 2	0.32***	-
Kom 2	1.03	-
Hebar 2	1.20**	-
Super 1 × ShV	1.58**	0.20
ShV × Super 1	0.53***	-0.63
Super 1 × Hessa 2	0.32***	3.33
Hessa 2 × Super 1	0.16***	0.67
KS × Hessa 2	0.76	1.07
Hessa 2 × KS	0.68*	0.79
KS × ShV	0.50***	-1.25
ShV × KS	0.60**	-1.14
As × TV	0.56**	6.60
TV × As	0.83	12.00

* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001

All means were compared with the mean of the haemolymph lysozyme activity in Bonde 517.

Toutes les moyennes sont comparées à la moyenne de l'activité lysozyme de l'hémolymph chez Bonde 517.

The data given in Table III showed that the survival ratio of the larvae and moth emergence percentage in the bivoltine breeds Super 1 and Hessa 2, having very low values of the haemolymph lysozyme activity, were highly affected by the high temperature rearing; in the tropical breed Bonde 517 having a higher haemolymph activity, these two characters were nearly equal at standard and high

temperature rearing of the larvae during the last two instars. The death of the Super 1 and Hessa 2 breed larvae and pupae at high temperature rearing was caused by bacterial flacherie, therefore the lysozyme activity could be involved in the resistance to bacterial diseases. However, the problem of the relationship between the haemolymph lysozyme activity and the resistance against diseases needs more investigation.

Table III. Survival ratio of larvae and moth emergence in the breeds Super 1, Hessa 2 and Bonde 517 at standard (23 °C) and high (30 °C) temperature during the fourth and fifth larval instars.

Tableau III. Taux de survie des larves et émergence des papillons chez les souches Super 1, Hessa 2 et Bonde 517 élevées à température standard (23 °C) et élevée (30 °C) au cours du quatrième et du cinquième âge larvaire.

Breed	Survival ratio of larvae (%)		Moth emergence (%)	
	Stantard temp.	High temp.	Stantard temp.	High temp.
<i>Souche</i>	<i>Taux de survie des larves (%)</i>		<i>Emergence des papillons (%)</i>	
	<i>Temp. standard</i>	<i>Temp. élevée</i>	<i>Temp. standard</i>	<i>Temp. élevée</i>
Super 1	87.11	54.70***	77.00	62.03***
Hessa 2	91.92	69.60***	73.17	55.80***
Bonde 517	86.33	84.33	92.00	89.56*

* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001.

Our results clearly bring out that the F₁ crosses showed a partial dominance or an overdominance for HP or LP as regards the haemolymph lysozyme activity values. In most of cases, the lysozyme activity values manifested in the F₁ crosses were similar or higher than those observed in the parental breeds; however, there were some F₁ crosses whose haemolymph lysozyme activity was lower even than the LP values. Sotirov (1990) from his study with pigs reported that partial dominance was present in the F₁ crosses regarding the serum lysozyme activity. Accordingly, a rapid success to increase haemolymph lysozyme activity could be obtained by crossing between breeds with good combining ability or crossing with breeds which displayed a high value of haemolymph lysozyme activity.

In conclusion, our results clearly bring out that there are significant differences between the different breeds and hybrids as regards the haemolymph lysozyme activity. Generally, the breeds having larvae without markings and spherical-shaped cocoons (Chinese type) displayed a higher lysozyme activity than that observed in the larvae having markings and spindle- or oblong-shaped cocoons (Japanese type); however, there were some breeds of the Japanese type having a higher haemolymph lysozyme activity. The F₁ crosses showed a partial dominance or overdominance for HP or LP as regards the haemolymph lysozyme activity.

REFERENCES

- ASAKAWA H., HAMANO K. (1989) Polymorphism of digestive amylase isozyme in the silkworm, *B. mori* L. J. Sericult. Sci. Japan, 58(4), 322-326.
- BUHARIN O.V., VASILIEV N.V. (1977) β -lysine system and its role in the laboratory and research medicine. Tomak, 144-156.
- CHATTERJEE S.N., CHATTERJEE G.K., RAO G.P., ASWATH S.K., PATNAIK A.K., DATTA R.K. (1992) Correlation between yield and biochemical parameters in mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. Theor. Appl. Gen.
- DUNN P.E., WEI D., KANOST M.R., GENG C. (1985) Soluble peptidoglycan fragments stimulate antibacterial protein synthesis by fat body from larvae of *Manduca sexta*. Dev. Comp. Immunol., 9, 559-568.
- HARA W., FUJII M., SAKAGUCHI B. (1984) Activity and polymorphism of digestive juice amylase in various strains of *Bombyx mori* L. J. Sericult. Sci. Japan, 53(6), 496-500.
- HIRATA Y., GAMO T. (1969) Amylase phenotypes of larval digestive juice obtained from commercial silkworm (*Bombyx mori* L.) strains. J. Sericult. Sci. Japan, 38(5), 395-400.
- KANEKATSU R., SATOH M., KODAIRA R., MIYASHITA T. (1993) Midgut sucrase 1 (Suc-1) of the silkworm, *Bombyx mori* L.: genetics and changes in the activities during the pupal-adult development. J. Sericult. Sci. Japan, 62(1), 13-19.
- LEE W.-J., BREY P.T. (1995) Isolation and characterization of the lysozyme-encoding gene from the silkworm, *Bombyx mori*. Gene, 161, 199-203.
- LIE O., SOLBU H., SEYD M. (1985) Markers of Resistance of Infection in Dairy Cattle. Dissert., Oslo.
- MATHER K. (1949) Biometrical Genetics. Methuen & Co., London.
- MORISHIMA I., HORIBA T., YAMANO Y. (1994) Lysozyme activity immunized and non-immunized haemolymph during the development of the silkworm, *Bombyx mori*. Comp. Biochem. Physiol., 108(2-3), 311-314.
- PETKOV M. (1978) Investigations on the utilization of mulberry leaves from some varieties at different silkworm feeding norms and seasons. Degree of eating and assimilation of the mulberry leaf. Animal Science, 25(7), 11-118.
- POLLOCK J.J., SHARON N. (1970) Carbohydr. Res., 13(2), 211-224.
- SNEDECOR D.U. (1961) Statistical methods and their applications to the researches in agriculture and biology. Moscow.
- SOTIROV L.K. (1990) Phenotypic characteristic and inheritance of lysozyme activity in pigs. Ph.D. Thesis, Stara Zagora.

ETUDE SUR L'ACTIVITE LYSOZYME DE L'HEMOLYMPHE ET SA TRANSMISSION HEREDITAIRE DANS DES CROISEMENTS F₁ DE DIFFERENTES SOUCHES DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L.

A. BOZCHKOVA¹, P. TZENOV² & Y. NATCHEVA²

1. Veterinary Research Institute, 1 Ilinden Street, Vratza 3000, Bulgarie.

2. Sericultural Experiment Station, 24 Mito Orozov Street, Vratza 3000, Bulgarie.

*On a étudié l'activité lysozyme de l'hémolymph chez 16 souches de ver à soie (*Bombyx mori* L.) d'origines géographique et génétique différentes, ainsi que sa transmission héréditaire chez des croisements F₁. L'activité lysozyme de l'hémolymph a été déterminée d'après la méthode de Lie et coll. (1985), en utilisant les techniques de plaques agar et les tests ont été réalisés sur un gel d'agarose contenant la bactérie *Micrococcus lysodeikticus*. Les analyses font apparaître des variations significatives entre les différentes lignées et les différents hybrides pour ce qui concerne l'activité lysozyme de l'hémolymph. En règle générale, les souches donnant des larves sans marquage et des cocons sphériques (type chinois) présentent une activité lysozyme plus élevée que les souches donnant des larves avec marquage et des cocons fuselés ou allongés (type japonais) ; cependant, certaines des souches de type japonais manifestent une activité lysozyme élevée. Les croisements F₁ présentent une dominance partielle ou une surdominance par rapport à HP ou LP pour ce qui concerne l'activité lysozyme.*

INTRODUCTION

Afin d'établir une corrélation éventuelle entre les activités enzymatiques et les valeurs des caractères quantitatifs les plus importants et d'identifier les souches de même génotype, les activités de différentes enzymes de l'hémolymph et de l'intestin moyen du ver à soie *Bombyx mori* L. ont été étudiées par un certain nombre de chercheurs (Asakawa et Hamano, 1989 ; Chatterjee et coll., 1992 ; Kanekatsu et coll., 1993).

Les lysozymes représentent un large groupe d'enzymes, clivant les liaisons glycosidiques β (1-4) et β (1-2) (Pollock et Sharon, 1970).

Lee et Brey (1995) ont observé une régulation favorisant rapide de la transcription des gènes de lysozymes dans des tissus d'insectes immuno-compétents comme le corps adipeux, les hémocytes et le tissu de l'épiderme cuticulaire après injection bactérienne (Gr⁺). Buharin et Vasiliev (1977) ont également observé que le lysozyme présente une activité plus importante surtout en présence de bactéries Gram-positives. L'activité lytique directe contre les fragments peptidoglycans libérés de la paroi cellulaire bactérienne joue un rôle dans le déclenchement des immuno-réactions inductibles chez les insectes comme la synthèse et la sécrétion de peptides et de protéines antibactériens (Dunn et coll., 1985 ; Morishima et coll., 1994). Le lysozyme est donc un agent important de la résistance naturelle chez les insectes.

Cependant, l'activité lysozyme chez différentes souches et différents hybrides de *Bombyx mori* L. n'a pas encore été étudiée en détail (Nagorna et coll., 1987). Cette étude a été réalisée afin de déterminer l'activité lysozyme de l'hémolymph chez 16 souches de ver à soie d'origines géographique et génétique différentes ainsi que la transmission héréditaire de l'activité lysozyme chez 10 croisements F₁.

MATERIELS ET METHODES

I. Souches et hybrides utilisés :

Les expériences ont été effectuées à la Station séricicole expérimentale (Vratza, Bulgarie) et à l'Institut de recherches vétérinaires (Vratza, Bulgarie) sur un lot de 16 souches d'origine tropicale, bulgare, japonaise et chinoise (Tableau I) ainsi que 10 hybrides de certaines de ces souches. L'une de ces souches n'a pas été soumise à sélection (Bonde 517), certaines souches ont été soumises à une sélection basée sur l'amélioration des caractères de production (Kom 1, AS, Super 1, KS, ShV, TV, Hessa 2, Kom 2, Hebar 2) et les souches restantes ont été obtenues par la méthode de sélection de croisements complexes (Vratza 35, Vratza 53, Vratza 51, Vratza 52, Vratza 54, Mereffa 2). Les larves testées ont été élevées au printemps suivant le protocole standard (Petkov, 1978).

II. Dosage des enzymes :

Préparation de l'hémolymph :

Cinquante larves (des deux sexes) de chacune des souches et de chacun des hybrides en sortie de 4^e ecdysis ont été utilisées pour le dosage des enzymes. Elles ont été immobilisées dans de la glace pendant quelques minutes. L'hémolymph a été prélevée par la membrane ventrale du cou à l'aide d'une micropipette et déposée immédiatement dans des éprouvettes. Les échantillons d'hémolymph ont été prélevés individuellement sur chaque larve. Les échantillons préparés suivant cette méthode ont été analysés immédiatement. L'activité lysozyme de l'hémolymph a été déterminée selon le protocole de Lie et coll. (1985) décrit ci-dessous :

Dix-sept ml d'un gel d'agarose à 2 % (0201 H Agarose Koch-Light Laboratory Ltd., Angleterre) dans un tampon à 0,07 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 6,2, contenant une quantité déterminée par photométrie de 50 $\mu\text{g/ml}$ de *Micrococcus lysodeikticus* ont été préparés sur des lames de 140 mm de diamètre.

Du lysozyme de blanc d'oeuf de poule (EWL)* dilué 2 fois de 50 $\mu\text{g/ml}$ de concentration originelle a été utilisé comme standard. On a préparé sur chaque plaque un total de 32 puits (5 mm de diamètre). Les sources de lysozymes ont été appliquées en volumes de 50 μl .

Les lames ont été incubées à 37 °C en chambre humide pendant 18 heures (de nuit) jusqu'à apparition de zones lysées transparentes. Les diamètres des zones claires ont été déterminés en employant un "visionneur de mesure"**. Dans la fourchette d'activité du lysozyme, c'est-à-dire 50 $\mu\text{g/ml}$ à 0,025 $\mu\text{g/ml}$, les diamètres des zones sont proportionnels au $\log^2$ de l'activité lysozyme.

III. Analyses de la transmission héréditaire :

La transmission héréditaire de l'activité lysozyme de l'hémolymph chez les F_1 a été déterminée d'après la formule de Mather (1949) :

$$d/a = \frac{F_1 - MP}{1/2 (HP - LP)}$$

où :

d/a : corrélation additive dominante,

MP : valeur du parent médian,

HP : valeur du parent supérieur,

LP : valeur du parent inférieur,

F_1 : valeur de l'hybride

D'après Mather (1949), il y a dominance partielle lorsque la d/a est inférieure à 1, dominance complète lorsque la d/a est égale à 1 et surdominance lorsque la d/a est supérieure à 1.

* Institut national des maladies infectieuses et parasitaires de l'Académie de médecine de Bulgarie.

** Schafem Teinpapier, Planen Vogtl., Bestell, WR, 485.

Afin d'établir une relation éventuelle entre l'activité lysozyme de l'hémolymphe et la résistance aux conditions d'élevage défavorables, quatre lots de 250 larves de la race tropicale Bonde 517, d'une souche japonaise typique, à savoir Super 1, et d'une souche chinoise typique, à savoir Hessa 2, ont été élevés à température standard (23 °C) et élevée (30 °C) au quatrième et au cinquième âge. Le taux de survie des larves et le pourcentage d'émergence des papillons ont été déterminés. Les données obtenues ont été analysées statistiquement (Snedecor, 1961).

RESULTATS ET DISCUSSION

L'apparence des plaques et les diamètres des zones claires sont présentés dans la figure 1. Les valeurs de l'activité lysozyme de l'hémolymphe et la transmission héréditaire de l'activité lysozyme sont données dans le tableau II.

Le tableau II montre clairement que l'activité lysozyme de l'hémolymphe varie considérablement suivant les souches et les hybrides. L'activité lysozyme est maximale (2,59 µg/ml) chez la souche ShV et minimale (0,06 µg/ml) chez la souche Super 1. L'activité lysozyme de l'hémolymphe est de 0,90 µg/ml chez la souche tropicale Bonde 517.

Pour ce qui concerne les souches donnant des larves à marquage et des cocons blancs fuselés ou allongés (type japonais), l'activité lysozyme est maximale chez les souches Vratza 35 (0,85 µg/ml) et KS (0,75 µg/ml) et minimale chez la souche Super 1 (0,06 µg/ml). Pour ce qui concerne les souches donnant des larves sans marquage et des cocons blancs sphériques (type chinois), l'activité lysozyme de l'hémolymphe est maximale chez les souches ShV (2,59 µg/ml), Kom (1,03 µg/ml) et Hebar 2 (1,20 µg/ml) et minimale chez Vratza 52 (0,17 µg/ml).

La valeur moyenne de l'activité lysozyme de l'hémolymphe chez les souches à cocons fuselés ou allongés est de 0,47 µg/ml. Par contre, on observe une valeur moyenne plus élevée (0,76 µg/ml) chez les souches à cocons sphériques.

D'autres auteurs ont détecté des différences significatives entre des souches du ver à soie *Bombyx mori* pour ce qui concerne l'activité de certaines enzymes comme l'amylase, l'arginase et la sucrase (Hirata et Gamo, 1969 ; Hara et coll., 1984 ; Asakawa et Hamano, 1989 ; Chatterjee et coll., 1992 ; Kanekatsu et coll., 1993). Les résultats obtenus ici suggèrent que les différences observées pour ce qui concerne l'activité lysozyme de l'hémolymphe entre les diverses souches pourraient servir de marqueur fiable pour la différenciation des souches de vers à soie de même phénotype.

Les données présentées dans le tableau III montrent que l'élevage à haute température affecte fortement le taux de survie des larves et le pourcentage d'émergence des papillons chez les souches bivoltines Super 1 et Hessa 2, qui ont des valeurs très faibles pour l'activité lysozyme de l'hémolymphe, tandis que, chez la souche tropicale Bonde 517, dont l'activité lysozyme est très forte, ces deux caractères sont pratiquement identiques pour les larves élevées aux deux derniers âges à température standard et élevée. La mort des larves et des chrysalides des souches Super 1 et Hessa 2 à haute température d'élevage est due à une flacherie bactérienne ; il se peut donc que l'activité lysozyme soit impliquée dans la résistance aux maladies bactériennes. Cependant, la question de la relation entre l'activité lysozyme de l'hémolymphe et la résistance aux maladies nécessite des études approfondies.

Nos résultats font clairement ressortir que les croisements F₁ présentent une dominance partielle ou une surdominance par rapport à HP et à LP pour ce qui concerne les valeurs d'activité lysozyme de l'hémolymphe. Dans la plupart des cas, les valeurs de l'activité lysozyme obtenues chez les croisements F₁ sont égales ou supérieures à celles observées chez les souches parentales ; cependant, certains croisements F₁ présentent une activité lysozyme de l'hémolymphe inférieure à celle de LP. Sotirov (1990), dans une étude sur les cocons, a observé une dominance partielle chez les croisements F₁ pour ce qui concerne l'activité lysozyme du sérum. Il serait donc possible d'obtenir une augmentation rapide de l'activité lysozyme de l'hémolymphe en croisant entre elles des souches ayant une bonne capacité combinatoire ou en effectuant des croisements avec des souches présentant une valeur élevée pour l'activité lysozyme de l'hémolymphe.

En conclusion, nos résultats montrent clairement que l'activité lysozyme de l'hémolymphe varie fortement suivant les souches et les hybrides. En général, les souches donnant des larves sans marquage et des cocons sphériques (type chinois) présentent une activité lysozyme plus élevée que

les souches donnant des larves avec marquage et des cocons fuselés ou allongés (type japonais) ; cependant, certaines souches de type japonais ont une activité lysozyme de l'hémolymphé élevée. Les croisements F_1 présentent une dominance partielle ou une surdominance par rapport à HP et à LP pour ce qui concerne l'activité lysozyme de l'hémolymphé.

USE OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO BmNPV FOR EARLY DETECTION OF THE NUCLEAR POLYHEDROSIS DISEASE IN *BOMBYX MORI* L.

M. SHAMIM¹, M. BAIG², R.K. DATTA² & S.K. GUPTA^{1*}

1. Gamete Antigen Laboratory, National Institute of Immunology, JNU Campus, Aruna Asaf Ali Marg, New Delhi - 110 067, India.

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

Three murine monoclonal antibodies (MCAs) were produced against *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) derived from BmN infected cells in vitro. In ELISA all three MCAs reacted with BmNPV. These were devoid of reactivity with *N. bombycis*, *B. thuringiensis*, *S. marcescens* and group-A streptococci. In Western immunoblots, two MCAs (i.e., MA-375 and 376 both IgM isotypes) reacted predominantly with 29 kDa and the third MAC (i.e., MA-377, IgG1) with greater than 97 kDa bands. In addition, all three MCAs also recognized virion particles in the infected BmN cells as well as intestinal membrane of infected *B. mori* larvae at 24-28 hr post infection. In sandwich enzyme immunoassay employing purified rabbit polyclonal antibodies and MA-375, virion protein released by using 50 mM Na₂CO₃ from less than 100 nuclear polyhedra could be detected. Forty-five haemolymph samples collected from the field and tested by sandwich ELISA revealed that the results were comparable to microscopic examination. Out of 45, 9 samples devoid of BmNPV but positive for fungal or bacterial infection were found to be negative by sandwich ELISA, demonstrating its specificity. These antibodies could be useful for detection of nuclear polyhedrosis at an early stage of infection.

Keywords: *Bombyx mori* L., BmNPV, monoclonal antibodies, immunofluorescence, sandwich ELISA.

INTRODUCTION

The infection by *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) is one of the important causes of silkworm morbidity and mortality in the sericulture industry. The pathogen is difficult to detect at an early stage of infection, as discernible morphological symptoms develop at later stages of infection. To overcome the improper and delayed diagnosis of the disease by physical examination, immunological techniques can provide an alternative for early and definitive diagnosis of this viral disease. In this direction several investigators have reported various immunodiagnostic procedures to detect different silkworm viruses (Shimizu, 1982; Mike *et al.*, 1984; Ito *et al.*, 1985; Arakawa and Shimizu, 1985; Shi and Ding, 1989; Nataraju *et al.*, 1994; Shamim *et al.*, 1994).

Monoclonal antibodies (MCAs) have been successfully applied for the identification and classification of NPV isolates as well as immunocytochemical localization of viral polypeptides in infected cells (Naser and Miltenburger, 1983; Quant *et al.*, 1984; Quant-Russel *et al.*, 1987; Pearson *et al.*, 1988). Subsequently, Nagamine *et al.* (1991) developed and characterized MCAs against

* Correspondence to: Dr S.K. Gupta, Head, Gamete Antigen Laboratory, National Institute of Immunology, JNU Campus, Aruna Asaf Ali Marg, New Delhi - 110 067, India. Fax: +91 11 6862125.

occluded virions of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and showed the growth characteristics of the virus and localization of corresponding antigens in infected cells using three sets of MCAs. In the present study, we have reported the development and characterization of murine monoclonal antibodies (MCAs) against BmNPV derived from infected BmN cells. The utility of these antibodies in development of a sensitive sandwich enzyme immuno assay for early detection of BmNPV infection in the silkworm has also been described.

MATERIALS AND METHODS

Propagation and purification of the nuclear polyhedrosis virus from BmN cells:

The BmNPV was propagated in BmN cells as described previously (Nagamine *et al.*, 1991). The BmN cell line, derived from *Bombyx mori*, was maintained at 28 °C in TC-100 medium supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics (amphotericin B 0.5 µg/ml and gentamycine 5 µg/ml). The BmN cells (4×10^7) were seeded in a 250 ml spinner culture flask (Techne, USA) and infected with non-occluded BmNPV at 24 hr after the cell seeding. After 48 hr of incubation at 28 °C the culture medium was collected and centrifuged at 800 rpm for 10 min. The supernatant was layered onto a cushion of 20% (w/w) sucrose in TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 1 mM EDTA), and progeny virions were pelleted by centrifugation at 70,000 rpm for 1 hr at 4 °C. The pellet was suspended in TE buffer and passed through 0.22 µm filter membrane. The virions were dialyzed overnight against TE buffer and pelleted by centrifugation. The protein content of the purified BmNPV was estimated by BCA protein estimation kit (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) as per the manufacturer's instruction. The purified virions were suspended in TE buffer and stored at -70 °C for further use.

Production and purification of polyvalent antibodies against nuclear polyhedra:

The polyclonal antibodies against nuclear polyhedra of BmNPV were generated in New Zealand white rabbits as described earlier (Shamim *et al.*, 1994). Low degree of cross reactivity of antibodies with haemolymph proteins was removed by adsorption of pooled high titered immune sera with CNBr-activated sepharose-4B coupled to normal haemolymph proteins. Antibodies were further purified by 40% ammonium sulfate precipitation followed by purification on DEAE A-50 column, as described previously (Shamim *et al.*, 1994).

Generation of monoclonal antibodies:

Inbred BALB/c mice reared at the Institute Small Animal House facility were immunized subcutaneously with BmNPV (equivalent to 200 µg protein per animal) purified from infected BmN cells and emulsified in Freund's complete adjuvant. After four weeks, animals were boosted subcutaneously with the same dose of antigen in incomplete Freund's adjuvant. Animals having high antibody titer against viral antigen as tested by solid phase ELISA were given booster intravenously on three consecutive days before fusion. Hybrid cell clones were developed by fusing splenocytes obtained from the immunized mice with SP2/O Ag-1.4 mouse myeloma cells as described elsewhere (Gupta *et al.*, 1992). Wells positive for the growth of hybrid cells were screened for anti-BmNPV antibodies by ELISA and hybrid cells from the identified positive wells were cloned by limiting dilution and subcloned to obtain stable cell lines secreting MCAs. For generation of the ascites, hybrid cells (10^6 to 10^7 cells/mouse) were injected intraperitoneally in BALB/c mice primed with 0.5 ml of Pristane. Two to three weeks later, ascites fluid tapped from the peritoneal cavity was made cell-free by centrifugation at 1800 rpm for 15 min. at 4 °C. Immunoglobulins were precipitated using 40% ammonium sulfate, dialyzed against 10 mM phosphate buffer, pH 7.4, and subsequently purified on DEAE A-50 column. The isotypes of antibodies were determined using an isotyping kit (Sigma Chemical Co., USA) as per the manufacturer's instructions.

Enzyme-linked immunosorbent assay:

Murine MCAs were screened for the reactivity with BmNPV derived from infected BmN cells by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Briefly, 96 well polyvinyl microtitration plates (Corning, USA) were coated with 1 µg viral antigen/well in 50 mM carbonate buffer (pH 9.6) by incubating at 37 °C for 2 hr followed by overnight at 4 °C. After coating, the buffer was decanted

gently and free-binding sites were blocked by incubating the plates for 2 hr with PBS containing 1% BSA. Culture supernatants 100 μ l/well obtained by growing hybrid cells (or different concentrations of purified MCAs) were added in duplicate to the plates and incubated for 1 hr at 37 °C, washed with PBS containing 0.05% Tween-20 (PBST). Plates were incubated for 1 hr at 37 °C with 100 μ l/well of (1:4000 dilution) rabbit anti-mouse HRP conjugate (Dakopatts, Denmark). After washing four times with PBST, colour was developed using 100 μ l/well of 0.05% orthophenylenediamine (OPD) in 50 mM citrate buffer, pH 5.0, with 0.06% H₂O₂. The reaction was stopped by adding 50 μ l of 5 N H₂SO₄ and absorbance read at 490 nm.

Characterization of monoclonal antibodies by ELISA:

The specificity of the MCAs was checked by the ELISA as described above, except that the microtitration plates were coated with proteins from two pathogenic bacteria, i.e., *Bacillus thuringiensis* and *Serratia marcescens*, one microsporidian, i.e., *Nosema bombycis*, and group-A streptococci extracted with 50 mM Na₂CO₃ for 10 min. at room temperature.

SDS-PAGE and Western blot:

One hundred microgram of viral antigen was mixed with an equal volume of sample buffer (0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 2% glycerol and 10% 2-mercaptoethanol) and boiled for 5 min. The proteins were separated on a 12.5% gel as per the method of Laemmli (1970) using a mighty small dual slab gel apparatus (Hoefer Scientific, San Francisco, California). Following SDS-PAGE, the protein was transferred to nitrocellulose membrane according to Towbin *et al.* (1979). Transfer was performed at 50 V for 3 hr using a TE-22 mini transfer apparatus (Hoefer). After transfer the nitrocellulose membrane was blocked with 3% BSA in 50 mM PBS for 2 hr at room temperature and washed three times with PBS containing 0.05% Tween-20. Nitrocellulose membrane was probed with different MCAs as described previously (Harini *et al.*, 1993).

Detection of BmNPV by MCAs in infected BmN cells and second instar *Bombyx mori* larvae by indirect immunofluorescence:

The BmNPV was propagated in BmN cell as described above. The infected cells were fixed on polypropylene slides (Sigma Chemical Co., USA) with cold acetone for 10 min. at room temperature. After fixing, cells were washed with PBS and incubated at 37 °C for 1 hr with different MCAs. Negative controls included culture medium obtained by growing myeloma cells and MCA against *Nosema bombycis*. After incubation cells were washed with PBS, incubated with anti-mouse Ig-FITC conjugate (Dakopatts, Denmark) at 1:50 dilution for 1 hr at 37 °C followed by extensive washing with PBS. Cells were mounted in 80% glycerol and examined under a Nikon Optiphot fluorescence microscope.

Bombyx mori second instar larvae were fed with nuclear polyhedra (5×10^5 polyhedra/cm²) infected mulberry leaves and reared in the laboratory at 25 °C. The infected larvae were collected at different time intervals (i.e., 12, 24, 48, and 72 hr) after the infection, and sacrificed. The intestinal membrane of the larvae was stretched and spread on a glass slide. Fixation was done with cold acetone for 10 min. After the fixation, slides were washed with PBS and incubated at 37 °C with appropriate concentration of MCA. The control included non-infected healthy larvae of the same age group. The rest of the procedure followed was as described above.

Sandwich ELISA for detection of nuclear polyhedrosis virus:

A microtitration plate was coated with 1 μ g/well of purified polyvalent antibodies by incubating at 37 °C for 1 hr followed by overnight at 4 °C. The plate was washed three times with PBS and free sites blocked with 1% BSA in PBST for 2 hr at 37 °C. After washing with PBST, the plate was incubated at 37 °C for 1 hr with varying concentrations of nuclear polyhedra treated with 50 mM Na₂CO₃ for 10 min. (pH neutralized to 7.4 with 1 M phosphate buffer). The plate was washed with PBST and 1 μ g/well of purified respective MCA against BmNPV was added followed by incubation with the rabbit anti-mouse HRP conjugate (Dakopatts, Denmark) at 1:4000 dilution. Subsequently the colour was developed as described above and plates read at 490 nm.

Haemolymph for forty-five *B. mori* larvae suspected to be infected with BmNPV were collected from the farmers' houses of Hindupur (Andhra Pradesh), Kolar and Mysore (Karnataka) for evaluation in sandwich ELISA. In addition, samples were examined microscopically and results compared with sandwich ELISA.

RESULTS

Reactivity of monoclonal antibodies against BmNPV:

Three hybrid cell clones secreting MCAs, reacting with BmNPV were stabilized. Two MCAs (MA-375 and MA-376) were of IgM and one (MA-377) of IgG1 isotype (Table I). All these MCAs were purified as described in 'Materials and Methods' and tested for their reactivity pattern in ELISA. The MCAs showed positive reaction with BmNPV derived from infected BmN cells. All three MCAs when tested at a concentration 10 times higher than that showing positive reaction with BmNPV did not react with *N. bombycis*, *S. marcescens*, *B. thuringiensis* and group-A streptococci (Table I).

Table I. Reactivity pattern in ELISA of murine monoclonal antibodies (MCA) against BmNPV.

Tableau I. Profil de réactivité par ELISA des anticorps monoclonaux (MCA) murins contre le BmNPV.

MCA	Isotype	Absorbance at 492 nm with				
		Virion (BmNPV)	<i>N. bombycis</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>S. marcescens</i>	Group-A streptococci
MCA	Isotype	Absorbance à 492 nm avec				
		Virion (BmNPV)	<i>N. bombycis</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>Streptococcus</i> du groupe A
375	IgM	2.72	NS	NS	NS	NS
376	IgM	2.82	NS	NS	NS	NS
377	IgG1	2.20	NS	NS	NS	NS

NS: Absorbance values were less than mean + 3SD of the absorbance obtained with the negative control.

NS : Les valeurs d'absorbance sont inférieures à la moyenne + 3 écarts types de l'absorbance du témoin négatif.

To investigate the determinants recognized by MCAs, BmNPV (obtained from infected BmN cells) proteins were separated by SDS-PAGE under reduced conditions, employing 12.5% polyacrylamide separating gel and protein transferred on nitrocellulose membrane. In Western blot MCAs MA-375 and -376 reacted with the 29 kDa (lanes b and c, respectively) and MA-377 with greater than 97 kDa (lane d) proteins (Fig. 1). Lane a shows the protein pattern as revealed by staining the nitrocellulose with Aurodye (Amersham, England).

Fig. 1: Western blot showing reactivity of monoclonal antibodies with BmNPV protein derived from infected BmN cell culture.

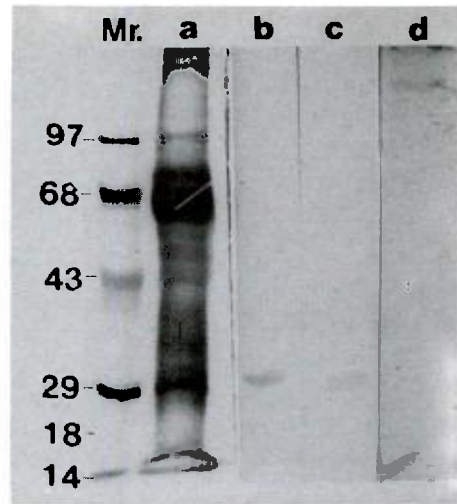
BmNPV was separated by SDS-PAGE under reduced conditions employing 12.5% acrylamid gel.

(a) protein revealed by Auro dye staining; (b) reactivity with monoclonal antibody (MA-375); (c) MA-376 and (d) MA-377.

Fig. 1 : Buvarpage en Western montrant la réactivité des anticorps monoclonaux à la protéine de BmNPV issue d'une culture cellulaire BmN infestée.

Le BmNPV a été séparé par SDS-PAGE en conditions réductrices sur un gel polyacrylamide à 12.5 %.

(a) protéine révélée par coloration Auro dye ; (b) réactivité de l'anticorps monoclonal MA-375 ; (c) MA-376 ; (d) MA-377.



The efficacy of MCAs to react with BmN cells infected with BmNPV was tested by indirect immunofluorescence. All three MCAs showed specific fluorescence with BmNPV-infected BmN cells. A typical fluorescence with MA-377 is shown in Fig. 2a whereas Fig. 2b represents the same field under phase contrast. In addition, *B. mori* second instar larvae were infected with BmNPV and sacrificed at 12, 24, 48 and 72 hr post infection. The indirect immunofluorescence revealed detectable fluorescence in the intestinal membrane at 48 hr post infection with all the three MCAs. A typical fluorescence in the intestinal membrane of the infected larvae with MA-375 is shown in Fig. 2c. No fluorescence was observed in the uninfected (control) larva with any of the MCAs (data not shown).

Sandwich ELISA for detection of virion:

The characteristics of purified polyclonal antibodies against whole nuclear polyhedra have previously been described (Shamim *et al.*, 1994). These recognized different strains of NPV, namely *B. bombycis*, *A. obliqua*, *H. armigera* and *S. litura* but failed to react with haemolymph protein, *S. marcescens*, *N. bombycis*, group-A streptococci, *S. aureus* and *E. coli*. Polyclonal antibodies, however, showed positive reaction with *B. thuringiensis*. The optimum concentration of polyvalent antibodies required for coating the microtitration plate and MCA to reveal bound antigens in sandwich ELISA was determined by checker board analysis. Antibodies at a concentration of 1 µg/well were found to give optimum results (data not shown). Using this assay, an increase in absorbance was observed with the increase in the BmNPV virion protein (Fig. 3). As low as 6 ng/well (60 ng/ml) BmNPV protein gave a significantly higher absorbance as compared to the control. Haemolymph samples from 45 larvae suspected to be infected with BmNPV collected from the field were tested in this assay. Out of 45 samples, 36 showed positive reactivity whereas 9 were found to be negative (Fig. 4). Microscopic examination of the haemolymph samples revealed the presence of BmNPV infection in all 36 samples found to be positive in sandwich ELISA. The nine samples showing negative results in sandwich ELISA had either fungal or bacterial infection, suggesting the specificity of the test.

DISCUSSION

In the present study, the development and characteristics of three hybrid cell clones secreting MCAs directed against BmNPV derived from infected BmN cells have been described. These antibodies were found to be reactive with BmNPV obtained from BmN infected cells. However, these

Fig. 2: Detection of BmNPV by indirect immunofluorescence using monoclonal antibodies in infected BmN cells or intestinal epithelium of *Bombyx mori* larva.

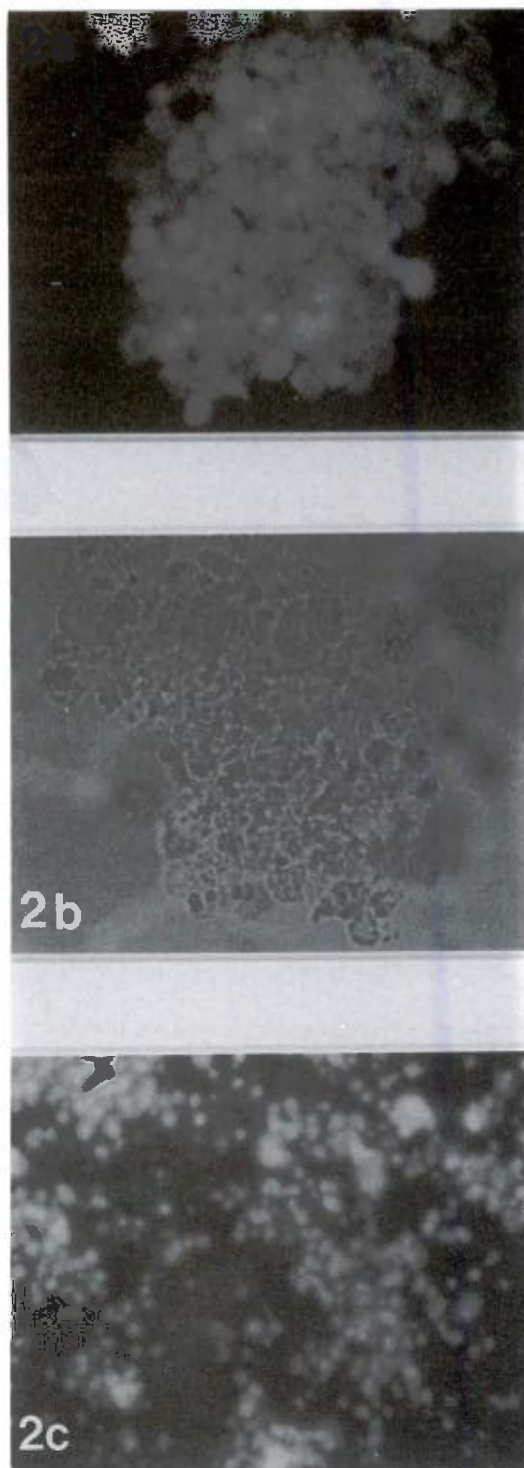
BmN cells were infected with BmNPV as described under 'Materials and Methods'. *B. mori* second instar larvae were fed with mulberry leaves inoculated with 5×10^5 nuclear polyhedra/cm² and were sacrificed at different times.

- a) specific immunofluorescence with MA-377 of BmNPV infected BmN cells (400 ×);
- b) same field under phase contrast (400 ×);
- c) smear preparation of larval intestinal membrane, 48 hr after nuclear polyhedron infection showing specific fluorescence with MA-375 (100 ×).

Fig. 2 : Détection du BmNPV par immunofluorescence indirecte avec des anticorps monoclonaux chez des cellules BmN infectées ou dans l'épithélium de l'intestin larvaire de *Bombyx mori*.

Les cellules BmN ont été infestées avec du BmNPV selon la méthode décrite dans la section "Matériels et Méthodes". Des larves de *B. mori* au deuxième âge ont été nourries avec des feuilles de mûrier inoculées avec 5×10^5 polyèdres nucléaires/cm² et ont été sacrifiées à différentes périodes.

- a) immunofluorescence spécifique avec MA-377 des cellules BmN infestées avec le BmNPV (400 ×);
- b) même champ en contraste de phase (400 ×);
- c) échantillon de la membrane intestinale larvaire 48 h après l'infestation par les polyèdres nucléaires montrant la fluorescence spécifique avec MA-375 (100 ×).



did not cross-react with *N. bombycis*, *B. thuringiensis*, *S. marcescens*, and group-A streptococci. The reactivity of these antibodies with SDS-denatured viral protein derived from BmNPV-infected BmN cells in Western blot showed that MA-375 and -376 predominantly reacted with 29 kDa protein. MA-377 showed reactivity with > 97 kDa protein. From the present study, it is difficult to define the nature or exact locations of 29 and 97 kDa peptides in the budding virus (BV) from BmN-infected cells, or occluded virions derived from nuclear polyhedra. However, suffice it to say that whatever the cell location of these viral antigens, the MCAs reported here will be useful for diagnosis of BmNPV infection as these do not cross-react with other silkworm pathogens. The MCAs described here were able to recognize the nuclear polyhedrosis virus both inside the infected BmN cells and in the midgut

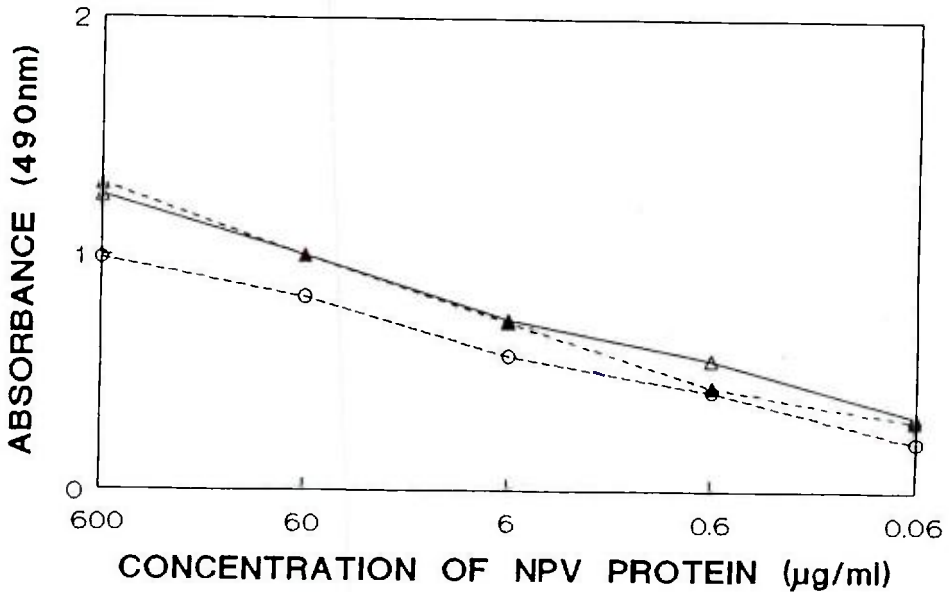


Fig. 3: Sandwich ELISA using a combination of polyclonal and monoclonal antibodies to detect BmNPV.

Plates were coated with 1 µg/well of polyclonal antibody followed by incubation with various concentrations of nuclear polyhedron extract (using 50 mM Na_2CO_3 , neutralized with 1 M phosphate buffer).

The bound antigen was revealed by MA-375 (—△—), 376 (—▲—) and 377 (—○—).

Fig. 3 : ELISA en sandwich réalisé en combinant des anticorps polyclonaux et monoclonaux pour détecter le BmNPV.

Les plaques ont été enduites de 1 µg/puits d'anticorps polyclonaux puis incubées avec des concentrations différentes d'extraits de polyèdres nucléaires (avec 50 mM de Na_2CO_3 neutralisé dans 1 M tampon phosphate).

L'antigène lié est révélé par MA-375 (—△—), 376 (—▲—) et 377 (—○—).

of the infected larvae (Fig. 2). By indirect immunofluorescence the infection can be detected as early as 24 hr post infection in BmN cells and 48 hr in larvae fed on nuclear polyhedra infected mulberry leaves. These facts raise the possibility that these antibodies may serve as useful immunological reagents for the early diagnosis of BmNPV infection at the field level. Recently, Nagamine *et al.*

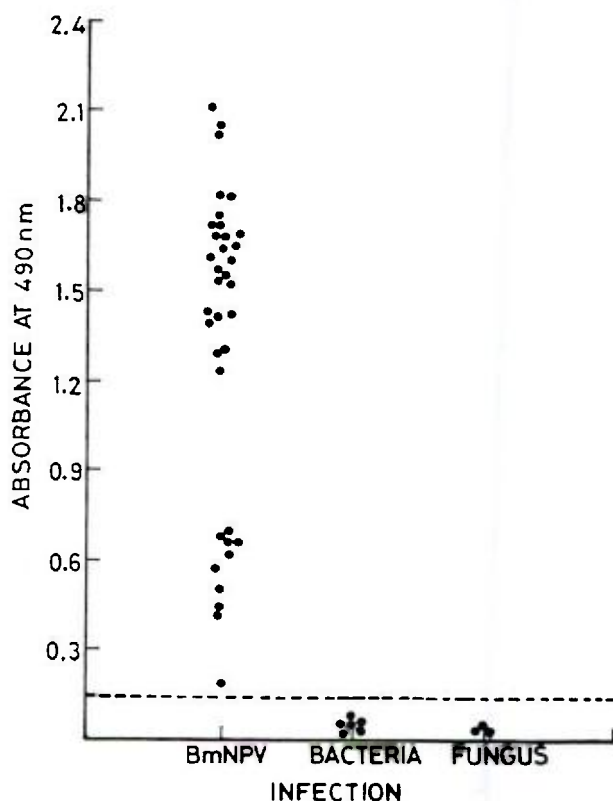
(1991) reported three sets of MCAs generated against occluded virions of BmNPV and their utility as immunological tools to correlate the viral polypeptides with their biological functions. These MCAs were analyzed for their specificity to the viral polypeptides expressed in infected BmN cells. The cell lysates harvested at various times post infection were resolved by SDS-PAGE followed by the immunoblot analysis using all six different MCAs. The results showed that antigens specific to these MCAs were first detectable between 15 and 21 hr after infection and increased with time until 36 hr.

Fig. 4: Evaluation of 45 haemolymph samples of infected BmNPV larvae collected from field by sandwich ELISA based on polyclonal antibodies and MA-375.

Haemolymph samples giving absorbance above 0.15 were considered as positive.

Fig. 4 : Evaluation par ELISA en sandwich d'après les anticorps polyclonaux et le MA-375 de 45 échantillons d'hémolymphe de larves infestées par le BmNPV prélevées sur le terrain.

Les échantillons d'hémolymphe donnant une absorbance supérieure à 0,15 sont considérés positifs.



Using a combination of purified rabbit polyvalent antibody and MCAs against BmNPV, the development of sandwich ELISA has been reported. The assay is sensitive enough to detect 60 ng of viral protein. The result obtained from the field samples collected from Hindupur (Andhra Pradesh), Kolar and Mysore (Karnataka) by this assay showed 100% correlation with the results obtained by microscopic examination. The haemolymph samples obtained from healthy larvae and devoid of BmNPV infection as confirmed by microscopy showed negative results by sandwich ELISA, thereby reconfirming the lack of reactivity of MCA to other proteinic components of haemolymph. The sandwich ELISA will be useful for processing a large number of field samples at the early developmental stages of the second instar, when the total number of virions in infected larvae is limited and control measures or rejection of the rearing lot could be recommended to save the crop loss at a later stage.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the Department of Biotechnology and Central Silk Board, Government of India. The views expressed by the authors do not necessarily reflect the views of the funding agencies. Technical assistance by Messrs. K.C. Pandey, Rajat Ram Gupta and Raghav Ram Yadav, is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- ARAKAWA A., SHIMIZU S. (1985) A dot immunobinding assay for detection of densovirus of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Sericult. Sci. Japan, 54, 500-503.
- BAGAVANT H., YUREWICZ E.C., SACCO A.G., TALWAR G.P., GUPTA S.K. (1993) Delineation of epitopes on porcine zona pallidum relevant for binding of sperm to oocyte using monoclonal antibodies. J. Reprod. Immunol., 23, 265-279.
- GUPTA S.K., BAGAVANT H., KOOTHAN P.T., TALWAR G.P., YUREWICZ E.C., SACCO A.G. (1992) Characteristics of monoclonal antibodies against porcine zona pallidum-3 and their functional relevance. Indian J. Exp. Biol., 30, 1000-1005.
- ITO T., HUKUHARA T., TAKAMI K. (1985) Improved method of detection of polyhedra of cytoplasmic polyhedrosis virus recovered from silkworm faeces. J. Sericult. Sci. Japan, 54, 1-5.
- LAEMMLI V.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage-T4. Nature, 227, 689-685.
- MIKE A., OHWAKI M., FUKUDA T., MIYAJIMA S. (1984) Preparation of monoclonal antibodies to the *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus. J. Sericult. Sci. Japan, 53, 59-63.
- NAGAMINE T., KOBAYASHI M., SAGA S., HOSHINO M. (1991) Preparation and characterization of monoclonal antibodies against occluded virions of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. J. Invertebr. Pathol., 57, 311-324.
- NASER W.L., MILTENBURGER H.G. (1982) A rapid method for the selective identification of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus using monoclonal antibodies. FEMS Microbiol. Lett., 15, 261-264.
- NASER W.L., MILTENBURGER H.G. (1983) Rapid baculovirus detection, identification and serological classification by Western blotting-ELISA using a monoclonal antibody. J. Gen. Virol., 64, 639-647.
- NATARAJU B., SIVAPRASAD V., DATTA R.K., GUPTA S.K., SHAMIM M. (1994) Colloidal textile dye based dipstick immunoassay for the detection of nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) of silkworm. *Bombyx mori* L. J. Invertebr. Pathol., 63, 135-138.
- PEARSON M.N., RUSSEL R.Q., ROHRMANN G.E., BEAUDREAU G.S. (1988) p39, a major baculovirus structural protein: immunocytochemical characterization and genetic location. Virology, 167, 407-413.
- QUANT R.L., PEARSON M.N., ROHRMANN G.E., BEAUDREAU G.S. (1984) Production of polyhedrin monoclonal antibodies for distinguishing two *Oryza pseudotsugata* baculoviruses. Appl. Environ. Microbiol., 48, 732-736.
- QUANT-RUSSEL R.L., PEARSON M.N., ROHRMANN G.E., BEAUDREAU G.S. (1987) Characterization of baculovirus p10 synthesis using monoclonal antibodies. Virology, 160, 9-19.
- SHAMIM M., BAIG M., DATTA R.K., GUPTA S.K. (1994) Development of monoclonal antibody based sandwich ELISA for the detection of nuclear polyhedra of nuclear polyhedrosis virus infection in *Bombyx mori* L. J. Invertebr. Pathol., 63, 151-156.
- SHI L., DING H. (1989) Studies on the detection of densovirus (strain of China) using the biotin-avidin system (BAS) in the silkworm, *Bombyx mori*. Sericologia, 29, 371-377.
- SHIMIZU S. (1982) Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of flacherie virus of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Sericult. Sci. Japan, 51, 370-373.
- TOWBIN H., STAHELIN T., GORDON J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and applications. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 76, 4350-4354.

UTILISATION D'ANTICORPS MONOCLONAUX CONTRE LE BmNPV POUR LA DETECTION PRECOCE DE LA POLYEDROSE NUCLEAIRE CHEZ *BOMBYX MORI* L.

M. SHAMIM¹, M. BAIG², R.K. DATTA² & S.K. GUPTA^{1*}

1. Gamete Antigen Laboratory, National Institute of Immunology, JNU Campus, Aruna Asaf Ali Marg, New Delhi - 110 067, Inde.

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

*On a obtenu trois anticorps monoclonaux de murin (MCA) contre le virus de la polyédrose nucléaire de **Bombyx mori** (BmNPV) dérivé de cellules de BmN infectées in vitro. En ELISA, les trois MCA réagissent au BmNPV. Ils ne présentent aucune réactivité avec *N. bombycis*, *B. thuringiensis*, *S. marcescens* et les streptocoques du groupe A. En immunobuvardage Western, deux MCA (MA-375 et 376, tous deux isotype d'IgM) réagissent principalement avec la bande de 29 kDa et le troisième MCA (MA-377, IgG1) réagit avec les bandes supérieures à 97 kDa. En outre, ces trois MCA reconnaissent également les particules de virions dans les cellules de BmN infestées et dans la membrane intestinale de larves de **Bombyx mori** infestées entre 24 et 48 h après inoculation. Lors d'un dosage immunoenzymatique en sandwich utilisant des anticorps polyclonaux de lapin purifiés et MA-375, on a pu détecter une protéine de virion libérée avec 50 mM Na₂CO₃ à partir de moins de 100 polyèdres nucléaires. L'examen de quarante-cinq échantillons d'hémolymphe prélevés sur le terrain et testés par ELISA en sandwich donne des résultats comparables à ceux obtenus par examen au microscope. Sur 45 échantillons, 9, dépourvus de BmNPV mais positifs pour les infections fongiques ou bactériennes, sont négatifs en ELISA en sandwich ; ce qui démontre leur spécificité. Ces anticorps pourraient être utiles dans la détection de la polyédrose nucléaire à un stade précoce d'infestation.*

INTRODUCTION

L'infestation de *Bombyx mori* par le virus de la polyédrose nucléaire (BmNPV) est l'une des causes de maladie et de mortalité les plus importantes en sériciculture. L'agent pathogène est difficile à détecter à un stade précoce d'infestation. Les problèmes liés à l'examen physique de la maladie, qui ne permet qu'un diagnostic inexact et tardif, peuvent être résolus par l'utilisation des techniques immunologiques car elles offrent la possibilité d'établir un diagnostic précoce et définitif de cette maladie virale. Dans ce but, plusieurs chercheurs ont décrits différents protocoles d'immunodiagnostic pour détecter les virus du ver à soie (Shimizu, 1982 ; Mike et coll., 1984 ; Ito et coll., 1985 ; Arakawa et Shimizu, 1985 ; Shi et Ding, 1989 ; Nataraju et coll., 1994 ; Shamim et coll., 1994).

Les anticorps monoclonaux (MCA) permettent l'identification et la classification des isolats de NPV ainsi que la localisation immunocytochimique des polypeptides viraux dans les cellules infestées (Naser et Miltenburger, 1983 ; Quant et coll., 1984 ; Quant-Russel et coll., 1987 ; Pearson et coll., 1988). Par la suite, Nagamine et coll. (1991) ont développé et caractérisé des MCA contre les virions occlus du virus de la polyédrose nucléaire de *Bombyx mori* et ont mis en évidence les caractéristiques

* Correspondance à adresser à : Dr S.K. Gupta, Head, Gamete Antigen Laboratory, National Institute of Immunology, JNU Campus, Aruna Asaf Ali Marg, New Delhi - 110 067, Inde. Fax : +91 11 6862125.

de croissance du virus et la localisation des antigènes correspondants dans les cellules infestées en utilisant trois lots de MCA. Dans cette étude, nous décrivons le développement et la caractérisation des anticorps monoclonaux de murin (MCA) contre le BmNPV issu de cellules de BmN infestées. L'utilité de ces anticorps dans l'élaboration d'un dosage immunoenzymatique en sandwich visant à établir un diagnostic précoce de l'infestation par le BmNPV chez le ver à soie est également discutée.

MATERIELS ET METHODES

Propagation et purification du virus de la polyédrose nucléaire à partir de cellules de BmN :

Le BmNPV a été propagé dans des cellules de BmN selon la méthode décrite précédemment (Nagamine et coll., 1991). La lignée cellulaire, issue de *Bombyx mori*, a été maintenue à une température de 28 °C dans un milieu TC-100 additionné de 10 % de sérum de veau fœtal et d'antibiotiques (amphotéricine-B : 0,5 µg/ml ; gentamycine : 5 µg/ml). Les cellules de BmN (4×10^7) ont été ensemencées dans un flacon de culture centrifuge (Techne, USA) et infestées avec des BmNPV non occlus 24 h après l'ensemencement des cellules. Après 48 h d'incubation à 28 °C, le milieu de culture a été prélevé et centrifugé à 800 tours/mn pendant 10 mn. Le surnageant a été déposé sur un coussinet de saccharose à 20 % (p/p) dans un tampon TE (10 mM Tris-HCl, pH 7,8, 1 mM EDTA) et les virions de la génération suivante ont été précipités par centrifugation à 70 000 tours/mn pendant 1 h à 4 °C. Le culot a été suspendu dans un tampon TE et passé à travers un filtre de 0,22 µm. Les virions ont été dialysés pendant une nuit contre le tampon TE et précipités par centrifugation. Le contenu en protéines du BmNPV purifié a été estimé à l'aide du kit d'estimation des protéines BCA (Sigma Chemical Co. Saint Louis, Etats-Unis) conformément aux instructions du fabricant. Les virions purifiés ont été suspendus dans le tampon TE et stockés à -70 °C jusqu'à utilisation.

Obtention et purification d'anticorps polyvalents contre les polyèdres nucléaires :

Les anticorps polyclonaux contre les polyèdres nucléaires de BmNPV ont été obtenus sur des lapins blancs de Nouvelle-Zélande selon la méthode décrite précédemment (Shamim et coll., 1994). Le faible degré de réactivité croisée des anticorps avec les protéines d'hémolymphes a été éliminé par adsorption du sérum immunitaire fortement titré sur du sépharose-4b activé par CNBr (bromure de cyanogène) combiné avec des protéines d'hémolymphes normales. Les anticorps ont été à nouveau purifiés par précipitation dans du sulfate d'ammonium à 40 % puis sur une colonne DEAE A-50, selon la méthode décrite précédemment (Shamim et coll., 1994).

Obtention des anticorps monoclonaux :

Des souris BALB/c consanguines élevées à l'*Institute Small Animal House* ont été immunisées par injection sous-cutanée de BmNPV (équivalent à 200 µg de protéines par animal) purifié à partir de cellules de BmN infestées et émulsifié dans de l'adjuvant complet de Freund. Après 4 semaines, les animaux ont été soumis à la même dose sous-cutanée d'antigène dans un adjuvant incomplet de Freund. Les animaux présentant un titre élevé d'anticorps contre l'antigène viral, testé par ELISA en phase solide, ont été soumis à une injection intraveineuse les 3 jours consécutifs avant la fusion. Les clones cellulaires hybrides obtenus ont été développés par fusion des splénocytes obtenus chez les souris immunisées avec des cellules de myélome de souris SP2/O Ag-1,4, selon la méthode décrite par Gupta et coll. (1992). Les puits positifs pour la croissance des cellules hybrides ont été examinés par ELISA afin de déterminer les anticorps anti-BmNPV ; les cellules hybrides des puits positifs identifiés ont été clonées par dilution limitée et sous-clonées afin d'obtenir des lignées cellulaires stables sécrétant des MCA. Pour l'obtention des ascites, les cellules hybrides (10^6 à 10^7 cellules/souris) ont été injectées par voie intrapéritonéale chez les souris BALB/c après addition de 0,5 ml de Pristane. Deux à trois semaines plus tard, le fluide ascitique coulant de la cavité péritonéale a été séparé de ses cellules par centrifugation à 1 800 tours/mn pendant 15 minutes à 4 °C. Les immunoglobulines ont été précipitées avec du sulfate d'ammonium à 40 %, dialysées contre un tampon de phosphate 10 mM, pH 7,4, puis purifiées sur une colonne DEAE A-50. Les isotypes des anticorps ont été déterminés à l'aide d'un kit de caractérisation des isotypes (Sigma Chemical Co., Etats-Unis) suivant les instructions du fabricant.

Dosage immunoenzymatique :

Les MCA de murin ont été soumis à un dosage immunoenzymatique (ELISA) afin de déterminer leur réactivité aux BmNPV dérivés de cellules de BmN infestées. En résumé, des boîtes de microtitration en polyvinyle de 96 puits (Corning, Etats-Unis) ont été enduites avec 1 µg d'antigène viral/puits dans un tampon carbonate 50 mM (pH 9,6) par incubation à 37 °C pendant 2 h puis à 4 °C pendant une nuit. Une fois recouvert, le tampon a été décanté doucement et les sites de liaisons libres ont été inhibés par incubation des boîtes pendant 2 h avec du PBS contenant de la sérumalbumine (BSA) à 1 %. Le surnageant de culture à raison de 100 µl/puits obtenu par culture des cellules hybrides (ou différentes concentrations de MCA purifiés) a été ajouté en deux fois aux boîtes et incubés pendant 1 h à 37 °C, lavé dans du PBS contenant 0,05 % de Tween-20 (PBST). Les boîtes ont été incubées pendant 1 h à 37 °C avec 100 µl/puits de conjugué HRP anti-souris de lapin (1:4000 dilution) (Dakopatts, Danemark). Après 4 lavages dans du PBST, la coloration a été développée avec 100 µl/puits d'orthophénylènediamine (OPD) à 0,05 % dans un tampon citrate 50 mM, pH 5,0, avec 0,6 % H₂O₂. La réaction a été arrêtée par addition de 50 µl de 5 N H₂SO₄ et l'absorbance a été lue à 490 nm.

Caractérisation des anticorps monoclonaux par ELISA :

La spécificité des MCA a été vérifiée par ELISA selon la méthode décrite plus haut modifiée par recouvrement des boîtes de microtitration avec des protéines de deux bactéries pathogènes (*Bacillus thuringiensis* et *Serratia marcescens*), d'un microsporidien (*Nosema bombycis*) et de streptocoques du groupe A extraits avec 50 mM Na₂CO₃ pendant 10 mn à température ambiante.

SDS-PAGE et buvardage Western :

Cent microgrammes d'antigène viral ont été mélangés à un volume égal de tampon échantillon (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 4 % SDS, 2 % glycérol et 10 % 2-mercaptoéthanol) et portés à ébullition pendant 5 mn. Les protéines ont été séparées sur un gel à 12,5 % selon la méthode de Laemmli (1970) en utilisant un appareil de gel en dalle double très petit (Hoefer Scientific, San Francisco, Etats-Unis). Après le SDS-PAGE, la protéine a été transférée sur une membrane de nitrocellulose selon la méthode de Towbin et coll. (1979). Le transfert a été réalisé à 50 V pendant 3 h à l'aide d'un appareil de mini-transfert TE-22 (Hoefer). Après le transfert, la membrane a été traitée avec de la BSA à 3 % dans 50 mM PBS pendant 2 h à température ambiante et lavée trois fois dans du PBS contenant 0,5 % Tween-20. La membrane de nitrocellulose a été testée avec les différents MCA, selon la méthode décrite précédemment (Harini et coll., 1993).

Détection des BmNPV par les MCA dans les cellules de BmN infestées et chez les larves de *Bombyx mori* par immunofluorescence indirecte :

Le BmNPV a été propagé dans les cellules de BmN selon la méthode décrite plus haut. Les cellules infestées ont été fixées sur des lames polyprep (Sigma Chemical Co., Etats-Unis) avec de l'acétone froide pendant 10 mn à température ambiante. Une fois fixées, les cellules ont été lavées dans du PBS et incubées à 37 °C pendant 1 h avec les différents MCA. Les témoins négatifs comprennent le milieu de culture obtenu par culture des cellules myélomes et les MCA contre *Nosema bombycis*. Après incubation, les cellules ont été lavées dans du PBS, incubées avec le conjugué Ig-FITC anti-souris (Dakopatts, Danemark) à une dilution de 1:50 pendant 1 h à 37 °C puis lavées soigneusement dans du PBS. Les cellules ont été montées sur du glycérol à 80 % et examinées au microscope à fluorescence Optiphot Nikon.

Des larves de *B. mori* au deuxième âge ont été nourries avec des feuilles de mûrier infestées avec des polyèdres nucléaires (5×10^5 polyèdres/cm²) et élevées en laboratoire à 25 °C. Les larves infestées ont été prélevées à différents intervalles (12, 24, 48 et 72 h) après l'inoculation et sacrifiées. La membrane intestinale des larves a été étirée et placée sur une lame de verre. La fixation a été réalisée avec de l'acétone froide pendant 10 mn. Après fixation, les lames ont été lavées dans du PBS et incubées à 37 °C avec la concentration voulue de MCA. Le témoin comprend des larves saines, non infestées, du même groupe d'âge. La suite du protocole utilisé est décrite plus haut.

Détection du virus de la polyédrose nucléaire par ELISA sandwich :

La boîte de microtitration a été enduite avec 1 µg/puits d'anticorps polyvalents purifiés par incubation à 37 °C pendant 1 h puis à 4 °C pendant une nuit. La boîte a été lavée deux fois dans du PBS et les sites libres ont été bloqués avec du BSA à 1 % dans du PBST pendant 2 h à 37 °C. Après lavage dans le PBST, la boîte a été incubée à 37 °C pendant 1 h avec différentes concentrations de polyèdres nucléaires traités avec 50 mM Na₂CO₃ pendant 10 mn (pH neutralisé à 7,4 avec 1 M tampon phosphate). La boîte a été lavée dans du PBST et 1 µg/puits de MCA purifié contre le BmNPV a été ajouté avant incubation dans le conjugué HRP anti-souris de lapin (Dakopatts, Danemark) à une dilution de 1:4000. La coloration a ensuite été développée selon la méthode décrite plus haut et l'absorbance des boîtes a été lue à 490 nm.

L'hémolymphe de 45 larves de *B. mori* susceptibles d'être infestées par le BmNPV a été collectée chez des fermiers de Hindupur (Andhra Pradesh), de Kolar et de Mysore (Karnataka) pour l'évaluation par ELISA sandwich. En outre, des échantillons ont été examinés au microscope et les résultats comparés avec ceux obtenus par ELISA en sandwich.

RESULTATS**Réactivité des anticorps monoclonaux au BmNPV :**

On a stabilisé trois clones de cellules hybrides sécrétant des MCA qui réagissent au BmNPV. Deux MCA (MA-375 et MA-376) sont d'isotype IgM et un MCA (MA-377) est d'isotype IgG1 (Tableau I). Ces trois MCA ont été purifiés suivant le protocole décrit dans "Matériels et Méthodes" et leur profil de réactivité a été testé par ELISA. Les MCA présentent une réaction positive au BmNPV dérivé de cellules de BmN infestées. Les trois MCA testés à une concentration 10 fois supérieure à celle donnant une réaction positive au BmNPV ne réagissent pas à *N. bombycis*, à *S. marcescens*, à *B. thuringiensis* et aux streptocoques du groupe A (Tableau I).

Pour étudier les déterminants reconnus par les MCA, des protéines de BmNPV (issues de cellules de BmN infestées) ont été séparées par SDS-PAGE dans des conditions réduites sur gel de séparation polyacrylamide à 12,5 % et les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose. En buvardage de Western, les MCA MA-375 et MA-376 réagissent aux protéines de 29 kDa (puits b et c respectivement) et le MA-377 réagit aux protéines supérieures à 97 kDa (puits d) (Fig. 1). Le puits a montre le profil protéique obtenu par coloration de la nitrocellulose avec de l'Aurodye (Amersham, Angleterre).

L'efficacité de réaction des MCA aux cellules de BmN infestées avec le BmNPV a été testée par immunofluorescence indirecte. Les trois MCA présentent une fluorescence spécifique aux cellules de BmN infestées avec le BmNPV. La fluorescence caractéristique obtenue pour le MA-377 est présentée dans la figure 2a, la figure 2b donne le même champ en contraste de phase. En outre, des larves de *B. mori* du deuxième âge ont été infestées avec du BmNPV et sacrifiées 12, 24, 48 et 72 h après inoculation. L'immunofluorescence indirecte fait apparaître une fluorescence détectable dans la membrane intestinale 48 h après inoculation pour les trois MCA. La fluorescence caractéristique de la membrane intestinale des larves infestées avec le MA-375 est présentée dans la figure 2c. Aucune fluorescence n'est détectée chez les larves non infestées (témoin), quel que soit le MCA testé (données non présentées).

Détection du virion par ELISA en sandwich :

Les caractéristiques des anticorps polyclonaux purifiés contre des polyèdres nucléaires entiers ont été décrites précédemment (Shamim et coll., 1994). Ces anticorps reconnaissent différentes souches de NPV (*B. bombycis*, *A. obliqua*, *H. armigera* et *S. litura*) mais ne réagissent pas aux protéines de l'hémolymphe (*S. marcescens*, *N. bombycis*, les streptocoques du groupe A, *S. aureus* et *E. coli*). Cependant, les anticorps monoclonaux ont une réaction positive à *B. thuringiensis*. La concentration optimale d'anticorps polyvalents nécessaire pour recouvrir les puits de la boîte de microtitration et les MCA afin de mettre en évidence les antigènes liés par ELISA en sandwich a été déterminée par analyse de table de vérification. Les anticorps à une concentration de 1 µg/puits donnent des résultats optimaux (données non présentées). Ce dosage fait apparaître une absorbance

croissante à mesure que les protéines de virions de BmNPV augmentent (Fig. 3). Dès 6 ng/puits (60 ng/ml), les protéines de BmNPV donnent une absorbance significativement supérieure à celle du témoin. Des échantillons d'hémolymphe de 45 larves susceptibles d'être infestées par le BmNPV ont été prélevés sur le terrain et testés selon ce dosage. Sur les 45 échantillons, 36 présentent une réactivité positive et 9 sont négatifs (Fig. 4). L'examen au microscope des échantillons d'hémolymphe révèle la présence du BmNPV dans les 36 échantillons positifs par ELISA en sandwich. Les neuf échantillons donnant un résultat négatif par ELISA en sandwich étaient infestés soit par un champignon, soit par une bactérie ; ce qui suggère que ce test est effectivement spécifique.

DISCUSSION

Cette étude décrit le développement et les caractéristiques des trois clones de cellules hybrides sécrétant des MCA dirigés contre un BmNPV dérivé de cellules de BmN infestées. Les anticorps ont une réactivité au BmNPV issu des cellules de BmN infestées. Cependant, ils n'ont pas de réactivité croisée à *N. bombycis*, *B. thuringiensis*, *S. marcescens* et aux streptocoques du groupe A. La réactivité de ces anticorps aux protéines virales dénaturées par le SDS issues de cellules de BmN infestées par le BmNPV en buvardage Western montre que MA-375 et MA-376 réagissent principalement à la protéine de 29 kDa. MA-377 présente une réactivité aux protéines supérieures à 97 kDa. Sur la base de cette étude, il est difficile de définir la nature ou les localisations exactes des peptides de 29 et 97 kDa dans le virus en bourgeonnement (BV) des cellules de BmN infestées ou dans les virions occlus dérivés des polyèdres nucléaires. Néanmoins, nous nous contenterons de dire que, quelle que soit la localisation des cellules de ces antigènes viraux, les MCA décrits ici seront utiles dans le diagnostic de l'infestation par le BmNPV car ils n'ont pas de réaction croisée avec d'autres agents pathogènes du ver à soie. Les MCA décrits ici sont capables de reconnaître le virus de la polyédrose nucléaire aussi bien à l'intérieur des cellules de BmN infestées que dans l'intestin des larves infestées (Fig. 2). L'infestation peut être détectée par immunofluorescence indirecte seulement 24 h après inoculation dans les cellules de BmN et dès 48 h chez les larves nourries avec des feuilles de mûrier infestées par des polyèdres nucléaires. Ces observations ouvrent la possibilité d'utiliser ces anticorps comme outils immunologiques sur le terrain dans le diagnostic précoce de l'infestation par le BmNPV. Récemment, Nagamine et coll. (1991) ont observés trois lots de MCA obtenus contre le virion occlus du BmNPV et ont démontré leur utilité comme outil biologique pour corréler les polypeptides viraux avec leurs fonctions biologiques. On a analysé la spécificité de ces MCA aux polypeptides viraux exprimés dans les cellules de BmN infestées. Les lysats cellulaires prélevés à différents intervalles après inoculation ont été résolus par SDS-PAGE puis analysés en immunobuvardage des six MCA. Les résultats montrent que les antigènes spécifiques de ces MCA deviennent détectables entre 15 et 21 h après inoculation et qu'ils augmentent jusqu'à 36 h.

On a décrit une technique ELISA en sandwich utilisant une combinaison d'anticorps polyvalents de lapin purifiés et de MCA contre le BmNPV. Ce dosage permet de détecter 60 ng de protéines virales. Le résultat obtenu par ce dosage sur les échantillons collectés à Hindupur (Andhra Pradesh), Kolar et Mysore (Karnataka) présente une corrélation de 100 % avec les résultats obtenus par examen au microscope. Les échantillons d'hémolymphe prélevés chez des larves saines et exemptes d'infestation par le BmNPV, confirmé par examen au microscope, donnent des résultats négatifs par ELISA en sandwich ; ce qui démontre l'absence de réactivité des MCA à d'autres composants protéiques de l'hémolymphe. L'ELISA en sandwich sera utile pour diagnostiquer, sur le terrain, un grand nombre d'échantillons dès le début du 2^e âge lorsque le nombre total de virions chez les larves infestées est encore restreint ; des mesures de lutte ou d'élimination du lot d'élevage pourraient être recommandées pour limiter les pertes de récoltes à un stade ultérieur.

STUDIES ON THE PHENOTYPIC VARIABILITY OF SEVEN CULTIVARS OF *MORUS ALBA* L. AND THREE OF *MORUS MULTICAULIS* P. (MORACEAE) — PART 2

L. CAPPELLOZZA¹, A.T. CORADAZZI², S. CAPPELLOZZA¹, B. BALDAN² & P. MARIANI²

1. Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria, Sezione Specializzata per la Bachicoltura di Padova, Via dei Colli 28, 35143 Padova, Italy.
2. Dipartimento di Biologia, Università di Padova, Via Trieste 75, 35121 Padova, Italy.

The present research aimed to make a careful study of ten mulberry cultivars (cvs) belonging to the varietal collection of the "Specialized Sericultural Section" of Padua. The objective of the work summarized here (part 2) is to identify some anatomical features of the cvs' leaf, which are useful in distinguishing them.

Keywords: *Morus alba*, *Morus multicaulis*, mulberry cultivars (cvs), leaf anatomical structures.

INTRODUCTION

This research is the second part of an articulated study concerning the methods of taxonomic and varietal characterization of different mulberry cvs (Cappelozza *et al.*, 1995). The aim of this paper is to describe the anatomical features of seven cvs of *M. alba* L. and three of *M. multicaulis* P. leaves.

This part deals with the mulberry cvs examined in the previous study; five are indigenous cvs, which have been acclimatized to Italy over a long period: Cattaneo female, Cattaneo male, Florio, Filippine, Morettiana. The other five are of Japanese origin and were imported to Italy in the second part of the 1900's: Ichinose, Kayrionezumigaeshi, Kokuso 20, Kokuso 21 and Kokuso rosso (which was originated by a mutation in the colour of shoot apices).

MATERIALS AND METHODS

The ten mulberry cvs, whose leaves are examined in the following study, are all cultivated in the experimental field of the "Specialized Sericultural Section" of Padua. All field observations were carried out here as well as the collection of plant material needed for this research. The investigations were performed on plants reproduced by agamic multiplication (cuttings) of the same age, cultivated under identical climatic conditions and with the same cultural operations.

Sampling:

The sampling was carried out from the distal third of shoots of the various cvs, in June and September, respectively for the spring and late-summer leaf (which was harvested from shoots cut at the base of the branches in the springtime and grown again during the summer season). Rectangular pieces were removed from the central part of each half-blade, and then fixed.

Light microscopy (LM):

Thin sections (1 µm) were prepared and stained with 1% Toluidine Blue or used for histochemical tests. Polysaccharide identification was performed on sections by using periodic acid Schiff's reagent (PAS) (cellulose) and Ruthenium Red (pectic substances) according to Jensen (1962).

Transmission electron microscope (TEM):

Samples were prefixed overnight in 3% glutaraldehyde in cacodylate buffer pH 6.9 immediately after collection, postfixed in 1% OsO₄ in cacodylate buffer pH 6.9 for 2 hours, dehydrated in ethanol and embedded in Araldite (Mariani *et al.*, 1988). Ultrathin sections (500 Å) obtained with an Ultracut Reichert Microtome were stained with uranyl acetate during dehydration and with lead citrate on grids. Observations were made with a Hitachi 300 EM at 75 kV.

Scanning electron microscope (SEM):

Samples were fixed as described above, dehydrated, critical point dried and coated with gold. A Philips 515 SEM operating at 15 kV was used.

Measurement of the thickness of the leaf blade, and of palisade and spongy tissues:

These parameters were measured under the LM, on stained thin sections. Five measurements were carried out on twelve transverse sections of spring and late-summer leaves, which were harvested from each cv.

Counting of cystoliths per surface unit:

It was performed on the photographs taken both under the LM and the stereo-microscope. Only fixed leaves (1.9 % formaldehyde, 5% glacial acetic acid, 14% ethanol) were photographed.

Statistical analysis:

The analysis of variance and the test of Duncan were carried out on the data obtained from measurements and counting.

RESULTS

Leaf blade thickness:

The value of this parameter was quite constant in all the cvs examined, both in the spring (Table I) and in the late-summer leaf (Table II). No significant differences between Italian and Japanese cvs concerning leaf thickness were observed, while differences of thickness between the spring and the late-summer leaf were remarkable in all the cvs. Two indigenous cvs, Morettiana and Florio, have a thicker blade in comparison with the other cvs, both in the springtime and in the late summer (Tables I and II).

Thickness of palisade and spongy tissues:

It may roughly be affirmed that the spongy tissue always slightly prevailed over the palisade with a few remarkable differences between the spring and the late-summer leaf.

Cystoliths:

Cystoliths are contained in large, individual cells (idioblasts) of the adaxial leaf epidermis (Mauseth, 1988). They are deposits of calcium carbonate, formed around a short ingrowth of the cell wall, which acts as a nucleation site for mineral incrustation (Fig. 1). When the entire leaf is observed under the LM, such cells are seen as transparent, colourless circular areas (not shown). According to Hotta's classification (1954), cystoliths of *M. alba* are of the "broken beak" (Brachycystolithiae) and not of the "narrow beak" type (Dolichocystolithiae).

The idioblasts protrude both from the epidermis and into the mesophyll, where they form depressed areas. In its upper part the idioblast develops a typical mammillary structure, well visible under the SEM (Fig. 2). These structures coincide with the surface prominences observed under the stereomicroscope (Fig. 3). The cystolith's structure was found to be similar in all the cvs examined. The frequency of cystoliths per surface unit was measured. Table III shows that this parameter is not very different in the various cvs; the lowest values were found in the cvs Kayrio, Florio and Filippine.

Table I. Thickness of the leaf blade, of the mesophyll and palisade tissue in the spring leaf of ten mulberry cvs.**Tableau I. Epaisseur de la lame, du mésophylle et du tissu palissadique de la feuille de printemps chez dix cultivars de mûrier.**

Variety	Leaf blade thickness (µm)	Mesophyll thickness (µm)	Palisade thickness (µm)	Percentage palisade/mesophyll
Variété	Epaisseur de la lame (µm)	Epaisseur du mésophylle (µm)	Epaisseur de la palissade (µm)	Pourcentage palissade/mésophylle
Group A: Indigenous / Groupe A : Indigènes				
1) Cattaneo f.	129.6 ^{deCD}	88.5 ^{ef}	37.5 ^{ceE}	42.4 ^{aa}
2) Cattaneo m.	112.6 ^{hH}	75.1 ^{gH}	30.9 ^{gG}	41.3 ^{aa}
3) Filippine	119.0 ^{gG}	79.0 ^{fg}	33.2 ^{ff}	42.1 ^{aa}
4) Florio	146.6 ^{bB}	97.1 ^{bcBC}	40.9 ^{cC}	42.3 ^{aa}
5) Morettiana	153.5 ^{aA}	111.0 ^{bB}	48.7 ^{aA}	43.9 ^{aa}
Group B: Japanese / Groupe B : Japonaises				
6) Ichinose	124.6 ^{ff}	89.3 ^{ceEF}	33.3 ^{ff}	37.7 ^{bb}
7) Kairyonezumigaeshi	127.2 ^{efEF}	92.2 ^{dDE}	38.3 ^{deDE}	41.5 ^{aa}
8) Kokuso 20*	102.2 ^{il}	63.3 ^{hl}	27.4 ^{hH}	43.1 ^{aa}
9) Kokuso 21*	131.7 ^{cdCD}	94.7 ^{cdCD}	39.2 ^{dD}	41.4 ^{aa}
10) Kokuso rosso*	132.7 ^{cC}	98.6 ^{bB}	43.6 ^{bB}	44.3 ^{aa}

Values which have no small letters in common differ significantly for $P = 0.05$. Values which have no capital letters in common differ significantly for $P = 0.01$.

Les chiffres qui n'ont pas de lettres minuscules en commun diffèrent de manière significative pour $P = 0,05$. Les chiffres qui n'ont pas de lettres majuscules en commun diffèrent de manière significative pour $P = 0,01$.

* *M. multicaulis*.

Histological organization of the leaf:

The histological organization of leaves is similar in all the cvs examined, and in both the spring and the late-summer leaves.

The adaxial epidermis usually consists of a single layer of large, irregular ordinary epidermal cells (Fig. 4). Locally the epidermis is 2-layered. Some epidermal cells show both outer and inner periclinal walls thickened and a very reduced cellular lumen (Fig. 4). The wall thickening is strongly positive to Ruthenium Red and weakly positive to PAS (not shown), thus indicating its polysaccharidic (mainly pectic) nature. Based on their morphology, these cells can be considered as mucilage cells, already reported from *Morus* leaves by Metcalfe and Chalk (1950). In the Japanese cvs, the mucilage cells are very numerous, and present also in the abaxial epidermis (Fig. 5).

The abaxial epidermis is formed by small, regular cells. Several stomata can be found, with elongated guard cells, a rosette of subsidiary cells and large substomatal chambers (Fig. 4).

The adaxial epidermis has an outer tangential wall thicker than the abaxial one (Fig. 4). Figures 6 and 7 show the ultrastructural organization of the outer tangential wall of the adaxial (Fig. 6) and abaxial (Fig. 7) epidermises, respectively. The microfibrils appear regularly arranged and closely packed together. A thick cuticle covers both epidermises.

Fig. 1: Transverse section of a spring leaf (cv Kokuso rosso).

Two idioblasts, each containing a cystolith (cy), can be seen in the adaxial epidermis. (mucilage cell = mu) ($\times 420$).

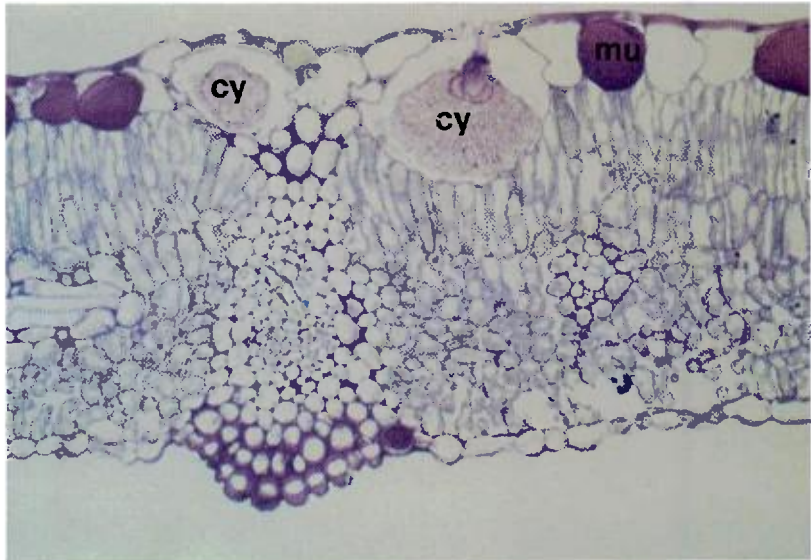


Fig. 1 : Coupe transversale d'une feuille de printemps (cv Kokuso rosso).

On distingue deux idioblastes contenant chacun un cystolithe (cy) dans l'épiderme inférieure. (cellule à mucilage = mu) ($\times 420$).

Fig. 2: Transverse section of a cv Ichinose leaf showing the mamillary structure (arrow) which corresponds to the cystolith-containing idioblast (SEM).

Fig. 2 : Coupe transversale d'une feuille du cv Ichinose présentant la structure mamillaire (flèche) correspondant à l'idioblaste contenant les cystolithes (SEM).

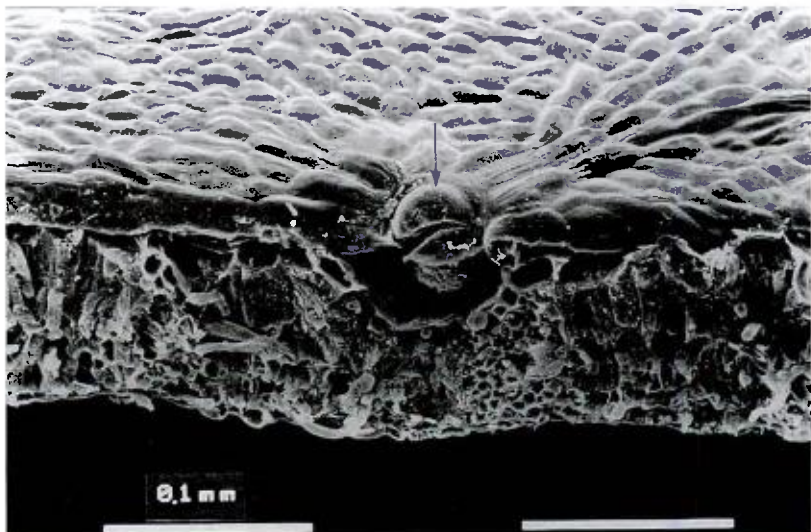


Fig. 3: Upper surface of a leaf (cv Morettiana) seen under the stereomicroscope.

The mamillary structures (arrows) coinciding with the idioblasts are visible.

Fig. 3 : Vue de la surface supérieure d'une feuille (cv Morettiana) à la loupe binoculaire.

On distingue les structures mamillaires (flèches) coincidant avec les idioblastes.

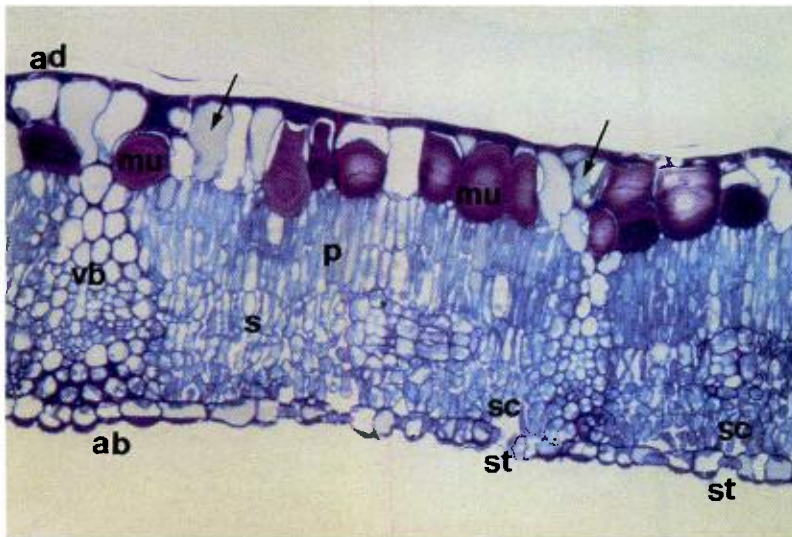


Fig. 4: Transverse section of a cv Florio leaf.

The following structures can be seen:

- adaxial epidermis (ad) with large ordinary epidermal cells. Several cells have thickened tangential walls and a very reduced cellular lumen (mucilage cell = mu). Some cells show a denser vacuolar content (arrows).
- mesophyll with a mono-bistratified palisade (p) and a compact spongy tissue (s).
- vascular bundles (vb), surrounded by a sheath of thin-walled cells.
- abaxial epidermis (ab) with stomata (st) and large substomatal chambers (sc) ($\times 420$).

Fig. 4 : Coupe transversale d'une feuille du cv Florio.

On distingue les structures suivantes :

- épiderme inférieure (ad) avec de grandes cellules épidermiques ordinaires. Plusieurs cellules présentent des parois tangentielles épaissies et une lumière cellulaire très réduite (cellule mucilage = mu). Certaines cellules présentent un contenu vasculaire plus dense (flèches).
- mésophylle avec une palissade mono-bistratifiée et un tissu spongieux compact (s).
- faisceaux vasculaires (vb) entourés par une gaine de cellules à parois minces.
- épiderme supérieure (ab) avec des stomates (st) et de grandes chambres substomatiques (sc) ($\times 420$).

Table II. Thickness of the leaf blade, of the mesophyll and palisade tissue in the late-summer leaf of ten mulberry cvs.**Tableau II. Epaisseur de la lame, du mésophylle et du tissu palissadique de la feuille de fin d'été chez dix cultivars de mûrier.**

Variety	Leaf blade thickness (µm)	Mesophyll thickness (µm)	Palisade thickness (µm)	Percentage palisade/mesophyll
Variété	Epaisseur de la lame (µm)	Epaisseur du mésophylle (µm)	Epaisseur de la palissade (µm)	Pourcentage palissade/mésophylle
Group A: Indigenous / Groupe A : Indigènes				
1) Cattaneo f.	135.3 ^{gG}	94.4 ^{eE}	42.1 ^{fF}	42.4 ^{aA}
2) Cattaneo m.	125.7 ^{hH}	83.2 ^{fF}	34.6 ^{gG}	41.3 ^{aA}
3) Philippine	119.2 ^{iI}	74.8 ^{gG}	34.3 ^{gG}	42.1 ^{aA}
4) Florio	162.4 ^{bb}	103.9 ^{dD}	47.0 ^{cdCD}	42.3 ^{aA}
5) Morettiana	201.9 ^{aA}	103.5 ^{dD}	67.8 ^{aA}	43.9 ^{aA}
Group B: Japanese / Groupe B : Japonaises				
6) Ichinose	150.6 ^{dD}	108.4 ^{cC}	46.2 ^{dD}	37.7 ^{bb}
7) Kairyonezumigaeshi	155.6 ^{cC}	116.9 ^{bB}	47.8 ^{cC}	41.5 ^{aA}
8) Kokuso 20*	144.6 ^{eE}	103.5 ^{dD}	44.3 ^{eE}	43.1 ^{aA}
9) Kokuso 21*	140.7 ^{fF}	102.2 ^{dD}	43.4 ^{eEF}	41.4 ^{aA}
10) Kokuso rosso*	146.3 ^{eE}	109.5 ^{cC}	49.2 ^{bB}	44.3 ^{aA}

Values which have no small letters in common differ significantly for $P = 0.05$. Values which have no capital letters in common differ significantly for $P = 0.01$.

Les chiffres qui n'ont pas de lettres minuscules en commun diffèrent de manière significative pour $P = 0.05$. Les chiffres qui n'ont pas de lettres majuscules en commun diffèrent de manière significative pour $P = 0.01$.

* *M. mulicaulis*.

In the mesophyll, the palisade is mono-bilayered, with elongated cells and few intercellular spaces (Fig. 4). The spongy mesophyll is similarly quite compact. Mesophyll cells are rich in chloroplasts, with scarce thylakoidal membranes and several osmiophilic globules (Fig. 8). Some isolated cells with a single oxalate crystal (druse) are present in the mesophyll (Fig. 8).

The vascular bundles are surrounded by a sheath of roundish cells (Fig. 4) with comparatively thin cellulosic walls, as proved by the PAS test.

Some individual cells of both epidermises and mesophyll have an evidently different and denser vacuolar content (Fig. 9). At the ultrastructural level, the vacuolar content appears finely granular (Fig. 10) and sometimes very dense. The density of this deposit decreases in the cells of the mesophyll central zone. It is likely that these vacuolar substances are phenols, probably tannins. These cells are more numerous in the leaves of the Japanese cvs and in the late-summer leaves of all the cvs.

Morphological features of the leaf surface:

In order to select possible characters helpful to discriminate between the cvs, the leaf surfaces were examined under the SEM. In both epidermises, the ordinary epidermal cells are regular and smooth (Figs. 11 and 12).

Table III. Number of cystoliths per mm² of leaf area (springtime).**Tableau III. Nombre de cystolithes par mm² de surface foliaire (printemps).**

Variety	Number of cystoliths per surface unit (mm ²)
Variété	Nombre de cystolithes par unité de surface (mm ²)
Group A: Indigenous / Groupe A : Indigènes	
1) Cattaneo f.	43.5 ^{aA}
2) Cattaneo m.	43.2 ^{aA}
3) Filippine	32.5 ^{bB}
4) Florio	33.1 ^{bB}
5) Morettiana	40.4 ^{aA}
Group B: Japanese / Groupe B : Japonaises	
6) Ichinose	42.7 ^{aA}
7) Kairyonezumigaeshi	31.9 ^{bB}
8) Kokuso 20*	42.2 ^{aA}
9) Kokuso 21*	41.8 ^{aA}
10) Kokuso rosso*	39.6 ^{aA}

Values which have no small letters in common differ significantly for $P = 0.05$. Values which have no capital letters in common differ significantly for $P = 0.01$.

Les chiffres qui n'ont pas de lettres minuscules en commun diffèrent de manière significative pour $P = 0,05$. Les chiffres qui n'ont pas de lettres majuscules en commun diffèrent de manière significative pour $P = 0,01$.

* *M. multicaulis*.

A distinctive feature of the adaxial surface is the presence of scattered, single, dome-shaped cells (Fig. 11). These cells correspond to the cystolith-containing idioblasts (see also Fig. 2). The abaxial surface is easily distinguishable by the numerous stomata, surrounded by subsidiary cells with evident cuticle striations (Fig. 12). The veins are more protruding on the abaxial surface. Conical hairs, with a large base, occur on both surfaces (Figs. 11-12). Veins of the abaxial surface bear some glandular pluricellular hairs, with a stalk and elongated head (Fig. 12). The above-described structures are common to all the cvs and are approximately unvaried in the late-summer leaves. As a rule, Japanese cvs have epidermal cells with a rougher cuticle in the upper surface of the leaves.

DISCUSSION

In this second part of the study concerning mulberry classification, which was carried out in seven cvs of *M. alba* and three of *M. multicaulis*, it was possible to demonstrate that, while the mulberry leaf is very variable in its morphology, on the contrary in its anatomical features it is very homogenous. This result comes out from a comparison between indigenous and Japanese varieties, and from an individual comparison among the different cvs, not taking account of their geographical origin.

There are no doubts about the differences concerning some parameters, such as the thickness of the leaf blade, the ratio between palisade tissue and mesophyll and the frequency of cystoliths per

Fig. 5: Transverse section of a spring leaf (cv Kokuso rosso).

Mucilage cells (mu), very numerous in the adaxial epidermis, are also present in the abaxial one ($\times 420$).

Fig. 5 : Coupe transversale d'une feuille de printemps (cv Kokuso rosso).

Les cellules à mucilage (mu), très nombreuses dans l'épiderme inférieur, sont également présentes dans l'épiderme supérieur ($\times 420$).

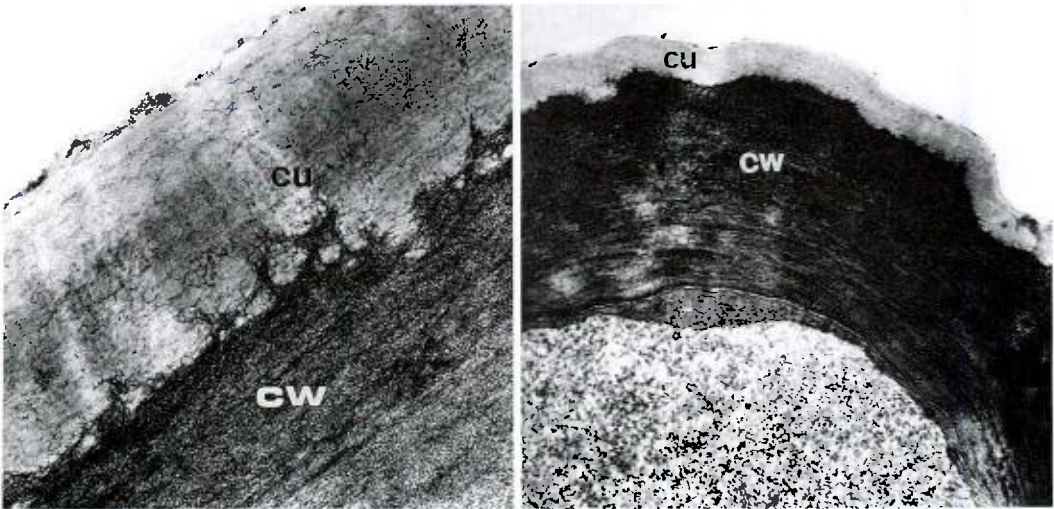
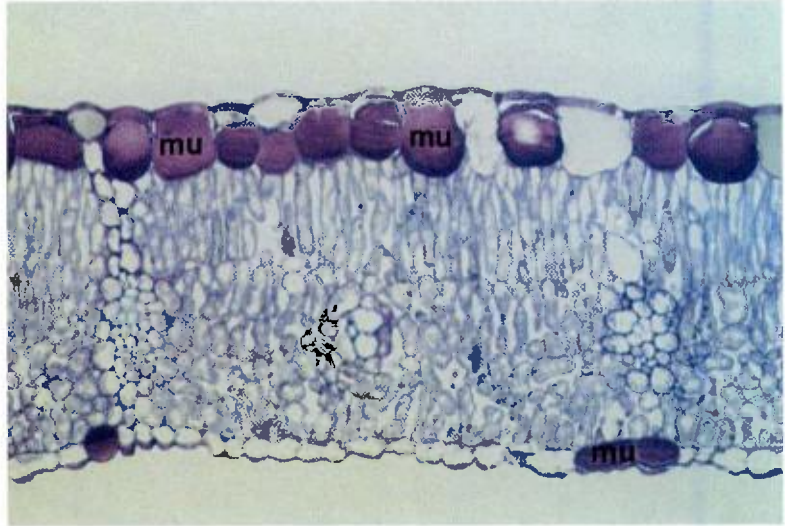


Fig. 6 and 7: Ultrastructural organization of the outer tangential wall (cw) in the adaxial (Fig. 6) and abaxial (Fig. 7) epidermis.

Note the compact arrangement of the microfibrils and the thick cuticle (cu).

Fig. 6 et 7 : Organisation de l'ultrastructure de la paroi tangentielle externe (cw) dans les épidermes inférieur (Fig. 6) et supérieur (Fig. 7).

Noter l'arrangement compact des microfibrilles et la cuticule épaisse (cu). (TEM, Fig. 6, $\times 32000$; Fig. 7, $\times 19500$).

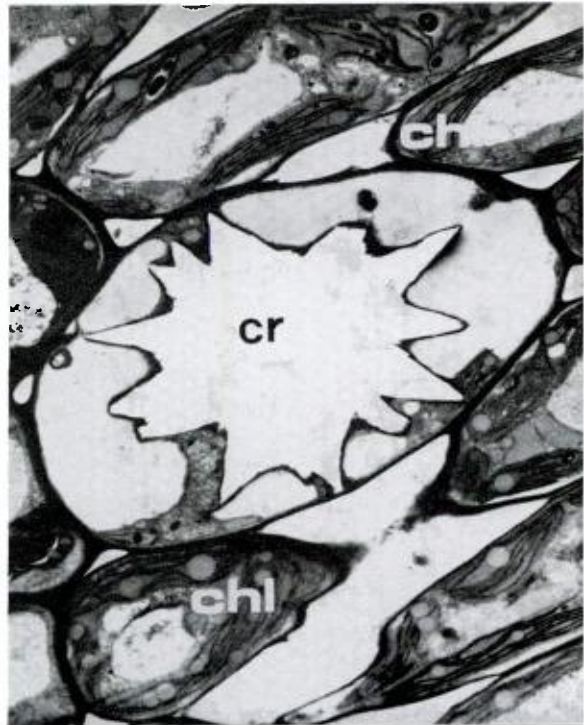


Fig. 8 : Micrograph showing a mesophyll cell containing a Ca oxalate crystal (cr).

In the surrounding cells the chloroplast (chl) organization, with scarce thylakoids and several osmiophilic globules, is visible (cv Florio) (TEM, $\times 4800$).

Fig. 8 : Microphotographie montrant une cellule du mésophylle contenant un cristal oxalate Ca (cr).

Dans les cellules environnantes, on peut voir l'organisation des chloroplastes avec de rares thylakoïdes et plusieurs globules osmiophiles (cv Florio) (TEM, $\times 4800$).

Fig. 9: Transverse section of a cv Kokuso 21 leaf.

Some cells of the adaxial epidermis have a denser vacuolar content (arrows). (mu = mucilage cells) (st = stoma) ($\times 590$).

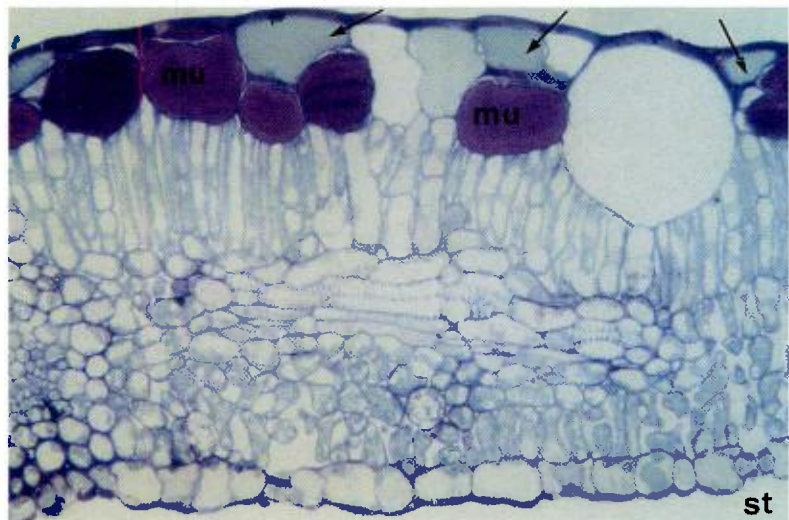


Fig. 9 : Coupe transversale d'une feuille du cv Kokuso 21.

Certaines cellules de l'épiderme inférieure présentent un contenu vacuolaire plus dense (flèche). (mu = cellules à mucilage) (st = stomate) ($\times 590$).

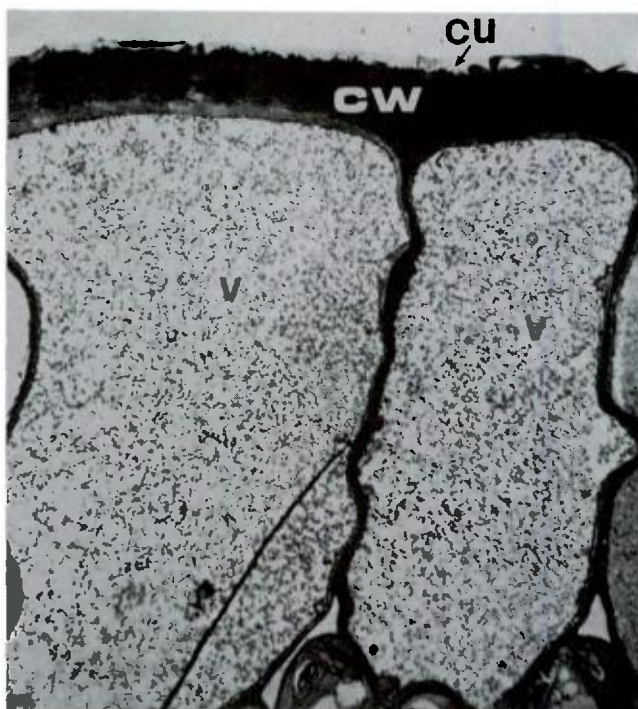


Fig. 10: The huge vacuoles (v) of the two epidermal cells are filled with a granular deposit.

(TEM, $\times 4200$) (cw = cell wall; cu = cuticle).

Fig. 10 : Les vacuoles (v) immenses des cellules des deux épidermes sont remplies d'un dépôt granuleux.

(TEM, $\times 4200$) (cw = paroi cellulaire, cu = cuticule).

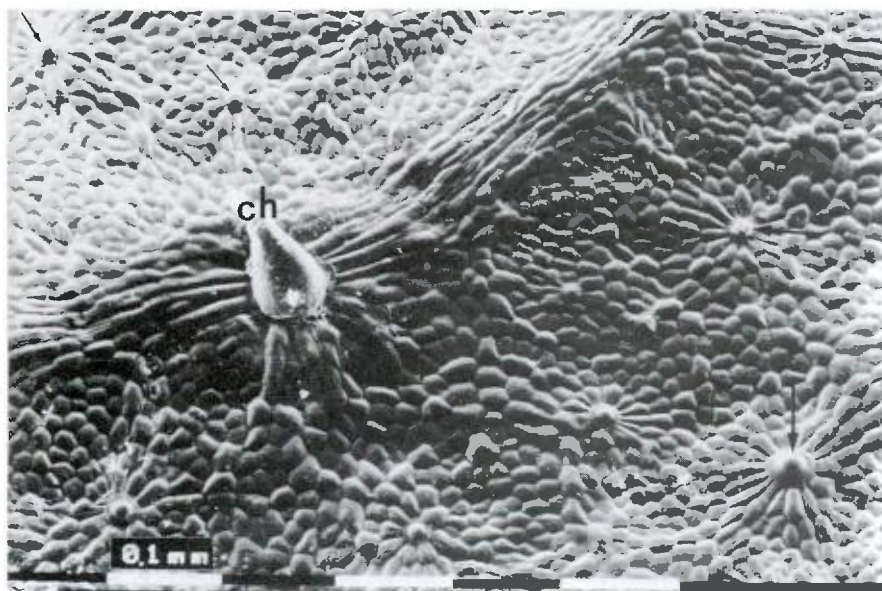


Fig. 11: Adaxial leaf surface, with smooth and regular epidermal cells, and scattered single, dome-shaped protruding cells (arrows).

On the vein a large unicellular conic hair (ch) is visible (cv Florio, SEM).

Fig. 11 : Surface inférieure la feuille avec des cellules épidermiques lisses et régulières et des cellules dispersées uniques saillantes et en forme de dôme (flèches).

Sur la nervure, on distingue un grand poil unicellulaire conique (ch) (cv Florio, SEM).

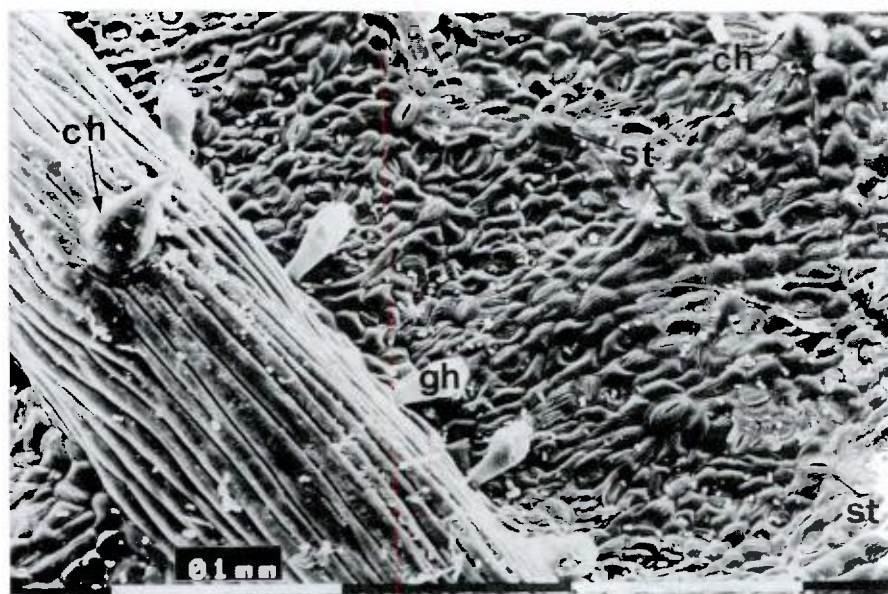


Fig. 12: Abaxial leaf surface.

Several stomata (st) are present. Two single, conic unicellular hairs (ch) are also shown. On the vein, some pluricellular glandular hairs (gh) are present (cv Florio, SEM).

Fig. 12 : Surface supérieure de la feuille.

Plusieurs stomates (st) sont présents. On peut voir deux poils unicellulaires coniques uniques. Sur la nervure, on observe des poils glandulaires pluricellulaires (gh) (cv Florio, SEM).

surface unit. It should be outlined that, while these differences may be remarkable in utilising them for mulberry classification, they should not be considered important for silkworm feeding. With regard to this, the number of cystoliths per leaf surface unit, typical of each cv, for example, affects the palatability of the mulberry leaf less than the age of the leaf does, because cystolitic concretions become bigger when the leaf over-ripens.

Some leaf characters, such as cuticle thickness and the number of stomata per leaf surface unit, were omitted on purpose, because they are more directly involved in the behaviour of the various cvs when they are affected by environmental stresses. In fact, it is believed that this topic needs an individual study, because it is of great importance with regard to mulberry adaptability to the environment and tolerance of parasite fungi.

REFERENCES

- CAPPELLOZZA L., CORADAZZI A.T., TORNADORE N. (1995) Studies on the phenotypic variability of seven cultivars of *M. alba* L. and three of *M. multicaulis* P. (Moraceae). Part 1. *Sericologia*, 35(2), 257-270.
- HOTTA T. (1954) Taxonomical studies on cultivated mulberry in Japan. Botanical Institute, Faculty of Textile Fibres, Kyoto, Japan, 125.
- JENSEN W.A. (1962) *Botanical Histochemistry*. H.W. Freeman ed., San Francisco, 408 pp.
- MARIANI P., RASCIO N., BALDAN B., PAIERO P., URSO T. (1988) Epidermal mucilage cells in leaves of *Salix* species. *Flora*, 181, 137-145.

- MAUSETH J.D. (1988) Plant Anatomy. The Benjamin/Cummings Publ. Co. inc., Menlo Park, California, 560 pp.
- METCALFE C.R., CHALK L. (1950) Anatomy of Dicotyledons. Clarendon Press, Oxford, 2, 1500 pp.

ETUDES SUR LA VARIABILITE PHENOTYPIQUE DE SEPT CULTIVARS DE *MORUS ALBA* L. ET TROIS DE *MORUS MULTICAULIS* P. (MORACEAE) – 2ème PARTIE

L.CAPPELLOZZA¹, A.T. CORADAZZI², S. CAPPELLOZZA¹, B. BALDAN² & P. MARIANI²

1. Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria, Sezione Specializzata per la Bachicoltura di Padova, Via dei Colli 28, 35143 Padova, Italie.

2. Dipartimento di Biologia, Università di Padova, Via Trieste 75, 35121 Padova, Italie.

Ce travail a pour objet l'étude approfondie de dix cultivars (cv) de mûrier issus de la collection variétale de la "Section séricicole spécialisée" de Padoue. L'objectif des travaux résumés ici (2ème partie) est d'identifier certaines caractéristiques anatomiques de la feuille chez ces cv, afin de faciliter leur distinction.

INTRODUCTION

Les travaux présentés ici constituent la deuxième partie d'une étude d'ensemble sur les méthodes de caractérisations taxonomiques et variétales de différents cv de mûrier (Cappellozza et coll., 1995). Le but de cet article est de décrire les caractéristiques anatomiques des feuilles de sept cv de *Morus alba* L. et de trois cv de *M. multicaulis* P.

Cette deuxième partie concerne les cv de mûrier examinés dans l'étude précédente ; cinq variétés sont des cv indigènes, acclimatées depuis longtemps à l'Italie : Cattaneo femelle, Cattaneo mâle, Florio, Filippine et Morettiana. Les cinq autres variétés sont d'origine japonaise et ont été importées en Italie dans la deuxième partie du XX^e siècle : Ichinose, Kayrnonezumigaeshi, Kokuso 20, Kokuso 21 et Kokuso rosso (ce dernier est issu d'une mutation de la couleur de l'extrémité de la tige).

MATERIELS ET METHODES

Les dix cv de mûrier dont les feuilles sont décrites dans cette étude proviennent tous de la plantation expérimentale de la "Section séricicole spécialisée" de Padoue où ont été effectuées les observations sur le terrain ainsi que le prélèvement des échantillons végétaux nécessaires à cette étude. Les recherches ont été réalisées sur des plants propagés par multiplication agamique (bouturage) du même âge et cultivés dans des conditions climatiques et culturales identiques.

Echantillonnage :

L'échantillonnage a été effectué à partir du tiers distal des pousses des divers cv en juin pour les feuilles de printemps et en septembre pour les feuilles de fin d'été (feuilles récoltées sur des pousses taillées à la base des branches au printemps et ayant repoussé au cours de l'été). Des coupes rectangulaires ont été prélevées dans la partie centrale de chaque demi-lame et ont été fixées.

Examen au microscope optique (LM) :

Des coupes fines (1 µm) ont été préparées et colorées avec 1 % de bleu de Toluidine ou utilisées pour les tests histochimiques. L'identification des polysaccharides a été réalisée sur des coupes à l'aide

du réactif de Schiff (PAS) (cellulose) et du rouge de ruthénium (substances pectiques) d'après Jensen (1962).

Examen au microscope électronique à transmission (TEM) :

Des échantillons ont été préfixés pendant une nuit dans du glutaraldéhyde à 3 % dans un tampon cacodylate, pH 6,9, tout de suite après le prélèvement, postfixés dans 1 % OsO₄ dans un tampon cacodylate, pH 6,9, pendant 2 heures, déshydratés dans de l'éthanol et inclus dans de l'Araldite (Mariani et coll., 1988). Des coupes ultrafines (500 Å) obtenues à l'aide d'un Microtome Ultracut Reichert ont été colorées avec de l'acétate d'uranyl pendant la déshydratation et du citrate de plomb sur grille. Les observations ont été réalisées avec un microscope Hitachi 300 EM à 75 kV.

Examen au microscope électronique à balayage (SEM) :

Des échantillons ont été fixés selon le protocole décrit ci-dessus, déshydratés, séchés au point critique et enduits d'or. On a utilisé un SEM Philips 515 fonctionnant à 15 kV.

Mesure de l'épaisseur de la lame foliaire et des tissus palissadiques et spongieux :

Ces paramètres ont été mesurés au microscope optique sur des coupes fines colorées. Cinq mesures ont été réalisées sur douze coupes transversales de feuilles de printemps et de fin d'été récoltées sur chacun des cv.

Numération des cystolithes par unité de surface :

Cet examen a été réalisé sur des photographies prises au microscope optique et au microscope binoculaire. Seules les feuilles fixées (1,9 % formaldéhyde, 5 % acide acétique glacial, 14 % éthanol) ont été photographiées.

RESULTATS

Epaisseur de la lame foliaire :

La valeur de ce paramètre est tout à fait constante chez tous les cv examinés, tant pour la feuille de printemps (Tableau I) que pour la feuille de fin d'été (Tableau II). Aucune différence significative entre les cv italiens et japonais n'a été observée pour ce qui concerne l'épaisseur de la feuille ; par contre, l'épaisseur présente des différences importantes entre la feuille de printemps et la feuille de fin d'été chez tous les cv. Deux cv indigènes (Morettiana et Florio) ont une lame plus épaisse que les autres cv aussi bien au printemps qu'à la fin de l'été (Tableaux I et II).

Epaisseur des tissus palissadique et spongieux :

De manière générale, le tissu spongieux est toujours légèrement supérieur au tissu palissadique, avec quelques différences notables entre la feuille de printemps et la feuille de fin d'automne.

Cystolithes :

Les cystolithes se trouvent dans de grandes cellules individuelles (idioblastes) de l'épiderme inférieur de la feuille (Mauseth, 1988). Il s'agit de dépôts de carbonate de calcium formés autour d'un plissement interne de la paroi cellulaire qui sert de site de nucléation pour l'incrustation des minéraux (Fig. 1). Lorsque l'on observe une feuille entière au microscope optique, ces cellules apparaissent sous forme de zones transparentes, incolores et circulaires (résultats non présentés). D'après la classification de Hotta (1954), les cystolithes de *Morus alba* sont du type "bec cassé" (Brachycystolithiae) et non du type "bec étroit" (Dolichocystolithiae).

Les idioblastes font saillie hors de l'épiderme et dans le mésophylle où ils forment des zones de dépression. Dans sa partie supérieure, l'idioblaste développe une structure mamillaire typique, bien visible au microscope électronique à balayage (Fig. 2). Ces structures coïncident avec les protubérances superficielles observées à la loupe binoculaire (Fig. 3). La structure des cystolithes est identique chez tous les cv examinés. On a mesuré la fréquence des cystolithes par unité de surface. Le tableau III montre que ce paramètre ne diffère pas fortement entre les différents cv : les valeurs sont minimales chez les cv Kayrio, Florio et Filippine.

Organisation histologique de la feuille :

L'organisation histologique des feuilles est identique chez tous les cv examinés, aussi bien pour la feuille de printemps que la feuille de fin d'été.

L'épiderme inférieur est habituellement composé d'une seule couche de cellules épidermiques ordinaires et irrégulières de grande taille (Fig. 4). Localement, l'épiderme est composé de deux couches. Certaines cellules épidermiques présentent des parois péricleinales externes et internes et une lumière cellulaire très réduite (Fig. 4). L'épaississement de la paroi est fortement positif au rouge de ruthénium et faiblement positif au PAS (résultats non présentés), ce qui indique qu'il est de nature polysaccharidique (principalement pectique). Etant donné leur morphologie, on peut considérer que ces cellules sont des cellules à mucilage, comme l'ont observé Metcalfe et Chalk (1950) chez les feuilles de *Morus*. Chez les cv japonais, les cellules mucilagineuses sont nombreuses et sont également présentes dans l'épiderme supérieur (Fig. 5).

L'épiderme supérieur est composé de cellules régulières et de petite taille. On observe plusieurs stomates possédant des cellules de bordure, des cellules subsidiaires en rosace et des chambres substomatiques de grande taille (Fig. 4).

La paroi tangentielle de l'épiderme inférieur est plus épaisse que celle de l'épiderme supérieur (Fig. 4). Les figures 6 et 7 montrent l'organisation ultrastructurale de la paroi tangentielle externe de l'épiderme inférieur (Fig. 6) et de l'épiderme supérieur (Fig. 7). Les microfibrilles sont disposées régulièrement et étroitement entassées. Une cuticule épaisse recouvre les deux épidermes.

Dans le mésophylle, la palissade est mono-bistratifiée, avec des cellules allongées et peu d'espace entre les cellules (Fig. 4). Le mésophylle spongieux est également assez compact. Les cellules mésophylliennes sont riches en chloroplastes, avec de rares membranes thylakoïdes et plusieurs globules osmiophiles (Fig. 8). Quelques cellules isolées possédant un seul cristal d'oxalate (druse) sont présentes dans le mésophylle (Fig. 8).

Les faisceaux vasculaires sont entourés d'une gaine de cellules arrondies (Fig. 4) ayant des parois cellulodiques comparativement fines, comme le montre le test au PAS.

Certaines cellules individuelles des deux épidermes et du mésophylle présentent un contenu vacuolaire distinctement différent et plus dense (Fig. 9). Au niveau ultrastructural, le contenu vacuolaire apparaît sous un aspect finement granulé (Fig. 10) et parfois très dense. La densité de ce dépôt diminue dans les cellules de la zone centrale du mésophylle. Ces substances vacuolaires sont vraisemblablement des phénols, probablement des tannins. Ces cellules sont plus nombreuses dans les feuilles des cv japonais et dans les feuilles de fin d'été de tous les cv.

Caractéristiques morphologiques :

Afin de sélectionner les caractères susceptibles d'aider à la distinction des cv, les surfaces foliaires ont été examinées au microscope électronique à balayage. Dans les deux épidermes, les cellules épidermiques ordinaires sont régulières et lisses (Fig. 11 et 12).

L'un des traits distinctifs de la surface ventrale est la présence de cellules uniques, en forme de dôme et éparpillées (Fig. 11). Ces cellules correspondent aux idioblastes contenant les cystolithes (voir également Fig. 2). La surface supérieure est facile à distinguer du fait des nombreux stomates entourés par des cellules subsidiaires avec des striations cuticulaires évidentes (Fig. 12). Les nervures sont plus protubérantes sur la surface supérieure. Des poils coniques, avec une base élargie, sont présents sur les deux surfaces (Fig. 11 et 12). Les nervures de la surface supérieure comportent des poils pluricellulaires glandulaires avec une tige et une extrémité allongée (Fig. 12). Ces structures sont communes à tous les cv et varient peu chez les feuilles de fin d'été. En général, les cellules épidermiques des cv japonais possèdent une cuticule plus épaisse sur la surface supérieure.

DISCUSSION

Dans cette deuxième partie de notre étude sur la classification du mûrier, qui porte sur sept cv de *Morus alba* et trois cv de *M. multicaulis*, il est démontré que, si la feuille de mûrier présente une morphologie variable, ses caractéristiques anatomiques sont, en revanche, tout à fait homogènes. Ce

résultat ressort d'une comparaison entre des variétés japonaises et indigènes et d'une comparaison individuelle entre les différents cv, sans qu'il soit tenu compte de leur origine géographique.

Il n'y a aucun doute pour ce qui concerne les différences entre certains paramètres, comme l'épaisseur de la lame foliaire, le ratio tissu palissadique/mésophylle et la fréquence de cystolithes par unité de surface. Il convient de souligner que si ces différences peuvent aider à la classification du mûrier, elles ne doivent pas être considérées comme des critères importants pour le nourrissage des vers à soie. A cet égard, le nombre de cystolithes par unité de surface, distinct pour chaque cv affecte moins la sapidité de la feuille de mûrier que l'âge de la feuille car les concrétions cystolitiques s'accroissent lorsque la feuille est trop mûre.

Certains caractères foliaires comme l'épaisseur de la cuticule et le nombre de stomates par unité de surface ont été délibérément omis car ils sont plus directement impliqués dans le comportement des différents cv lorsque ceux-ci sont soumis à des stress environnementaux. En fait, nous pensons que cette question devrait faire l'objet d'une étude distincte en raison de son importance dans la faculté d'adaptation du mûrier à l'environnement et dans la tolérance aux champignons parasites.

STAGES OF OOOGENESIS CORRELATED WITH THE AGE OF THE UZI FLY, *EXORISTA BOMBYCIS* (= *E. SORBILLANS*) (DIPTERA: TACHINIDAE)

H.B. MANJUNATHA & H.P. PUTTARAJU

Department of Sericulture, Jnana Bharathi Campus, Bangalore University,
Bangalore 560 056, India.

*In the present communication the fourteen stages of oogenesis described previously are correlated with the age of the uzi fly, *Exorista bombycis* (Louis). The process of egg development is almost synchronous in all the 120 ovarian tubules, but the growth rate and maturity period show some differences. Further, the uzi fly possesses a high reproductive potential, having 9-10 egg chambers in each ovarian tubule. The first and second oocytes take about six days to reach stage 14, whereas the third and fourth take only four days. Maturation of the first four egg chambers is triggered by mating of the flies and maturation of the other egg chambers is regulated by deposition of the eggs. The results are discussed with a view to evolving possible control measures.*

Keywords: *Exorista bombycis*, *Bombyx mori*, nurse cell nuclei, endomitosis, vitellogenesis, blastocysts.

INTRODUCTION

In previous papers (Manjunatha and Puttaraju, 1992; Puttaraju and Manjunatha, 1994) the authors have subdivided and described the process of egg development in *Exorista bombycis* (Diptera: Tachinidae), a serious endoparasitoid of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). The present paper is an extension of the previous work and it correlates all 14 stages of oogenesis with the age of the uzi fly, giving particular emphasis to know the time required for the egg to pass through each developmental stage and to analyse the relative growth rate of the various components of the oocyte. Further, it is hoped that these data will serve as a basis for future investigations involving suppression of egg formation or induction of infertility at the appropriate developmental stage of egg and age of this economically important insect pest.

MATERIALS AND METHODS

The strains of *Exorista bombycis* used to study the developmental stages (Manjunatha and Puttaraju, 1993) and cytological changes during oogenesis (Puttaraju and Manjunatha, 1994) were also used in these studies. As was done in the previous experiments, selected healthy pupae collected in batches at 24 hr intervals till eclosion and female flies aged 4, 12, 24, 48, 72, 96, 120 and 144 hr constituted the material for the present investigation. Ten ovaries were collected from five females in each batch by dissecting them in insect Ringer's solution. The ovarian tubules were stained according to the method described in the previous paper (Puttaraju and Manjunatha, 1994). The volumetric measurements of ovaries, egg chambers and germarium were computed based on the formula, $V = \pi/6w^2l$ (Puttaraju and Manjunatha, 1994).

RESULTS

The ovaries of *E. bombycis* are of the polytrophic type, containing about 120 ovarioles. The ovarioles at 14 stages of oogenesis are correlated with the age of pupae and adults as follows.

The volumetric measurements of ovaries and egg chambers of the various ages of pupae and adults correlated with the various stages of ovarian development are presented in Table I.

Ovary of pupae (Fig. 1 and 2) aged:

4-6 days: At this age, the ovary is very small, white and opaque. The immature ovarian tubules are not clearly differentiated from the germarium and they are entangled with each other in a common membrane. Each ovarian tubule is at stage 1 and composed of only the germarium filled with mitotically active oogonial cells. The follicle appears to be opaque as the oogonial metaphase chromosomes are stained with Fuchsin. Occurrence of mitotic divisions is frequent in the polar filament and in the germarium.

7 days: The ovary is still small, translucent and immature. The first ovarian cycle is at a later part of stage 1. The germarium of each ovariole is composed of a cyst of cells enclosed in a common membrane at the posterior region. Mitotic divisions are still in progress in the germarium. A faint line of separation appears between the anterior and posterior parts of the germarium. The unstained blastocysts in the posterior part of the germarium indicate that the NCN (nurse cell nuclei) have not yet reached the endomitotic stage.

8 days: The ovary is still small in size and each ovarian tubule is in stage 1 and contains the germarium only. The posterior part of the germarium has been filled with a cyst of 16 cells, indicating the formation of the first egg chamber. At this stage, the volume of all the blastocyst cells has slightly increased and is enclosed in a follicular epithelium. The oocyte has not yet differentiated from the nurse cells at this stage. The nurse cells with a light stain indicate that these cells undergo endomitosis. The faint line of separation seen in the 7-day-old pupal ovary becomes distinct between the anterior and posterior parts of the germarium.

9 days: Each ovarian tubule still contains the germarium only and is still in stage 1. The size of the first egg chamber in some of the outermost ovarian tubules increases slightly as and when the NCN increase their volume due to endoreduplication. Follicular cells begin to accumulate around the blastocysts.

10 days: The blastocysts have increased their volume and all 16 sister cells are separated from the neighbouring oogonial cells which are present at the middle part of the germarium by a distinct membrane. The volume of all 16 sister cells is equal and therefore the oocyte cannot be differentiated from the nurse cells. The pale staining nature of NCN indicates the rate of endomitosis. The first egg chamber is ready to separate from the germarium.

11 days: Each ovarian tubule consists of a developing egg chamber and a germarium. The circular-shaped first egg chamber, which gets separated from the germarium at stage 2, is still attached by a stalk of follicular cells. The first egg chamber consists of 16 uniform-sized sister cells that are surrounded by a common epithelial membrane. The epithelial membrane contains a few mitotically active follicular cells. The germarium is in stage 1.

12 days: The compactly arranged ovarian tubules are enriched with fat tissue. Each ovarian tubule contains two developing egg chambers and a germarium. The volume of the first egg chamber (Table I) enlarges further and enters stage 3 of the first ovarian cycle with 5 paired deeply stained chromosomes. The second ovarian cycle, which is at the end of stage 1 in the second egg chamber of the germarium, becomes delineable from oogonial cells by a faint line of separation. The long germarium consists of blastocytes, mitotically active oogonial cells and stem cells.

Table I. Stage distribution and volumetric measurements of ovaries and egg chambers correlated with the age of the female uzi fly, *E. bombycis*.

Tableau I. Répartition des stades et mesures volumétriques des ovaires et des ovarioles en fonction de l'âge de la mouche uzi femelle *E. bombycis*.

S	O		I EC		II EC		III EC		IV EC		V EC		VI EC		VII EC		VIII EC		IX EC		X EC		G		TFL (μm)
	V (mm ³)	L (mm)	V (μm ³)	S	V	S	V	S	V	S	V	S	V	S	V	S	V	S	V	S	V	S	V	S	
Pupa / Pupe																									
4-5d	0.114 ±0.099	0.506 ±0.08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.115 ×10 ⁵ ±0.007	1	278.556 ±0.162
6d	0.138 ±0.173	0.559 ±0.06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.786 ×10 ⁵ ±0.01	1	319.125 ±0.20
7d	0.140 ±0.06	0.552 ±0.03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.549 ×10 ⁵ ±0.02	1	253.00 ±0.09
8d	0.191 ±0.11	0.571 ±0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.670 ×10 ⁵ ±0.00	1	316.889 ±0.09
9d	0.267 ±0.12	0.653 ±0.07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.589 ×10 ⁵ ±0.00	1	308.20 ±0.22
10d	0.371 ±1.07	0.729 ±0.89	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.157 ×10 ⁵ ±0.013	1	312.80 ±0.23
11d	0.370 ±0.13	0.707 ±0.07	1.632 ×10 ⁵ ±0.01	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.834 ×10 ⁵ ±0.01	1	311.157 ±0.09

Continued / Suite page suivante

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

S	O		I EC		II EC		III EC		IV EC		V EC		VI EC		VII EC		VIII EC		IX EC		X EC		G		TFL (μm)
	V (mm ³)	L (mm)	V (μm ³)	S	V	S	V	S	V	S	V	S	V	S	V	S	V	S	V	S	V	S	V	S	
Pupa / Pupa																									
12d	0.437 ±0.07	0.795 ±0.10	2.662 ×10 ⁵ ±0.01	3	9.253 ×10 ⁴ ±0.00	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.274 ×10 ⁵ ±0.00	1	387.166 ±1.34
13d	0.503 ±1.49	0.864 ±1.10	6.901 ×10 ⁵ ±0.02	3, 4	1.735 ×10 ⁵ ±0.014	2, 3	8.872 ×10 ⁴ ±0.002	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.628 ×10 ⁵ ±0.021	1	506.774 ±0.37
14d	0.510 ±1.027	0.911 ±0.980	6.523 ×10 ⁵ ±0.033	5, 6	1.970 ×10 ⁵ ±0.004	4	8.051 ×10 ⁴ ±0.002	2	2.868 ×10 ⁴ ±0.000	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.268 ×10 ⁵ ±0.000	1	477.634 ±1.90
Adult / Adulte																									
4h	0.718 ±0.771	0.906 ±0.203	2.316 ×10 ⁶ ±0.053	6, 8	5.318 ×10 ⁵ ±0.012	5	1.960 ×10 ⁵ ±0.006	3	5.623 ×10 ⁴ ±0.001	2	4.046 ×10 ⁴ ±0.001	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.844 ×10 ⁵ ±0.005	1	561.864 ±0.018
12h	0.841 ±0.743	0.997 ±0.240	7.477 ×10 ⁶ ±0.024	9, 11	9.593 ×10 ⁵ ±0.022	6	3.383 ×10 ⁵ ±0.005	4	8.616 ×10 ⁴ ±0.003	3 4	4.674 ×10 ⁴ ±0.000	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.518 ×10 ⁵ ±0.007	1	755.167 ±0.342
1d	2.527 ±1.866	1.442 ±0.166	1.112 ×10 ⁷ ±0.280	12	2.827 ×10 ⁶ ±0.126	7, 8	8.019 ×10 ⁵ ±0.025	5	3.263 ×10 ⁵ ±0.009	4	1.369 ×10 ⁵ ±0.003	3	9.189 ×10 ⁴ ±0.005	1, 2	5.852 ×10 ⁴ ±0.001	1	-	-	-	-	-	-	2.044 ×10 ⁵ ±0.005	1	1124.083 ±0.101
2d	5.399 ±3.790	2.047 ±0.311	2.472 ×10 ⁷ ±0.32	14	1.240 ×10 ⁷ ±0.125	12	3.226 ×10 ⁶ ±0.106	9 10	9.057 ×10 ⁵ ±0.051	6	2.918 ×10 ⁵ ±0.011	5	1.155 ×10 ⁵ ±0.033	2	6.608 ×10 ⁴ ±0.001	2	4.461 ×10 ⁴ ±0.000	1	-	-	-	-	1.529 ×10 ⁵ ±0.003	1	1792.084 ±0.514

Continued / Suite page suivante

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

S	O		I EC		II EC		III EC		IV EC		V EC		VI EC		VII EC		VIII EC		IX EC		X EC		G		TFL (μm)
	V (mm ³)	L (mm)	V (μm ³)	S	V	S	V	S	V	S	V	S	V	S	V	S	V	S	V	S	V	S	V	S	
Adult / Adulte																									
3d	8.533	2.423	2.427	14	2.187	14	2.056	14	5.469	1	1.512	6	4.566	3	2.598	3	6.058	2	2.554	1	1.589	1	1.660	1	2587.501
	±4.128	±0.312	×10 ⁷		×10 ⁷		×10 ⁷		×10 ⁶	13	×10 ⁶		×10 ⁵		×10 ⁵		×10 ⁴	3	×10 ⁴		×10 ⁴		×10 ⁵		±0.886
4d	9.917	2.559	2.373	14	2.435	14	2.283	14	2.366	14	1.719	7	4.846	5	2.941	3	8.913	3	3.712	2	2.609	2	1.598	1	3073.566
	±4.129	±0.219	×10 ⁷		×10 ⁷		×10 ⁷		×10 ⁷		×10 ⁶		×10 ⁵		×10 ⁵	4	×10 ⁴		×10 ⁴		×10 ⁴		×10 ⁵		±0.364
5d	8.190	2.471	2.528	14	2.528	14	2.570	14	2.590	14	4.110	8	1.020	6	3.205	4	1.146	3	4.897	2	3.351	2	1.508	1	3110.520
	±4.615	±0.125	×10 ⁷		×10 ⁷		×10 ⁷		×10 ⁷		×10 ⁶		×10 ⁶		×10 ⁵		×10 ⁵		×10 ⁴		×10 ⁴		×10 ⁵		±0.522
6d	8.682	2.496	2.671	14	2.631	14	2.671	14	2.631	14	7.330	8	1.115	6	2.743	4	9.737	3	4.895	2	3.352	2	1.542	1	3159.740
	±4.986	±0.344	×10 ⁷		×10 ⁷		×10 ⁷		×10 ⁷		×10 ⁶		×10 ⁶		×10 ⁵		×10 ⁴		×10 ⁴		×10 ⁴		×10 ⁵		±0.000
			±0.450		±0.425		±0.450		±0.425		±0.195		±0.067		±0.013		±0.003		±0.000		±0.000		±0.005		

O: Ovary / *Ovaire*.EC: Egg chamber / *Ovariole*.

G: Germarium.

V: Volume.

S: Stage / *Stade*.L: Length / *Longueur*.TFL: Total follicle length / *Longueur totale du follicule*.

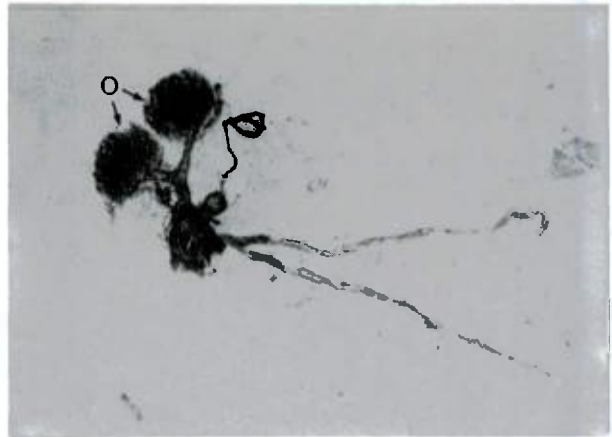


Fig. 1: Reproductive system of female pupa (14 days old).

Fig. 1 : Système de reproduction de la pupe femelle (à 14 jours).

O: Ovary / Ovaire.



Fig. 2: Ovarian tubule of pupa (14 days old).

Fig. 2 : Tube ovarique de la pupe (à 14 jours).

S: Stage / Stade.

G: Germanium.

13 days: At the distal end the ovarian tubules are slightly separated from each other as and when the first egg chamber proceeds to its further development. The first egg chamber enters into stage 4. However, a few first egg chambers are still in late stage 3. In a few ovarian tubules the second egg chamber has pinched off from the germarium at stage 2, the rest contains polytene chromosomes which are usually seen at stage 3. The third egg chamber is present at the distal part of the germarium at stage 1 and separated from the other cystocytes by a faint line.

The stem cells are active, the resultant oogonial cells are seen in the anterior region of the germarium and cystocytes are seen in the middle region of the germarium. The active oogonial mitosis is evident by the metaphase and anaphase in the whole mount of the germarium.

14 days: Fourteen-day-old pupae exhibit still immature ovaries. The ovarian tubules are now totally separated from each other. Each ovarian tubule contains three developing egg chambers, a germarium with another egg chamber at the posterior region.

The endomitotic process is completed in the nurse cell nuclei of the first egg chamber and concurrently accumulation of yolk has started from the posterior region of the developing oocyte. At the end of the 14th day, the egg chamber enters into stage 6. In the second egg chamber, the NCN contain dissociating polytene type chromosomes at stage 4. The third egg chamber is separated from the germarium at stage 2. The fourth egg chamber is located at the posterior part of the germarium. The NCN in this chamber does not take stain and appears as transparent cells. Further, this egg chamber is separated from the adjacent cystocytes by a faint line of separation. The germarium is at stage 1.

Ovary of the adult fly (Fig. 3) aged:

4 hours: The teneral uzi fly contains immature ovaries. Each ovarian tubule consists of four independent developing egg chambers and one young egg chamber in the posterior part of the germarium. The process of vitellogenesis continues till 1/4 of the volume of the first egg chamber and the remaining portion of the egg chamber is filled with NCN. The NCN contain uniformly distributed chromatin material. The second egg chamber contains NCN of varying degrees of maturity. The oocyte nucleus occupies most of the posterior part of the chamber and becomes apparent with its opaque nature. The NCN of the third egg chamber contain stranded polytene chromosomes. The oocyte nucleus is not distinguishable. All the blastocysts are enclosed in a deep stained single layer of follicular cells. During this time, the fourth egg chamber pinches off from the germarium. As endomitosis begins, the nurse cell nuclei stain lightly. The fifth egg chamber is in stage 1, separated from the adjacent cystocyte by a faint line of separation in the germarium. A few follicular cells are accumulated around this egg chamber, which is present at the basal part of the germarium. The germarium contains only oogonial cells and cystocytes.

12 hours: Each ovarian tubule of the immature ovaries contains 4-5 developing egg chambers and a germarium.

As a result of yolk accumulation in the first egg chamber from 1/2 to 2/3 of its total volume, the nurse cells are pushed further towards the anterior part of the egg. The follicular cells migrate in a centrifugal manner in order to separate the oocyte chamber from the nutritive chamber. The second egg chamber contains NCN with evenly distributed chromatin material. The apparent oocyte nucleus shows Feulgen negative staining property and remains as a transparent spherical body. In the third egg chamber, the posterior NCN contain dissociating polytene chromosomes while the anterior NCN contain stranded non-banded polytene chromosomes. The fourth egg chamber contains stranded primary polytene chromosomes in almost all its nurse cell nuclei. However, the oocyte nucleus is not distinguishable from the blastocysts. The fifth egg chamber is pinched off at stage 2 from the germarium in the outermost whorl of ovarian tubules, whereas the corresponding egg chamber in the inner whorl is still present at the basal part of the germarium and exhibits the events as seen in stage 1. The germarium is long and contains oogonial cells only.

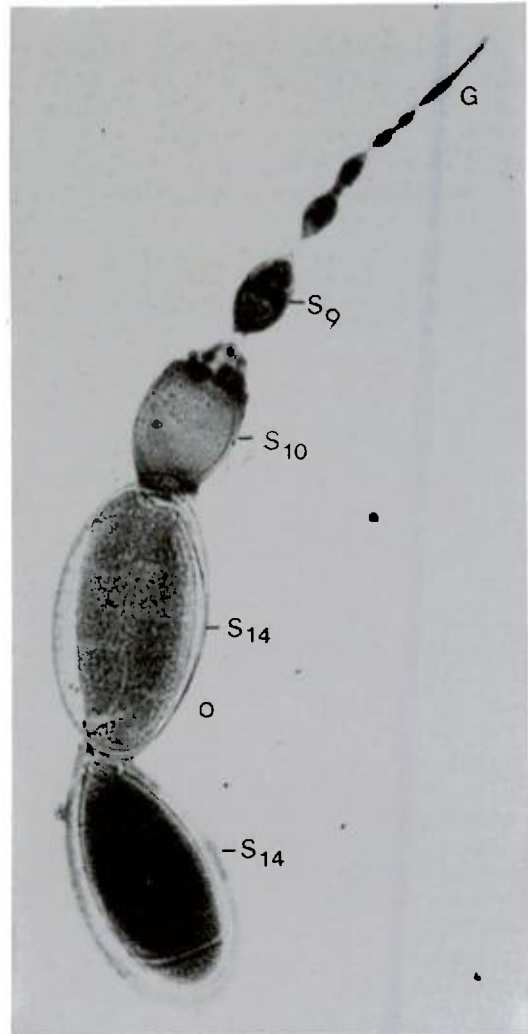


Fig. 3: Ovarian tubule of adult uzi fly (48 hr old).

Fig. 3 : Tube ovarique de la mouche uzi adulte (à 48 heures).

S: Stage / Stade.

G: Germarium.

24 hours: Mature ovaries are seen at this stage and each ovary contains easily detachable ovarian tubules. Each tubule is provided with tracheoles all along its length and contains seven developing egg chambers and a germarium.

In the first egg chamber, the yolk content occupies more than 3/4 of its total volume. The degenerating NCN are present in the anterior small portion of the egg chamber. In a few eggs, the endochorion secreted by the follicular cells appears as a faint line between the yolk and the follicular cells. As the yolk content increases more and more, the volume of the egg chamber also increases. The egg chamber is in stage 12. As the second egg chamber has been filled up with yolk till 1/2 of its total volume (stages 7-8), the oocyte nucleus becomes distinct at the anterior border of the oocyte. The NCN are still in endoreduplication and as a result, the volume of the NCN increases. In the third egg chamber, all NCN are concentrically arranged and surrounded by a single layer of epithelial cells. This egg chamber changes its shape from circular to oval. The NCN contain dissociating polytene chromosomes. The unstained oocyte nucleus becomes distinct from the deeply stained NCN at the

posterior border of the egg chamber. In the fourth egg chamber, the posterior NCN contain dissociating polytene chromosomes, whereas the anterior NCN contain stranded polytene chromosomes, as in stage 4 of the first ovarian cycle. The NCN in the fifth egg chamber contain stranded non-banded polytene chromosomes. The oocyte nucleus is not distinguishable from the nurse cells group. The follicular cells surround the spherical egg chamber.

The sixth and seventh egg chambers are still present in the distal region of the germarium at the end of stage 1. Their volume and size are presented in Table 1. Between these egg chambers and other cystocytes, a faint line of separation is apparent. The anterior and middle regions of the germarium are filled with only mitotically active oogonial cells and blastocysts, respectively.

48 hours: Two-day-old flies have one fully developed egg, seven developing chambers and a germarium.

The first egg chamber is completely developed with all necessary appendages. Each egg is oval in shape with a slightly narrow anterior and broad posterior end. The lightly stained yolk content is surrounded by a thin layer of transparent cytoplasm, over which a transparent chorion is present within the rudiments of the follicular squamous epithelial layer. The egg is ready for oviposition at stage 14.

Pycnotic NCN are seen at the anterior end of the second chamber, which is in stage 12. A faint line of endochorion lies between the yolk mass and the follicular epithelium. The third egg chamber is at stages 9-10. Each egg chamber is filled up with yolk till 1/2 to 3/4 of its total volume.

The fourth egg chamber is in stage 6. The chromatin material is distributed evenly over the entire volume of the nurse cell nuclei. In the fifth egg chamber, the chromatin material is distributed evenly over the posterior NCN and the stranded polytene chromosome found in the anterior NCN. This egg chamber is in stage 5 of the fifth ovarian cycle.

In the sixth egg chamber, a mass of 5 paired chromosomes are seen in NCN. The oocyte nucleus cannot be distinguished from the NCN. The blastocysts are enclosed in a single layer of follicular cells. This egg chamber shows the same behaviour as in stage 2 of the first ovarian cycle.

The seventh egg chamber also exhibits the same behaviour as during stage 2 of the ovarian development. Here, all the sister cells are uniform in size and surrounded by a common epithelial membrane of follicular cells. When endomitosis begins in all NCN, the Feulgen positive chromatin material becomes distinct.

The eighth egg chamber is still attached to the germarium and at the end of stage 1. The ninth egg chamber is also visible in the germarium by the appearance of a faint line of separation. This egg chamber consists of only blastocysts in stage 1 of the ovarian development. The germarium contains only mitotically active oogonial cells.

72 hours: The ovaries are mature with free ovarian tubules and each tubule contains 3 fully developed eggs, seven developing egg chambers and a germarium.

The first, second and third eggs are completely developed and are ready for oviposition. The rudimentary follicular cells are still conspicuous with the ovarian sheath.

The fourth egg chamber is between stages 11 and 13 of oogenesis. A major portion of this egg chamber is filled with yolk and as a result of this the degenerating NCN pushes towards the anterior end of the egg chamber. The endochorion secreted by the follicular cells exists between the yolk and the follicular cells and appears as a faint line. The fifth egg chamber is in stage 6 of the egg development.

The sixth egg chamber is at the end of stage 3 of the egg development. The oocyte nucleus and NCN are enclosed in a layer of epithelial membrane consisting of follicular cells. All NCN contain evenly distributed chromatin material.

The seventh egg chamber is circular in shape. All NCN have reached maximum ploidy, thereby revealing stranded polytene chromosomes. Differentiation between oocyte nucleus and NCN encounters difficulties.

The eighth egg chamber exhibits a condition similar to the early part of stage 3. The NCN contain stranded polytene chromosomes and are less distinct than in the seventh egg chamber.

The ninth egg chamber is separated from the germarium at stage 2 in a few ovarian tubules which are present in the outermost whorl of the ovary. Conversely, in the inner whorl of the ovarian tubules,

this egg chamber is still attached to the basal region of the germarium and is at the end of stage 1. This egg chamber contains a few darkly stained follicular cells.

The tenth egg chamber is present in the basal region of the germarium, containing undifferentiated NCN and oocyte nucleus. The egg chamber is also separated from the adjacent cystocytes by a faint line of separation. The germarium is left with yet another egg chamber which is separated from the adjacent cystocyte by a faint line.

96 hours: Each ovarian tubule consists of four well-matured oocytes, seven developing eggs and a germarium.

The first four eggs are mature and are ready for oviposition. The volume of these mature oocytes is presented in Table I.

In the fifth egg chamber, yolk has been deposited in a small portion of the posterior pole and is in stage 7.

The shape of the sixth egg chamber has changed from circular to oval due to the onset of yolk accumulation. The nurse cells contain nuclei at different maturation stages during stage 5 of the first ovarian cycle.

The NCN of the seventh egg chamber contain polytene chromosomes of dissociating nature and are at the end of stage 3, as seen in the first ovarian cycle. The oocyte is not distinguishable from the blastocysts. The follicular cells are mitotically active and increase in number.

In the eighth egg chamber, the NCN contain non-banded polytene chromosomes and exhibit the same behaviour as during stage 3 of the first ovarian cycle. The ninth egg chamber contains 16 blastocysts surrounded by deep stained follicular cells. The NCN in this egg chamber show an early endomitosis. The tenth egg chamber now separates from the germarium early in stage 2 as in the first ovarian cycle.

The eleventh egg chamber is located at the basal region of the germarium and is in stage 1. The middle region of the germarium contains cystocytes whereas the anterior region contains oogonial cells only.

120 hours: At this age, each ovarian tubule consists of four completely developed eggs, eight developing chambers and a germarium.

The first four oocytes are completely developed and are ready for oviposition. The volumetric measurements of these eggs are presented in Table I.

In the fifth egg chamber, the yolk accumulation has increased further to 1/4 of its total volume and is in stage 8. The sixth egg chamber contains a small quantity of yolk at the posterior pole, as in stage 6.

The seventh egg chamber exhibits a similar feature as in stage 4. In the posterior NCN, stranded polytene chromosomes are completely dissociated into constituent chromatin and are evenly distributed. Conversely, in the middle and anterior NCN, the polytene type chromosomes are present. The number of follicular cells around the oocytes and nurse cells complex has increased comparatively by the following mitotic divisions.

The NCN of the eighth egg chamber contain five groups of chromosomes as a mass, which indicates that the process of endomitosis has not yet reached a maximum ploidy to form polytene structures.

The ninth and tenth egg chambers exhibit the same feature as seen in stage 2, although they have separated from the germarium.

The eleventh and twelfth egg chambers are still present in the germarium at mid-part of stage 1, but they are separated from each other by a membrane.

144 hours: All the ovarian tubules reveal a similar feature but slightly advanced compared to 5-day-old flies.

DISCUSSION

The present study demonstrates that the process of egg development is almost synchronous in all the 120 ovarian tubules, as has been reported in other polytrophic dipteran insects (King, 1957; Bonhag, 1958; Goodman *et al.*, 1968; Telfer, 1975), but the growth rate and rate of maturation show some differences. This study also reveals that the rate of ovarian development in the uzi fly is slightly faster than in *Drosophila* but much faster than in *Musca* (Goodman *et al.*, 1968) and in *Calliphora* (Bonhag, 1958). The volume of the ovary increases 86.99 fold in *E. bombycis*, compared to 60 fold in *Cochliomyia hominivorax* (LaChance and Bruns, 1963) and 70 fold in *M. domestica* (Goodman *et al.*, 1968). In *Calliphora*, *Musca* and *Cochliomyia* there is a maximum of three egg chambers developing at a time in one ovariole during the sexually mature stage, in *Drosophila* it is six or seven whereas the uzi fly has 9 to 10 egg chambers with all the 10 egg chambers showing uniform development in almost all ovarioles. In view of these differences, it is presumed that the uzi fly possesses a higher reproductive potential than other dipteran insects. Therefore the population of uzi flies multiplies and distributes to a wide range in a short period by making use of continuous availability of the host throughout the year.

An interesting feature observed in the present study is the non-commencement of endomitosis until the faint line of separation has been formed between the oogonial cells and the blastocysts in the ovaries of 7-day-old pupae. Since endomitosis begins in the first egg chamber of 8-day-old *E. bombycis* pupae, the polytene nature appears in the NCN of 12-day-old pupae, and endomitosis is completed with the despiralization of polytene chromosomes on the day before the emergence, taking 3-4 days from the onset of endomitosis. The phenomenon provides a great scope to the NCN to escape from the effect of agents used for induction of sterility at adult stage. In *C. hominivorax* (LaChance and Bruns, 1963; LaChance and Leverich, 1968) endomitosis was completed within 24 hr after eclosion by passing at least three days after the onset of endomitosis. Therefore, LaChance and Bruns (1963) gave particular emphasis to the early growth stages because of their higher radiosensitivity. Keeping this in view, all uzi pupae aged 10-12 days, having stage 2 ovaries and before the polytene phase appears in the NCN, should be exposed to chemical or physical agents in order to achieve maximum sterility. Eggs that have passed stage 3 at the moment of application of alkylating agents or radiation develop into fertile eggs.

In the uzi fly, the development of the first and second oocytes from stages 1 to 14 takes about 6 days, whereas the third and fourth take only 4 days to reach stage 14. In the house fly, the development of oocytes from stage 4 to stage 14 takes less than 4-5 days (Goodman *et al.*, 1968). The rapid development of the third and fourth egg chambers is stimulated by mating of the female fly. At the sexually mature stage, only 4 eggs are ready for oviposition and the development of the remaining oocytes is inhibited. Based on the present data, it can be inferred that the egg chambers produced before eclosion will get stimulation from male flies for their rapid development and they become mature 3 days after eclosion. In the meantime, the remaining egg chambers which have "pinched off" from the germarium after eclosion grow gradually up to the end of 3 days after eclosion; thereafter their further development will be ceased 5 days after eclosion. This feature leads us to assume that mating of flies has some role in oostatic hormone secretion in order to stimulate vitellogenesis, as has been reported in *D. silvestris* by Craddock and Boake (1992). The stimulation is also found to be selective because only the first four eggs showed rapid development, ceasing the development of other eggs.

It is evident from these results that the egg development in *E. bombycis* is characterized by diverse cellular and chromosomal events which may be controlled by genetic, hormonal, chemical and environmental factors, as has been stated by LaChance *et al.* (1968). Based on these results, the following approaches are suggested in the control of this economically important insect pest.

One approach is to treat the post-parasitic maggots, which contain purely germ cell line in their ovary, by suitable chemical and/or physical agents to arrest further egg development. As the nurse cells and oocyte complex are formed from the germ cells, the destruction caused during blastocyst formation and differentiation would not allow the normal development of the eggs, and as the ovaries are still in immature condition a mild concentration of alkylating agents might be sufficient to achieve complete sterility.

Another approach is to treat the uzi pupa at any appropriate period mentioned here. Exposing the uzi pupae at stage 1 (4 days to 10 days old) to various chemosterilants that cause death of gonial cells, thereby preventing them from forming a normal cystocyte and exposing them to physical agents that prevent the nurse cell chromosomes at stage 3 (in 10-12-day-old pupae) from maximum endoreduplication and synthesis of nucleoproteins for developing oocytes which are necessary for embryonic development.

REFERENCES

- BONHAG P.F. (1958) Ovarian structure and vitellogenesis in insects. *Ann. Rev. Entomol.*, 3, 137-160.
- CRADDOCK E.M., BOAKE C.R.G. (1992) Onset of vitellogenesis in female *Drosophila silvestris* is accelerated in the presence of sexually mature males. *J. Insect Physiol.*, 38(9), 634-650.
- GOODMAN T., MORRISON P.E., DAVIES D.M. (1968) Cytological changes in the developing ovary of the house fly fed milk and other diets. *Can. J. Zool.*, 46, 409-421.
- KING R.C. (1957) Oogenesis in adult *Drosophila melanogaster*. II: Stage distribution as a function of age. *Growth*, 21, 95-102.
- LACHANCE L.E., BRUNS S.B. (1963) Oogenesis and radiosensitivity in *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Biol. Bull.*, 124(1), 65-83.
- LACHANCE L.E., LEVERICH A.P. (1968) Cytology of oogenesis in chemosterilized screw-worm flies, *Cochliomyia hominivorax*, as related to endomitosis in nurse cells. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 61, 1188-1197.
- MANJUNATHA H.B. (1993) Morphological and cytological investigations on the uzi fly, *Exorista bombycis*. Ph.D. thesis, Bangalore University, Bangalore.
- MANJUNATHA H.B., PUTTARAJU H.P. (1993) Ovarian developmental stages of uzi fly, *Exorista bombycis* (Diptera: Tachinidae). In *Recent Advances in Uzi Fly Research*. Eds. G.P. Channabasavanna, G. Veeranna and S.B. Dandin, pp. 57-65.
- PUTTARAJU H.P., MANJUNATHA H.B. (1994) Cytological changes during oogenesis in the uzi fly, *Exorista sorbillans* (Tachinidae: Diptera). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 87(6), 891-900.
- TELFER W.H. (1975) Development and physiology of the oocyte-nurse cell syncytium. *Adv. Insect Physiol.*, 11, 223-319.

ETAPES DE L'OVOGENESE EN FONCTION DE L'AGE DE LA MOUCHE UZI *EXORISTA BOMBYCIS* (= *E. SORBILLANS*) (DIPTERA : TACHINIDAE)

H.B. MANJUNATHA & H.P. PUTTARAJU

Department of Sericulture, Jnana Bharathi Campus, Bangalore University, Bangalore 560 056, Inde.

Dans cette étude, les quatorze stades de l'ovogenèse décrits précédemment sont mis en corrélation avec l'âge de la mouche uzi, *Exorista bombycis* (Louis). Le processus du développement des oeufs est presque synchrone dans les 120 tubes ovariens mais le taux de croissance et la période de maturité présentent des différences. La mouche uzi possède un potentiel de reproduction élevé, avec 9 à 10 oeufs dans chaque tube ovarien. Les deux premiers ovocytes atteignent le stade 14 en environ six jours, contre quatre jours seulement pour le troisième et le quatrième ovocyte. La maturation des quatre premiers follicules est déclenchée par l'accouplement des mouches et la maturation des autres oeufs est régulée par la ponte des oeufs. Les résultats sont discutés du point de vue de la mise au point de mesures de lutte possibles.

INTRODUCTION

Dans des articles précédents (Manjunatha et Puttaraju, 1992 ; Puttaraju et Manjunatha, 1994), les auteurs ont subdivisé et décrit le processus du développement des oeufs chez *Exorista bombycis* (= *E. sorbillans*) (Diptera : Tachinidae), endoparasitoïde majeur de *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae). Dans cet article, qui constitue le prolongement de nos études antérieures, les 14 stades de l'ovogenèse sont corrélés avec l'âge de mouche uzi principalement afin de déterminer le temps mis par l'oeuf pour passer par chacun des stades du développement et d'analyser le taux de croissance relatif des différents composants de l'ovocyte. De plus, nous espérons que l'obtention de ces données permettra d'établir une base pour des études futures sur la suppression de la formation des oeufs ou l'induction de la stérilité au stade et à l'âge appropriés du développement de l'oeuf chez ce parasite important sur le plan économique.

MATERIELS ET METHODES

Les souches d'*Exorista sorbillans* utilisées pour l'étude des stades du développement (Manjunatha et Puttaraju, 1993) et les modifications cytologiques au cours de l'ovogenèse (Puttaraju et Manjunatha, 1994) ont également été utilisées pour l'étude décrite ici. Comme dans les expériences précédentes, des pupes saines sélectionnées et prélevées dans des lots à 24 heures d'intervalle jusqu'à l'éclosion et des mouches femelles âgées de 4, 12, 24, 48, 72, 96, 120 et 144 heures forment le matériel de l'étude présentée ici. Dix ovaires ont été prélevés sur cinq femelles de chaque lot disséquées dans la solution de Ringer pour insectes. Les tubes ovariens ont été colorés suivant la méthode décrite dans notre article précédent (Puttaraju et Manjunatha, 1994). Les mesures volumétriques des ovaires, des follicules et du germarium ont été enregistrées suivant la formule suivante : $V = \pi/6w^2l$ (Puttaraju et Manjunatha, 1994).

RESULTATS

Les ovaires d'*E. bombycis* sont du type polytrophique et contiennent environ 120 ovarioles. Les ovarioles aux 14 stades de l'ovogenèse sont corrélés avec l'âge des pupes et des adultes, comme indiqué ci-dessous.

Les mesures volumétriques des ovaires et des follicules des différents stades des pupes et des adultes en fonction des différents stades du développement ovarien sont présentés dans le tableau I.

Ovaires des pupes (Fig. 1 et 2) âgées de :

4 à 6 jours : A cet âge, l'ovaire est très petit, blanc et opaque. Les tubes ovariens immatures ne sont pas clairement différenciés du germarium et sont entremêlés dans une membrane commune. Chaque tube ovarien est au stade 1 et composé seulement du germarium qui est rempli d'ovogonies mitotiquement actives. Le follicule prend un aspect opaque lorsque les chromosomes métaphasiques des ovogonies sont colorés avec de la fuchsine. Les divisions mitotiques sont fréquentes dans le filament polaire et dans le germarium.

7 jours : L'ovaire est toujours de petite taille, transparent et immature. Le premier cycle ovarien se situe à un moment tardif du stade 1. Le germarium de chaque ovariole est composé d'un sac de cellules enfermé dans une membrane commune située à la région postérieure. Les divisions mitotiques se poursuivent dans le germarium. Une ligne de séparation peu marquée apparaît entre les parties antérieure et postérieure du germarium. Les blastocystes non colorés dans la partie postérieure du germarium indiquent que les noyaux des cellules nourricières (NCN) n'ont pas encore atteint le stade endomitotique.

8 jours : L'ovaire est toujours de petite taille ; chaque tube ovarien est au stade 1 et comporte uniquement le germarium. La partie postérieure du germarium s'est remplie d'un sac de 16 cellules, indiquant la formation du premier follicule. A ce stade, le volume des blastocystes augmente légèrement et est enveloppé dans un épithélium folliculaire. L'ovocyte ne s'est pas encore différencié des cellules nourricières à ce stade. La légère coloration des cellules nourricières indique qu'elles subissent une endomitose. La ligne de séparation peu marquée observée dans l'ovaire de la pupa à 7 jours devient distincte entre les parties antérieure et postérieure du germarium.

9 jours : Chaque tube ovarien ne comporte encore que le germarium et est au stade 1. La taille du premier follicule de certains des tubes ovariens externes augmente légèrement à mesure que les NCN augmentent de volume par endoduplication. Les cellules folliculaires commencent à s'accumuler autour des blastocystes.

10 jours : Les blastocystes ont augmenté de volume et les 16 cellules sœurs sont séparées des ovogonies environnantes présentes dans la partie médiane du germarium par une membrane distincte. Le volume des 16 cellules sœurs est identique et l'ovocyte ne peut donc se différencier des cellules nourricières. La faible coloration des NCN indique le taux d'endomitose. Le premier follicule est prêt à se séparer du germarium.

11 jours : Chaque tube ovarien comporte un follicule en cours de développement et un germarium. Le premier follicule, de forme circulaire et qui se sépare du germarium au stade 2, est toujours attaché par un ensemble de cellules folliculaires. Le premier follicule est composé de 16 cellules sœurs de taille égale qui sont entourées par une membrane épithéliale commune. La membrane épithéliale contient quelques cellules folliculaires mitotiquement actives. Le germarium est au stade 1.

12 jours : Les tubes ovariens sont disposés de manière compacte et s'enrichissent de corps adipeux. Chaque tube ovarien contient deux follicules et un germarium. Le volume du premier follicule (Tableau I) grossit encore et entre dans le stade 3 du premier cycle ovarien avec 5 paires de chromosomes de couleur foncée. Le deuxième cycle ovarien, qui est en fin de stade 1 dans le deuxième

follicule, commence à se distinguer des ovogonies par une ligne de séparation peu marquée. Le germarium, de forme allongée, est composé de blastocystes et d'ovogonies et de cellules souches mitotiquement actives.

13 jours : A l'extrémité distale, les tubes ovariens se scindent progressivement à mesure que le premier follicule se développe. Le premier follicule entre dans le stade 4. Cependant, quelques premiers follicules sont encore en fin de stade 3. Chez quelques tubes ovariens, le deuxième follicule s'est détaché du germarium au stade 2, les autres contiennent des chromosomes polytènes généralement présents au stade 3. Le troisième follicule est présent à la partie distale du germarium au stade 1 et séparé des autres cystocytes par une ligne peu marquée.

Les cellules souches sont actives ; les ovogonies résultantes sont présentes dans la région antérieure du germarium et les cystocytes sont visibles dans la région médiane du germarium. La mitose active des ovogonies est évidente du fait de la métaphase et de l'anaphase dans l'ensemble du germarium.

14 jours : A cet âge, les ovaires des pupes âgées de 14 jours sont encore immatures. Les tubes ovariens sont maintenant totalement dissociés les uns des autres. Chaque tube ovarien contient trois follicules en cours de développement, un germarium avec un autre follicule dans la région postérieure.

Le processus endomitotique se termine dans les noyaux des cellules nourricières du premier follicule et l'accumulation concomitante du vitellus a commencé à partir de la région postérieure de l'ovocyte en cours de développement. A la fin du 14^e jour, le follicule entre dans le stade 6. Dans le deuxième follicule, les NCN contiennent des chromosomes de type polytène au stade 4. Le troisième follicule se sépare du germarium au stade 2. Le quatrième follicule est situé dans la partie postérieure du germarium. Les NCN de ce follicule ne se colorent pas et apparaissent sous forme de cellules transparentes. De plus, ce follicule est séparé des cystocytes adjacents par une ligne de séparation peu marquée. Le germarium est au stade 1.

Ovaire de la mouche adulte (Fig. 3) âgée de :

4 heures : La mouche uzi sortie d'émergence contient des ovaires immatures. Chaque tube ovarien est composé de quatre follicules indépendants en cours de développement et d'un jeune follicule dans la partie postérieure du germarium. La vitellogenèse se poursuit jusqu'au quart du volume du premier follicule et la portion restante du follicule est remplie de NCN. Les NCN contiennent de la chromatine uniformément répartie. Le deuxième follicule contient des NCN à différents degrés de maturité. Le noyau de l'ovocyte occupe la majeure partie de la portion antérieure du follicule et prend un aspect opaque visible. Les NCN du troisième follicule contiennent des chromosomes polytènes allongés. Le noyau de l'ovocyte n'est pas visible. Tous les blastocystes sont recouverts d'une seule couche de cellules folliculaires de couleur foncée. Durant cette période, le quatrième follicule se détache du germarium. Au début de l'endomitose, les noyaux des cellules nourricières se colorent légèrement. Le cinquième follicule, au stade 1, est séparé du cystocyte adjacent par une ligne peu marquée dans le germarium. Quelques cellules folliculaires s'accumulent autour de ce follicule, situé dans la partie basale du germarium. Le germarium est composé uniquement d'ovogonies et de cystocytes.

12 heures : Dans les ovaires immatures, chaque tube ovarien contient 4 à 5 follicules en cours de développement et un germarium.

Du fait de l'accumulation de vitellus dans le premier follicule de la moitié au tiers de son volume total, les cellules nourricières sont repoussées vers la partie antérieure de l'oeuf. Les cellules folliculaires migrent de manière centrifuge pour séparer la poche ovocytaire de la poche nourricière. Le deuxième follicule contient des NCN comportant du matériel chromatinien uniformément réparti. Le noyau de l'ovocyte, maintenant apparent, présente une propriété de coloration Feulgen négative et conserve la forme d'une structure sphérique transparente. Dans le troisième follicule, les NCN postérieurs contiennent des chromosomes polytènes dissociés, tandis que les NCN antérieurs contiennent des chromosomes polytènes non bandés à brins. Le quatrième follicule contient des chromosomes polytènes primaires à brins dans la plupart des noyaux de cellules nourricières.

Cependant, le noyau de l'ovocyte ne se distingue pas des blastocystes. Le cinquième follicule, au stade 2, se détache du germarium dans le vortex externe des tubes ovariens, tandis que le follicule correspondant du vortex interne se situe toujours dans la partie basale du germarium et présente les événements observés au stade 1. Le germarium est allongé et contient uniquement des ovogonies.

24 heures : A ce stade, on observe des ovaires matures, chaque ovaire contenant des tubes ovariens facilement détachables. Chaque tube est pourvu de trachéoles sur toute sa longueur et contient sept follicules en cours de développement et un germarium.

Dans le premier follicule, le vitellus occupe plus des trois-quarts du volume total. Les NCN en dégénérescence sont présents sur une petite portion antérieure du follicule. Chez quelques oeufs, l'endochorion sécrété par les cellules folliculaires apparaît sous la forme d'une ligne peu marquée entre le vitellus et les cellules folliculaires. Le volume du follicule augmente en même temps que le contenu en vitellus. Le follicule est au stade 12. Le deuxième follicule s'est rempli de vitellus jusqu'à la moitié de son volume total (stades 7 à 8) et le noyau de l'ovocyte devient distinct à l'extrémité antérieure de l'ovocyte. Les NCN sont toujours en phase d'endoduplication, ce qui entraîne une augmentation de leur volume. Dans le troisième follicule, tous les NCN sont disposés de manière concentrique et entourés par une seule couche de cellules épithéliales. Ce follicule passe d'une forme sphérique à une forme ovale. Les NCN contiennent des chromosomes polytènes dissociés. Le noyau de l'ovocyte, incolore, devient distinct des NCN de couleur foncée à l'extrémité postérieure du follicule. Dans le quatrième follicule, les NCN contiennent des chromosomes polytènes dissociés, tandis que les NCN antérieurs contiennent des chromosomes polytènes à brins, comme au stade 4 du premier cycle ovarien. Les NCN du cinquième follicule contiennent des chromosomes polytènes non bandés à brins. Le noyau de l'ovocyte ne se distingue pas du groupe des cellules nourricières. Les cellules folliculaires entourent le follicule sphérique.

Le sixième et le septième follicules sont encore présents dans la région distale du germarium en fin de stade 1. Leur volume et leur taille sont présentés dans le tableau 1. On observe une ligne de séparation peu marquée entre ces follicules et les autres cystocytes. Les régions antérieure et médiane du germarium contiennent respectivement des ovogonies et des blastocystes mitotiquement actifs.

48 heures : Les mouches âgées de deux jours possèdent un oeuf entièrement développé et un germarium.

Le premier follicule est entièrement développé et possède tous les appendices nécessaires. Chaque oeuf est de forme ovale avec une extrémité antérieure légèrement rétrécie et une extrémité postérieure large. Le vitellus de couleur claire est entouré par une couche mince de cytoplasme transparent sur laquelle est présent un chorion transparent à l'intérieur du rudiment de couche épithéliale squameuse folliculaire. L'oeuf, en stade 14, est prêt pour l'oviposition.

Les NCN pycnotiques sont visibles dans la région antérieure du deuxième follicule, qui est en stade 12. Une ligne peu marquée d'endochorion sépare la masse de vitellus de l'épithélium folliculaire. Le troisième follicule est en stade 9 à 10. Chaque follicule est rempli à la moitié ou aux deux tiers de vitellus.

Le quatrième follicule est en stade 6. La chromatine est répartie uniformément dans la totalité des noyaux des cellules nourricières. Dans le cinquième follicule, la chromatine est répartie uniformément dans les NCN postérieurs et on observe des chromosomes polytènes à brins dans les NCN antérieurs. Ce follicule est en stade 5 du cinquième cycle ovarien.

Dans le sixième follicule, 5 paires de chromosomes sont visibles dans les NCN. Le noyau de l'ovocyte ne se distingue pas des NCN. Les blastocystes sont recouverts d'une seule couche de cellules folliculaires. Ce follicule présente le comportement observé en stade 2 du premier cycle ovarien.

Le septième follicule présente également le comportement observé en stade 2 du développement ovarien. Dans cet organe, toutes les cellules soeurs sont de taille égale et sont entourées par une membrane épithéliale commune de cellules folliculaires. Lorsque l'endomitose commence dans les NCN, la chromatine Feulgen positive devient distincte.

Le huitième follicule est encore attaché au germarium et en fin de stade 1. Le neuvième follicule est également visible dans le germarium du fait de l'apparition d'une ligne de séparation peu marquée.

Ce follicule comporte uniquement des blastocystes en stade 1 du développement ovarien. Le germarium ne contient que des ovogonies mitotiquement actives.

72 heures : Les ovaires sont matures et comportent des tubes ovariens libres ; chaque tube contient 3 oeufs entièrement développés et un germarium.

Les trois premiers follicules sont entièrement développés et sont prêts pour l'oviposition. Les cellules folliculaires rudimentaires sont encore visibles dans la gaine ovarienne.

Le quatrième follicule se situe entre les stades 11 et 13 de l'ovogenèse. La majeure partie de ce follicule est remplie de vitellus et, de ce fait, les NCN en dégénérescence sont repoussés vers la partie antérieure du follicule. L'endochorion sécrété par les cellules folliculaires sépare le vitellus des cellules folliculaires par une ligne peu marquée. Le cinquième follicule est en stade 6 du développement de l'oeuf.

Le sixième follicule est en fin de stade 3 du développement de l'oeuf. Le noyau de l'ovocyte et les NCN sont entourés par une couche de membrane épithéliale composée de cellules folliculaires. Tous les NCN contiennent de la chromatine uniformément répartie.

Le septième follicule est de forme circulaire. Tous les NCN ont atteint une ploïdie maximale, faisant apparaître des chromosomes polytènes à brins. La différenciation entre le noyau de l'ovocyte et les NCN est difficile.

Le huitième follicule présente un comportement similaire à celui observé en début de stade 3. Les NCN contiennent des chromosomes polytènes à brins et sont moins distincts que dans le septième follicule.

Le neuvième follicule se sépare du germarium, en stade 2 dans quelques tubes ovariens présents dans le vortex externe de l'ovaire. Par contre, dans le vortex interne des tubes ovariens, le follicule est encore attaché à la région basale du germarium et est en fin de stade 1. Ce follicule contient quelques cellules folliculaires de couleur foncée.

Le dixième follicule est présent dans la région basale du germarium et est composé de NCN et d'un noyau d'ovocyte non différenciés. Ce follicule est séparé des cystocytes adjacents par une ligne peu marquée. Le germarium possède encore un follicule séparé du cystocyte adjacent par une ligne peu marquée.

96 heures : Chaque tube ovarien est composé de quatre ovocytes arrivés à maturité, sept oeufs en cours de développement et un germarium.

Les quatre premiers oeufs sont matures et prêts pour l'oviposition. Le volume de ces ovocytes matures est présenté dans le tableau 1.

Dans le cinquième follicule, le vitellus s'est déposé sur une petite portion du pôle postérieur ; ce follicule est en stade 7.

La forme du sixième follicule est passée de circulaire à ovale en raison du début de l'accumulation de vitellus. Les cellules nourricières contiennent des noyaux à différents degrés de maturité du stade 5 du premier cycle ovarien.

Les NCN du septième follicule contiennent des chromosomes polytènes en voie de dissociation et sont en fin de stade 3 du premier cycle ovarien. L'ovocyte ne se distingue pas des blastocystes. Les cellules folliculaires sont mitotiquement actives et leur nombre augmente.

Dans le huitième follicule, les NCN contiennent des chromosomes polytènes non bandés et présentent le comportement observé en stade 3 du premier cycle ovarien. Le neuvième follicule contient 16 blastocystes entourés par des cellules folliculaires de couleur foncée. Les NCN de ce follicule présentent un début d'endomitose. Le dixième follicule, maintenant en début de stade 2 du premier cycle ovarien, se sépare du germarium.

Le onzième follicule est situé à la région basale du germarium et en stade 1. La région médiane du germarium contient des cystocytes tandis que la région antérieure contient uniquement des ovogonies.

120 heures : A ce stade, chaque tube ovarien est composé de quatre oeufs entièrement développés, huit follicules en cours de développement et un germarium.

Les quatre premiers ovocytes sont complètement développés et prêts pour l'oviposition. Les mesures volumétriques de ces oeufs sont présentées dans le tableau 1.

Dans le cinquième follicule, en stade 8, le vitellus occupe le quart du volume total. Le sixième follicule contient une petite quantité de vitellus au pôle postérieur, comme au stade 6.

Le septième follicule présente une caractéristique similaire à celle observée au stade 4. Dans les NCN postérieurs, les chromosomes polytènes à brins sont complètement dissociés en chromatine constituante et sont également répartis. En revanche, dans les NCN médians et antérieurs, on observe des chromosomes de type polytène. Le nombre de cellules folliculaires autour du complexe ovocyte-cellules nourricières a augmenté par suite des divisions mitotiques.

Les NCN du huitième follicule contiennent une masse de cinq groupes de chromosomes ; ce qui indique que l'endomitose n'a pas encore atteint une ploïdie maximale pour former des structures polytènes.

Le neuvième et le dixième follicules présentent la même caractéristique qu'au stade 2, bien qu'ils soient séparés du germarium.

Le onzième et le douzième follicules, en stade 1, sont encore dans le germarium mais sont séparés l'un de l'autre par une membrane.

144 heures : Tous les tubes ovariques présentent la même caractéristique mais à un stade avancé par rapport aux mouches âgées de 5 jours.

DISCUSSION

L'étude décrite ici permet de démontrer que le processus du développement de l'oeuf est pratiquement synchrone dans les 120 tubes ovariques, comme cela a été démontré chez d'autres diptères polytrophiques (King, 1957 ; Bonhag, 1958 ; Goodman et coll., 1968 ; Telfer, 1975), bien que le taux de croissance et la vitesse de maturation présentent des variations. Cette étude révèle également que la vitesse du développement des ovaires chez la mouche uzi est légèrement plus rapide que chez *Drosophila* et bien plus rapide que chez *Musca* (Goodman et coll., 1968) et chez *Calliphora* (Bonhag, 1958). Le volume de l'ovaire est multiplié par 86,99 chez *E. bombycis* (*sorbillans*), contre 60 chez *Cochliomyia hominivorax* (LaChance et Bruns, 1963) et 70 chez *M. domestica* (Goodman et coll., 1968). Chez *Calliphora*, *Musca* et *Cochliomyia*, trois follicules au maximum se développent en même temps dans une ovariole au cours du stade de maturité sexuelle, chez *Drosophila* il y a six ou sept follicules, tandis que la mouche uzi possède 9 à 10 follicules présentant tous un développement uniforme dans la plupart des ovarioles. Compte tenu de ces différences, on suppose que la mouche uzi dispose d'un potentiel de reproduction plus élevé que les autres diptères. La population de mouches uzi se reproduit et se répartit donc en grandes quantités sur un laps de temps court en tirant partie de la présence continue de son hôte pendant toute l'année.

Le fait que l'endomitose ne commence pas avant la formation d'une ligne de séparation peu marquée entre les ovogonies et les blastocystes dans les ovaires des pupes âgées de sept jours constitue l'une des caractéristiques intéressantes observée dans cette étude. Dès que l'endomitose commence dans le premier follicule des pupes d'*E. bombycis* âgées de huit jours, la nature polyténique apparaît chez les NCN des pupes âgées de 12 jours et l'endomitose se termine avec la déspréparation des chromosomes polytènes 24 heures avant l'émergence, soit 3 à 4 jours après le début de l'endomitose. Ce phénomène permet aux NCN d'échapper aux effets des agents utilisés pour l'induction de la stérilité au stade adulte. Chez *C. hominivorax* (LaChance et Bruns, 1963 ; LaChance et Leverich, 1968), l'endomitose est terminée dans les 24 heures qui suivent l'éclosion en passant au moins trois jours après le début de l'endomitose. LaChance et Bruns (1963) se sont donc intéressés aux premiers stades de croissance, stades auxquels la radiosensibilité est plus élevée. Compte tenu de ces observations, toutes les pupes uzi âgées de 10 à 12 jours, qui possèdent des ovaires en stade 2 et avant l'apparition de la phase polytène chez les NCN, devraient être exposées à des agents physiques ou chimiques, afin d'assurer une stérilité maximale. Les oeufs passés en stade 3 au moment de l'application d'alkylants ou de radiations se développent normalement.

Chez la mouche uzi, le développement du premier et du deuxième ovocyte du stade 1 au stade 14 prend environ 6 jours, tandis que le troisième et le quatrième atteignent le stade 14 en 4 jours

seulement. Chez la mouche commune, les ovocytes passent du stade I au stade 14 en moins de 4 à 5 jours (Goodman et coll., 1968). Le développement rapide du troisième et du quatrième follicule est stimulé par l'accouplement de la mouche femelle. Au stade de maturité sexuelle, seulement 4 oeufs sont prêts pour l'oviposition et le développement des autres ovocytes est inhibé. Sur la base de ces données, on peut en déduire que les follicules produits avant l'éclosion seront stimulés par les mouches mâles, se développeront rapidement et seront matures 3 jours après l'éclosion. Dans l'intervalle, les autres follicules détachés du germarium après l'éclosion se développent progressivement jusqu'à trois jours après l'éclosion ; leur développement s'arrêtant cinq jours après l'éclosion. Ce phénomène nous conduit à penser que l'accouplement des mouches joue un rôle dans la sécrétion des hormones ovostatiques et stimule la vitellogenèse, comme cela a été observé chez *D. silvestris* par Craddock et Boake (1992). Cette stimulation est également sélective car seuls les quatre premiers oeufs présentent un développement rapide tandis que le développement des autres oeufs est inhibé.

Ces résultats montrent clairement que le développement des oeufs chez *E. bombycis* se caractérise par des événements chromosomiques et cellulaires variés qui pourraient être régulés par des facteurs génétiques, hormonaux, chimiques et environnementaux, comme l'ont établi LaChance et coll. (1968). Sur la base de ces résultats, nous proposons deux approches pour lutter contre ce parasite diptère économiquement important.

La première approche consiste à traiter les asticots post-parasites qui contiennent uniquement des lignées cellulaires germinales dans leurs ovaires à l'aide d'agents chimiques et/ou physiques appropriés afin d'inhiber la poursuite du développement des oeufs. Le complexe de cellules nourricières et d'ovocyte étant formé à partir des cellules germinales, la destruction provoquée durant la formation et la différenciation des blastocystes ne permet pas le développement normal des oeufs ; par ailleurs, les ovaires étant encore à un stade immature, une concentration faible d'alkylants pourrait suffire pour obtenir une stérilité complète.

La deuxième approche consiste à traiter les pupes uzi à l'une des périodes appropriées mentionnées ici. L'exposition des pupes uzi au stade I (4 à 10 jours) à divers agents stérilisants chimiques provoquant la mort des gonies les empêchent de former un cystocyte normal et l'exposition des pupes à des agents physiques qui inhibent les chromosomes des cellules nourricières au stade 3 (chez les pupes âgées de 10 à 12 jours) et arrêtent l'endoduplication et la synthèses des nucléoprotéines servant à développer les ovocytes nécessaires au développement embryonnaire.

STUDIES ON *ASPERGILLUS* DISEASE OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

C.S. PATIL, M. KRISHNA, P. SHARADAMMA & S.B. DANDIN

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

The distribution of Aspergillus sp. in the rearing environment and the pathogen dose response to different ages of silkworms were studied. A total of 207 samples of dust and faecal materials were collected from silkworm rearers' places in Karnataka and analysed. Aspergillus fungi were detected at the rate of 64.64 and 55.29% in the dust and faecal materials respectively. The results of the infection of different doses of pathogen suspension to different ages of silkworms suggest that resistance to infection increased with the larval age. Analysis of variance between pathogen load and mortality due to infection indicates that mortality depends on the pathogen load.

Keywords: *Aspergillus*, *Bombyx mori*, susceptibility, distribution.

INTRODUCTION

Aspergillosis, a fungal disease caused by a number of *Aspergillus* fungi, has been considered as an important silkworm disease in Japan. More than ten species of *Aspergillus*, e.g., *Aspergillus flavus*, *A. oryzae* var. *flavus*, *A. flavipes*, *A. nidulans*, *A. elegans* and *A. parasitica*, have been found to infect silkworms in Japan (Kawakami, 1982). This disease is also prevalent in tropical countries like Thailand, Indonesia, Vietnam and Sri Lanka. Recently, two species, *A. tamarii* (Devaiah *et al.*, 1983) and *A. flavus* (Patil, 1989), infecting the mulberry silkworm, *B. mori*, have been reported from India. Susceptibility of different breeds of silkworms to *Aspergillus* (Kawakami, 1975; Narayanaswamy and Govindan, 1989) and susceptibility among larval instars (Aoki *et al.*, 1972; Chinnaswamy and Devaiah, 1987; Kawakami and Mikuni, 1973) have been studied. Perusal of literature revealed no information on the age-specific pathogen dose susceptibility of silkworms to *Aspergillus*. The pathogen dose response relationships are important in the evaluation, both epizootiological and control studies (Feng and Carruthers, 1985). In India such studies on *Aspergillus* diseases are scarce.

Furthermore, rearing of young age (chawki) silkworms requires high temperature (27-28 °C) and high humidity (85-95%) and, in fact, these conditions are also favourable for the growth and multiplication of *Aspergillus* fungi (Kawakami, 1982). But there are no detailed studies in India on the level of distribution of *Aspergillus* fungi in the rearing environment and on infection rates. Perhaps it appears that major loss due to diseases during chawki rearing is due to aspergillosis. Therefore, in this study, besides the survey on distribution of *Aspergillus* in the natural environment, the infection effect of different pathogen loads/doses on different ages of silkworms were studied.

MATERIALS AND METHODS

Distribution of *Aspergillus* fungus:

For studying the distribution of *Aspergillus* fungi in the rearing environment, dust and faecal material samples were collected from the rearing room, floors and rearing trays from rearers of different villages in Karnataka. One gram of dust/faecal material sample collected was dissolved in

sterilised water and allowed to settle for 20-30 minutes and later filtered through a nylon bolting cloth. One ml of filtrate was inoculated into Sabourad dextrose agar medium containing yeast extract (SDA + Y) and cultured according to the procedure of Thomas (1974). The cultures were incubated at 28 ± 1 °C temperature and $85 \pm 5\%$ relative humidity for 72 hours. The identification of *Aspergillus* sp. was based on cultural characters and microscopic examinations. The spore concentration was counted using Neubauer haemocytometer.

Age-specific susceptibility:

The spores of *A. flavus*, identified by the Mycological Institute, London, (Patil, 1989) were obtained from pure cultures. For collecting the spores, 5 ml of sterile water was added per culture plate and shaken for 5 minutes. Then the spore suspension was collected and stored at 5 °C. The stock suspension containing 5.7×10^6 spores/ml was serially diluted, i.e. 10^{-1} to 10^{-5} . Three ml of each concentration was sprayed using a glass atomiser once over 50 bivoltine silkworms (NB4D2) just out of moult at each instar.

After infection, the larvae were reared as per the standard methods, at a rearing temperature of 25 to 28 °C and relative humidity of 85 to 90%. To maintain the required temperature and humidity, an electrical heater and aerosol humidifiers were used. First instar silkworms being too small for counting, the egg sheets were divided into four parts and were incubated separately. After hatching, the young larvae were sprayed with the pathogen suspension described above. The number of larvae used during the first instar was computed by counting hatched eggs. For each treatment, four replications were maintained with suitable control batches. The experiment was conducted for all five instars of silkworms and repeated three times. Observations were made on the development of external symptoms, larval mortality and cocoon harvests. Mortality of larvae due to pathogenic development/infection of the fungus was confirmed by observing the cadaver under the stereo-microscope. The data were subjected to statistical analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Silkworm faecal material and the dust in the rearing room offer a suitable substratum for the growth of this fungus, and hence its distribution has been studied. From a total of 207 samples analysed, the *Aspergillus* fungi were detected at the rate of 64.64% and 55.29% in the dust and faecal materials, respectively (Table I). The main species observed were *A. flavus*, *A. tamarii* and another remained unidentified. Among them, *A. flavus* was observed in the majority of samples. The high incidence of *Aspergillus* in the rearing environment may be due to the fact that it can grow saprophytically on the soil surface as well as on silkworm rearing appliances (Aoki, 1972). The spores under favourable conditions of humidity and temperature might have adhered to silkworms during rearing and become endemic (source for pathogen). Disinfection of the rearing house and appliances using 2-3% formalin solution is a routine practice for removal of pathogens from rearing places. The causes for the high rate of prevalence of *Aspergillus*, especially *A. flavus*, in the rearing area suggests that the existing disinfection process either may have been inadequate to kill all spores of *A. flavus* or that they might have become resistant to formalin, as suggested by Kawakami (1982). Perhaps, a detailed study on these aspects for eliminating this and other fungi is necessary.

During the study, the disease symptoms were studied in both young and adult silkworms after infecting them with *A. flavus*, as this information is lacking under local conditions. The young infected silkworms (first and second instars) stopped feeding and their caudal end shrunk. Later, the larvae died within 24 hours of infection. The mortality due to *Aspergillus* infection was confirmed by examination of the cadavers under stereo-microscope (Fig. 1). The dead larvae remained at the bottom of the rearing bed, and also it was difficult to locate them as the dead larvae get mixed up with bed refuse. During regular rearings, it is generally difficult to attribute the reason(s) for the death because the young larvae are too small and external symptoms were not clear/prominent. The dead larvae go unnoticed along with the bed refuse and hence the mortality information during chawki

Table I. Distribution of *Aspergillus* fungi in the rearing environment.**Tableau I. Répartition des champignons *Aspergillus* dans l'environnement d'élevage.**

Places	Dust samples			Faecal materials		
	Examined	<i>Aspergillus</i> present	Percentage	Examined	<i>Aspergillus</i> present	Percentage
Sites	Echantillons de poussière			Matières fécales		
	Examinés	<i>Aspergillus</i> présents	Pourcentage	Examinés	<i>Aspergillus</i> présents	Pourcentage
Sidlaghatta	12	4	33.33	7	3	42.85
Mallur	NA	NA	NA	8	5	62.5
Vokkaleri	18	9	50.0	26	8	30.76
Anekal	17	11	64.7	15	9	60.00
Kunnigal	52	40	76.92	52	34	69.38
Total	99	64	64.64	108	60	55.29

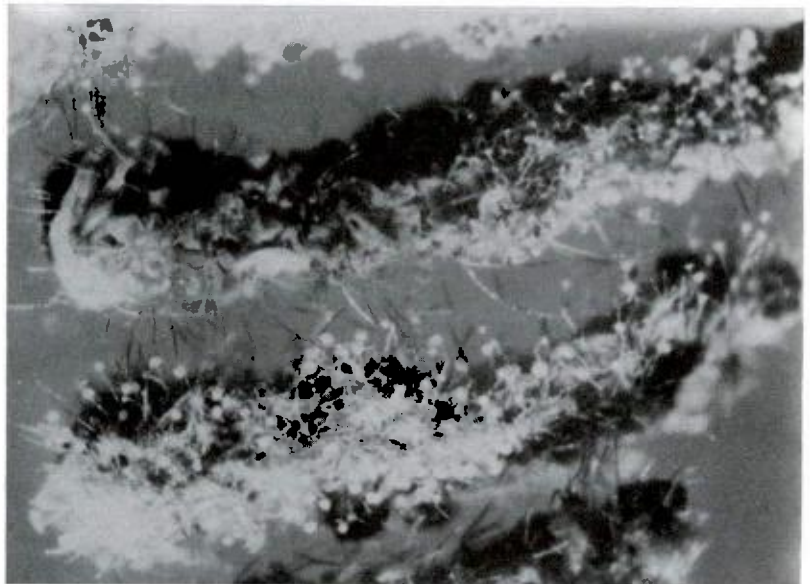
NA: Not available / Données non disponibles.

Fig. 1: Young silkworm larvae out of first moult infected with *A. flavus*.

Magnification: 150 ×.

Fig. 1 : Jeunes larves de vers à soie en sortie de première mue infectées avec *A. flavus*.

Grossissement : 150 ×.



rearing is scanty as compared to adult age. On the other hand, the symptoms were clear in adult larvae; large black spots appeared at the infection site over the silkworm body surface and the death occurred rapidly within 24-48 hours. After death, the corpses became hardened at the site of fungal penetration,

and the rest of the body remained soft. Later, the body turned black due to multiplication of secondarily infecting bacteria and the aerial hyphae developed with conidia and conidial spores of the fungus (Fig. 2). The reason for the mortality of silkworms due to infection by *A. flavus* has been attributed to the production of aflatoxin by the fungus (Murakoshi, 1977).

Table II. Dosage mortality responses in different ages of silkworms.

Tableau II. Mortalité en fonction de la dose à différents âges chez le ver à soie.

Instar	Spore load	Larval mortality % ± SD
Age	Concentration en spores	Mortalité larvaire % ± écart type
I	Stock / Solution de base	5.7×10^6
	10^{-1}	49.16 ± 13.69
	10^{-2}	28.18 ± 14.47
	10^{-3}	11.98 ± 2.92
	10^{-4}	1.79 ± 0.85
	10^{-5}	0.83 ± 0.92
II	Stock / Solution de base	5.7×10^6
	10^{-1}	49.16 ± 13.69
	10^{-2}	28.18 ± 14.47
	10^{-3}	11.98 ± 2.92
	10^{-4}	1.79 ± 0.85
	10^{-5}	0.83 ± 0.92
III	Stock / Solution de base	5.7×10^6
	10^{-1}	32.0 ± 7.87
	10^{-2}	14.5 ± 6.06
	10^{-3}	2 ± 1.41
	10^{-4}	1.5 ± 1.66
	10^{-5}	0.5 ± 0.86
IV	Stock / Solution de base	5.7×10^6
	10^{-1}	10.7 ± 4.55
	10^{-2}	4.0 ± 3.74
	10^{-3}	2.0 ± 2.45
	10^{-4}	0.0
	10^{-5}	0.0
V	Stock / Solution de base	5.7×10^6
	10^{-1}	2.5 ± 2.18
	10^{-2}	1.50 ± 1.66
	10^{-3}	0.0
	10^{-4}	0.0
	10^{-5}	0.0



Fig. 2: Carcasses of adult silkworm larvae infected with *A. flavus*.

Fig. 2 : Cadavres de larves de ver à soie adultes infestées avec *A. Flavus*.

Table III. Analysis of variance: effect of pathogen infections on the age of silkworms.

Tableau III. Analyse de variance : effet de l'infestation par l'agent pathogène en fonction de l'âge des vers à soie.

Instar	Larval mortality (mean values)
Age	Mortalité larvaire (valeurs moyennes)
I	7.71
II	4.21
III	1.38
IV	0.33
V	0.21
'F' test / Test F	S
CD at 5%	5.0
CD at 1%	6.82

The data presented in Table II show the total larval mortality in percentages in each instar at different levels of pathogen infection. The larval mortality was high in the first and second instars, indicating their susceptibility to the pathogen. The fungi infected all ages of larvae; however, the resistance to infection increased as the age of larvae advanced. The susceptibility of different ages (instars) of silkworms was analysed using ANOVA test (Table III). The results indicate a significant difference in susceptibility between the instars, and the first instar larvae were highly susceptible ($P > 0.01$) to infection, followed by the second instar. These findings indicate that this disease is a serious threat to young larvae and confirm the observations of Kawakami and Mikuni (1973). The

present investigation provides the information that the host age serves as a determinant of the infection rate. Further, the reasons for the mortality rate difference among the instars although not entirely clear, the low mortality/resistance to the infection of old-age larvae was probably due to the fact that in older larvae the cuticle/integument becomes thick and, thereby less amenable for attachment/penetration of the fungus. Koidsumi (1957) demonstrated the presence of immunity in the silkworm due to its cuticular lipids.

The data for pathogen dosage related to mortality at different ages of silkworm larvae subjected to statistical analysis are presented in Table IV. It was observed that the mortality of larvae was significantly high for the pathogen load 5.7×10^6 ($P > 0.01$) and for the next 10 fold dilutions. As the pathogen number (dose) decreased, the mortality also decreased. From this study it was concluded that two factors, i.e., pathogen load and age of the host, determine the susceptibility of larvae. The ANOVA conducted to determine the pathogen dose-related variations in susceptibilities among different doses of pathogens showed a significant relation ($P > 0.01$).

Table IV. Analysis of variance: effect of pathogen load on silkworms.

Tableau IV. Analyse de variance : effet de la concentration en agents pathogènes sur le ver à soie.

Spore load	Larval mortality (mean values)
Concentration en spores	Mortalité larvaire (valeurs moyennes)
Stock solution / Solution de base (5.7×10^6)	9.55
10^{-1}	4.90
10^{-2}	1.60
10^{-3}	0.40
10^{-4}	0.15
10^{-5}	0.0
'F' test / Test F	S
CD at 5%	5.48
CD at 1%	7.47

In summary, this study revealed that:

1. *Aspergillus* is ubiquitous in the silkworm rearing environment, and might become a serious threat to young-age silkworms even in tropical countries.
2. The older larvae exhibit some degree of resistance to the infection.
3. There appears to be a correlation between high incidence of infection in the larvae and the spore load in the environment.

REFERENCES

- AOKI (1971) Silkworm disease in Thailand. Bull. Thai Sericult. Res. Train. Center, 1, 102-108.
- AOKI, WADEE L., SINGISARI N. (1972) On silkworm disease, especially pebrine and *Aspergillus* disease found in 1971. Bull. Thai Sericult. Res. and Train. Center, 7, 72-76.
- CHINNASWAMY K.P., DEVAIAH M.C. (1984) Susceptibility of different races of silkworm, *Bombyx mori* L., to *Aspergillo*sis caused by *Aspergillus tamari* Kita. Sericologia, 24, 513-517.
- DEVAIAH M.C., RAJASHEKARGOWDA R., CHINNASWAMY K.P. (1982/83) A new fungal pathogen, *Aspergillus nidulans*, on the Eri silkworm, *Samia cynthia ricini* (Lepidoptera: Saturniidae). Indian J. Seric., 21-22, 71-72.
- DEVAIAH M.C., CHINNASWAMY K.P. (1983) *Aspergillo*sis of silkworm, *B. mori* L., caused by *Aspergillus tamari*. Natl. Semin. Silk Res. Dev., Bangalore p. 77 (Abstract).
- FENG Z., CARRUTHERS R.I. (1985) Age-specific dose mortality effects of *Beauveria bassiana* (Deuteromy-cotina: Hyphomycetes) on the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). J. Invertebr. Pathol., 46, 259-264.
- KAWAKAMI K. (1973) Fungicidal activity of some cationic surfactants and quaternary ammonium salts on *Aspergillus* fungi attacking the silkworm larvae. Sanshi kenkyu (Acta Sericologica), 88, 114-127.
- KAWAKAMI K., MIKUNI T. (1973) Studies on the causative fungi of *Aspergillus* disease of the silkworm larvae. II. Resistance to mercuric fungicides and susceptibility in each larval stage of the silkworm to the infection of *Aspergillus* isolates collected from co-operative rearing houses of young silkworm larvae. Bull. Sericult. Exp. Sta., 26, 58-77.
- KAWAKAMI K., MIKUNI T. (1969) Studies on the causative fungi of *Aspergillus* disease of the silkworm larvae. I. Pathogenicity to the silkworm larvae and tolerance to formalin of *Aspergillus* isolates collected from co-operative rearing houses of young silkworm larvae. Bull. Sericult. Exp. Sta., 23, 327-370.
- KAWAKAMI K. (1975) On the easy detection method for *Aspergillus* fungi in silkworm rearing house by means of the stamp agar. J. Sericult. Sci. Japan, 44, 327-332.
- KAWAKAMI K. (1982) Causative pathogens of *Aspergillus* disease of silkworm and its control. JARQ, 15, 185-190.
- KOIDSUMI K. (1957) Antifungal action of cuticular lipids in insects. J. Insect Physiol., 1, 40-51.
- MURAKOSHI S. (1977) Productivity of Aflatoxins and some biological effects in *Aspergillus flavus* Link isolated from cadaver of the silkworm, *B. mori* L. Appl. Zool., 12(3), 255-259.
- NARAYANASWAMY T.K., GOVINDAN R. (1989) Comparative susceptibility of some breeds of silkworm, *Bombyx mori* L., to *Aspergillus flavus* Link. Sericologia, 29(1), 33-37.
- PATIL C.S. (1989) New record of fungal pathogen, *Aspergillus flavus* Link, on mulberry silkworm, *B. mori* L., from India. Curr. Sci., 58(12), 683.
- THOMAS (1974) Diagnostic Techniques in Insect Diseases. G.E. Cantwell Ed., Vol. I, p. 39, Marcel Dekker Inc., New York.

ETUDE DE L'ASPERGILLOSE CHEZ LE VER A SOIE *BOMBYX MORI* L.

C.S. PATIL, M. KRISHNA, P. SHARADAMMA & S.B. DANDIN

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

On a étudié la répartition d'Aspergillus dans le milieu d'élevage et l'effet de la dose d'agent pathogène à différents âges du ver à soie. On a prélevé et analysé un total de 207 échantillons de poussière et de matières fécales sur les sites d'élevage dans le Karnataka. Les champignons Aspergillus ont été détectés à raison de 64,64 % et de 55,29 % respectivement dans la poussière et les matières fécales. Les résultats obtenus pour l'inoculation de différentes doses de suspension pathogène à différents âges du ver à soie suggèrent que la résistance à l'infestation augmente en fonction de l'âge larvaire. L'analyse de variance entre la dose d'agent pathogène et la mortalité due à l'infestation indique que la mortalité dépend de la dose d'agent pathogène.

INTRODUCTION

L'aspergillose, maladie fongique causée par différents champignons *Aspergillus*, est considérée comme une maladie du ver à soie importante au Japon. Plus de dix espèces d'*Aspergillus*, parmi lesquelles *Aspergillus flavus*, *A. oryzae* var. *flavus*, *A. nidulans* et *A. parasitica*, infestant le ver à soie ont été observées au Japon (Kawakami, 1982). Cette maladie est également répandue dans certains pays tropicaux comme la Thaïlande, l'Indonésie, le Vietnam et le Sri Lanka. Récemment, deux espèces, *A. tamaritii* (Devaiah et coll., 1983) et *A. flavus* (Patil, 1989), infestant le ver à soie du mûrier *B. mori*, ont été observées en Inde. La sensibilité de différentes souches de ver à soie à *Aspergillus* (Kawakami, 1975 ; Narayanaswamy et Govindan, 1989) et la sensibilité à différents âges larvaires (Aoki et coll., 1972 ; Chinnaswamy et Devaiah, 1987 ; Kawakami et Mikuni, 1973) ont été étudiées. La lecture de la documentation révèle qu'on ne dispose d'aucune information sur la sensibilité à la dose d'agent pathogène *Aspergillus* en fonction de l'âge du ver à soie. L'évaluation des relations entre agent pathogène et effet du dosage est importante pour les études épizootiques et de lutte (Feng et Carruthers, 1985). En Inde, ce type d'études sur les maladies provoquées par *Aspergillus* est rare.

De plus, l'élevage des vers à soie aux premiers âges (chawki) nécessite une température (27 à 28 °C) et une humidité élevée (85 à 95 %), conditions qui sont en fait également favorables à la croissance et à la reproduction des champignons *Aspergillus* (Kawakami, 1982). Cependant, il n'existe en Inde aucune étude approfondie du degré de distribution des champignons *Aspergillus* dans le milieu d'élevage ou des taux d'infestation. Il semble que les pertes occasionnées par les maladies au cours de l'élevage des jeunes larves soient, pour une large part, dues à l'aspergillose. Cette étude porte donc sur la répartition d'*Aspergillus* dans le milieu naturel et sur l'effet de l'inoculation de différentes doses d'agents pathogènes à différents âges du ver à soie.

MATERIELS ET METHODES

Répartition du champignon *Aspergillus* :

Pour étudier la répartition des champignons *Aspergillus* dans le milieu d'élevage, des échantillons de poussière et de matières fécales ont été prélevés dans la pièce d'élevage, sur les

planchers et dans les litières chez des éleveurs de différents villages du Karnataka. Un gramme d'échantillon de poussière et/ou de matières fécales a été dissous dans de l'eau distillée et laissé reposer pendant 20 à 30 minutes puis filtré à travers un tamis en nylon. Un ml de filtrat a été inoculé sur un milieu sur agar de dextrose Sabourad contenant de l'extrait de levure (SDA + Y) et cultivé selon le protocole de Thomas (1974). Les cultures ont été incubées à une température de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ et une humidité relative de $85 \pm 5\%$ pendant 72 heures. *Aspergillus* sp. a été identifié d'après les caractères cultureux et les examens au microscope. La concentration en spores a été déterminée à l'aide d'un hémocytomètre Neubauer.

Sensibilité en fonction de l'âge :

Les spores d'*A. flavus* identifiées par le *Mycological Institute* de Londres (Patil, 1989) sont issues de cultures pures. Pour le prélèvement des spores, 5 ml d'eau stérile ont été ajoutés à chaque lame de culture et remués pendant 5 minutes. La suspension de spores a ensuite été prélevée et stockée à 5°C . La suspension de spores comprenant $5,7 \times 10^6$ spores/ml a été diluée en série de 10^{-1} à 10^{-5} . Trois ml de chaque concentration ont été vaporisés à l'aide d'un atomiseur en verre sur 50 vers à soie bivoltins (NB4D2) une fois en sortie de mue à chaque âge.

Après inoculation, les larves ont été élevées suivant les méthodes standard, à une température de 25 à 28°C et une humidité relative de 85 à 90% . Afin de maintenir la température et l'humidité requises, un radiateur électrique et des humidificateurs en aérosol ont été utilisés. Les larves du premier âge étant trop petites pour être comptées, les cartons de ponte ont été divisés en quatre parties et incubés séparément. Après l'éclosion, les jeunes larves ont été traitées avec la suspension d'agent pathogène décrite ci-dessus. Le nombre de larves du premier âge utilisées a été déterminé en comptant les oeufs éclos. Pour chaque traitement, quatre réplicats ont été maintenus avec des lots témoins correspondants. L'expérience a été réalisée pour les cinq âges du ver à soie et répétée trois fois. Les observations portent sur le développement des symptômes externes, la mortalité larvaire et la récolte de cocons. La mortalité des larves due au développement des agents pathogènes et/ou à l'inoculation du champignon a été confirmée en observant les cadavres à la loupe. Les données ont été soumises à une analyse statistique.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les matières fécales des ver à soie et la poussière de la pièce d'élevage constituent un substrat propice à la croissance du champignon ; on a donc étudié sa répartition. Sur un total de 207 échantillons analysés, les champignons *Aspergillus* ont été détectés dans des proportions de $64,64\%$ et $55,29\%$ respectivement dans la poussière et dans les matières fécales (Tableau I). Les principales espèces observées sont *A. flavus*, *A. tamarii* et une autre espèce non identifiée. Parmi ces trois espèces, *A. flavus* a été observée dans la plupart des échantillons. L'incidence élevée d'*Aspergillus* dans le milieu d'élevage pourrait être due au fait que ce champignon peut pousser de manière saprophytique sur la surface du sol ainsi que sur les ustensiles d'élevage du ver à soie (Aoki, 1972). Dans ces conditions favorables de température et d'humidité, il se peut que les spores aient adhéré aux vers à soie au cours de l'élevage et soient devenues endémiques (source d'agent pathogène). La désinfection de la pièce et des ustensiles d'élevage avec une solution de formol à 2 ou 3 % est une méthode courante d'élimination des agents pathogènes dans les milieux d'élevage. Le taux élevé de l'incidence d'*Aspergillus*, en particulier *A. flavus*, dans la zone d'élevage suggère soit que le protocole de désinfection existant ne permet pas d'éliminer toutes les spores d'*A. flavus*, soit que celles-ci soient devenues résistantes au formol, comme le suggère Kawakami (1982). Une étude approfondie sur ces aspects de l'élimination de ce champignon ou d'autres est peut-être nécessaire.

Dans cette étude, les symptômes de la maladie ont été observés chez les larves jeunes et matures après inoculation avec *A. flavus* car on ne dispose pas d'informations sur cette question au niveau local. Les jeunes larves infestées (premier et deuxième âges) arrêtent de se nourrir et leur extrémité caudale se tasse. Les larves meurent dans les 24 heures qui suivent l'inoculation. La mortalité due à l'infestation par *Aspergillus* a été confirmée par examen des cadavres à la loupe (Fig. 1). Les larves mortes restent au fond de la litière d'élevage et il est difficile de les localiser car elles se mélangent aux déchets. Au cours des élevages habituels, il est généralement difficile de déterminer la ou les

cause(s) de la mortalité car les jeunes larves sont trop petites et les symptômes externes ne sont pas clairs/proéminents. Les larves mortes ne se distinguent pas des déchets de la litière, ce qui explique pourquoi la mortalité des jeunes âges est moins connue que celle des âges matures. En revanche, les symptômes sont évidents chez les larves matures : de grandes taches noires apparaissent au site d'infestation sur le corps de la larve et la mort survient rapidement, dans les 24 à 48 heures. Après la mort, les cadavres se durcissent au site de pénétration du champignon et le reste du corps reste mou. Le corps devient ensuite noir du fait de la multiplication secondaire de bactéries infectieuses, les hyphes aériens se développent avec des conidies et des spores de conidies fongiques (Fig. 2). La cause de la mortalité provoquée par l'infestation avec *A. flavus* chez le ver à soie a été attribuée à la production d'aflatoxine par ce champignon (Murakoshi, 1977).

Les données présentées dans le tableau II montrent les pourcentages de mortalité larvaire totale à chaque âge et en fonction de différentes doses d'agent pathogène. La mortalité larvaire est élevée chez les deux premiers âges ; ce qui indique qu'ils sont sensibles à l'agent pathogène. Le champignon infeste tous les âges larvaires ; cependant, la résistance à l'infestation augmente à mesure que les larves vieillissent. La sensibilité des vers à soie aux différents âges larvaires a été soumise à une analyse de variance (Tableau III). Les résultats obtenus révèlent que la sensibilité varie de manière significative en fonction des âges et que les larves du premier âge sont fortement sensibles ($P > 0,01$) à l'infestation, devant les larves du deuxième âge. Ces résultats indiquent que cette maladie constitue une menace sérieuse pour les jeunes larves et confirment les résultats de Kawakami et Mikuni (1973). L'étude présentée ici permet de démontrer que l'âge de l'hôte sert de déterminant du taux d'infestation. De plus, bien que les causes de la différence de mortalité entre les âges ne soient pas entièrement élucidées, la faible mortalité et/ou résistance à l'infestation des larves matures est probablement due au fait que la cuticule et/ou le tégument de ces larves sont plus épais et rendent ainsi plus difficile l'adhérence ou la pénétration du champignon. Koidsumi (1957) a démontré que l'immunité chez le ver à soie était due à ses lipides cuticulaires.

Les données concernant la relation entre la dose d'agent pathogène et la mortalité aux différents âges larvaires ont été analysées statistiquement et sont présentées dans le tableau IV. La mortalité des larves est fortement significative pour la dose de $5,7 \times 10^6$ ($P > 0,01$) et pour les dix dilutions suivantes. La diminution du nombre d'agents pathogènes (dose) entraîne une diminution de la mortalité. Sur la base de cette étude, on en conclut que deux facteurs, à savoir la dose d'agent pathogène et l'âge de l'hôte, déterminent la sensibilité des larves. L'analyse de variance réalisée afin d'évaluer les variations de sensibilité en fonction de la dose d'agent pathogène fait apparaître une relation significative ($P > 0,01$).

En résumé, cette étude révèle que :

1. *Aspergillus* est ubiquiste dans le milieu d'élevage du ver à soie et pourrait devenir une menace sérieuse pour les larves des jeunes âges même dans les pays tropicaux ;
2. les larves âgées présentent un certain degré de résistance à l'infestation ;
3. il semble qu'il y ait une corrélation entre l'incidence élevée de l'infestation chez les larves et la dose de spores dans le milieu d'élevage.

EFFECT OF PRUNING TIME ON THE NUTRITIVE VALUE OF *QUERCUS SERRATA* LEAVES, THE PRIMARY FOOD PLANT OF *ANTHERAEA PROYLEI* J., AND ITS IMPACT ON OAK TASAR SILKWORM REARING

M.K. GHOSH¹ & R.C. SRIVASTAVA²

1. Regional Tasar Research Station, Imphal - 795002, India.

2. Department of Life Sciences, Manipur University, Canchipur, Imphal - 795 003, India.

An experiment was conducted to establish the effect of pruning on the nutritive value of the leaves of Quercus serrata. Pruning resulted in a significant increase in the level of soluble protein, total sugar, total free amino acids, etc. Leaves from pruned plants fed to Antheraea proylei larvae resulted in a better rearing performance as compared to unpruned ones.

Keywords: *Quercus serrata*, pruning, *Antheraea proylei*, chemical constituents, oak tasar rearing.

INTRODUCTION

In India about 58 species of oak flora are distributed from Jammu and Kashmir in the west to Manipur in the northeast, all along the temperate and sub-Himalayan belt. Some of these species are utilized as food plants by the oak tasar silkworm, *Antheraea proylei*, and *Quercus serrata* is found to be the best among them. The quality as well as the quantity of *Q. serrata* leaves play a vital role in the production of good quality cocoons. Some workers have studied the effect of pruning on sprouting and growth behaviour of *Q. serrata* in relation to oak tasar silkworm rearing (Singh and Tikoo, 1989). In the present study foliar constituents of pruned and unpruned plants of *Q. serrata* were analysed and their suitability for rearing performance was also assessed.

MATERIALS AND METHODS

Five-year-old *Q. serrata* plants with 120 cm × 120 cm spacings were selected for this study. For pruning study the plants were drastically pruned in the month of December. The pruning was done with a crown of 15 cm long branches on the main stem at a height of 150 cm from the ground level. For unpruned sets the plants were defoliated at the time of natural defoliation. A total of 50 plants in a plot were pruned, out of which 10 plants were used for sampling of leaves for biochemical estimations and the remaining were used for rearing experiments. The same number of plants was used for the experiment on unpruned plants. From both pruned and unpruned plants medium leaves were taken for biochemical analysis. Leaf samples from each set of experiments were collected after 60 days of sprouting, oven-dried at 60 °C for 24 hr, then powdered and used for analysis.

The moisture content of fresh leaves was determined by the oven-dry method. The biochemical analysis included determination of chlorophyll (Arnon, 1949), total sugars (Plumer, 1982), total free amino acids (Yemm and Cocking, 1955) soluble protein (Lowry *et al.*, 1951), crude protein (Lang, 1958) and crude fat and crude fibre (A.O.A.C., 1984). The experiments for leaf analysis were repeated three times and the results were analysed statistically.

Outdoor rearing was carried out on both pruned and unpruned plants in 10 replications each. The experiments were repeated for three consecutive years.

RESULTS

Significant differences were observed in some leaf biochemical constituents such as total chlorophyll content, soluble protein, total free amino acids, total sugar content, crude protein and crude fat. However, the difference in moisture content was non-significant in the leaves of pruned plants as compared to unpruned ones. In the case of crude fibre, the level was significantly higher in the leaves of unpruned plants than in the pruned ones (Table I). The leaf yield recorded was 47% more in pruned plants as compared to the unpruned ones. There was an appreciable decrease in the larval period for the larvae reared on pruned plants as compared to unpruned ones and the number of cocoons harvested/plant, cocoon weight and shell weight were significantly higher in pruned plants than in unpruned ones.

Table I. Biochemical analysis of various components in the leaves of pruned and unpruned plants of *Quercus serrata* and rearing performance of *Antheraea proylei*.

Tableau I. Analyse biochimique de divers composants des feuilles de plants taillés et non taillés de Quercus serrata et performance d'élevage d'Antheraea proylei.

Parameters/Treatment Paramètres/Traitements	Pruned Taillés	Unpruned Non taillés	CD at 5% Seuil à 5 %
Moisture / Eau (%)	59.23	58.28	NS
Chlorophyll (mg/g leaf DW) / Chlorophylle (mg/g feuille DW)	0.672	0.621	0.021
Soluble protein (mg/g leaf FW) / Protéines solubles (mg/g feuille FW)	50.28	46.32	1.083
Total free amino acids (mg/g leaf DW) / Acides aminés libre totaux (mg/g feuille DW)	28.42	22.14	1.009
Crude protein (% DW) / Protéines brutes (% DW)	21.15	18.32	0.987
Total sugar (mg/g leaf DW) / Sucres totaux (mg/g feuille DW)	9.79	8.72	0.586
Crude fat (% DW) / Graisses brutes (% DW)	3.61	3.52	0.065
Crude fibre (% DW) / Fibres brutes (% DW)	14.28	15.16	0.179
Average leaf yield/plant (kg) / Rendement moyen en feuilles/plant (kg)	2.075	1.408	0.246
No. of cocoons harvested/plant / Nombre de cocons récoltés/plant	12.88	8.70	1.823
Larval period (days) / Période larvaire (jours)	38-40	45-48	3.52
Average cocoon wt. (g) / Poids du cocon (g)			
Male / Mâle	4.82	3.65	0.217
Female / Femelle	5.98	5.01	0.315
Average shell wt. (g) / Poids de la coque (g)			
Male / Mâle	0.46	0.35	0.028
Female / Femelle	0.58	0.46	0.033
Silk ratio (%) / Richesse soyeuse (%)			
Male / Mâle	9.95	9.58	NS
Female / Femelle	9.69	9.18	NS

DW: Dry weight / Poids sec. FW: Fresh weight / Poids humide. NS: Non significant / Non significatif.

DISCUSSION

The present discussion revealed that the leaves from pruned plants were both quantitatively and qualitatively superior to that of the unpruned ones. In unpruned plants growth inhibition is associated with a complete or partial retardation of mitotic activity in the apical meristem of the lateral bud. According to Nagao and Rubinstein (1976), cell division increases after shoot decapitation or pruning and, in our investigation, the increase in biomass may possibly be due to increased mitotic activity in the shoot. One of the most rapid changes taking place after pruning is the apparent accumulation of K^+ ions in the stem tissue around the nodes of *Bidens pilosus* (Kramer *et al.*, 1980). This alteration in ion-transport processes could play a fundamental role in bud activation by enhancing the transport of other nutrients. The nutritive value of oak tree foliage declines in mature leaves (Pandey and Goel, 1991). It has been observed that the new leaves sprouted from unpruned plants get mature much earlier because of the presence of a high percentage of crude fibre, as was observed in the present study, and simultaneously there was a decline in the protein content. The better rearing performance and cocoon characters using leaves from pruned plants clearly revealed its importance to sericulture. Therefore, by applying phasewise proper pruning it is possible to synchronise the rearing schedule with the availability of quality leaves to feed silkworm larvae.

REFERENCES

- A.O.A.C. (1984) Official Methods of Analysis. 14th Edition, Arlington, Virginia, USA.
- ARNON D.I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplast polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol., 24, 1-15.
- KRAMER D., DESBIEZ M.O., GARREC J.P., THELLIER M., FOURCY A., BOSSY J.P. (1980) The possible role of potassium in the activation of axillary buds of *Bidens pilosus* L. after decapitation of the apex. An examination by X-ray microanalysis. J. Exp. Bot., 31, 771-776.
- LANG C.A. (1958) Simple micro-determination of Kjeldahl nitrogen in biological materials. Anal. Chem., 30, 1692-1694.
- LOWRY O.H., ROSENBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. (1951) Protein measurement with Folin-Phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- NAGAO M.A., RUBINSTEIN B. (1976) Early events associated with lateral bud growth of *Pisum sativum* L. Bot. Gaz., 137, 39-44.
- PANDEY R.K., GOEL R.K. (1991) Constituents of the young and old leaves of primary food plants of oak tasar silkworm, *Antheraea proylei*. Indian J. Seric., 30(1), 70-71.
- PLUMER D.T. (1982) Quantitative determination of carbohydrates. In An Introduction to Practical Biochemistry. 2nd Edition (Ed. D.T. Plumer), McGraw-Hill Book Company (U.K.) Limited, Berkshire, England, pp. 183-184.
- RUBINSTEIN B., NAGAO M.A. (1976) Lateral bud outgrowth and its control by the apex. Bot. Rev., 42, 83-113.
- SINGH U.N., TIKOO B.L. (1989) The effect of pruning on sprouting and growth behaviour of *Q. serrata* in relation to oak tasar silkworm rearing. Indian Silk, Nov., 36-37.
- YEMM E.W., COCKING E.C. (1955) The determination of amino acids with ninhydrin. Analyst, 80, 209-213.

EFFET DE LA TAILLE SUR LA VALEUR NUTRITIVE DES FEUILLES DE *QUERCUS SERRATA*, PLANTE HOTE PRIMAIRE D'*ANTHERAEA PROYLEI* J., ET IMPACT SUR L'ELEVAGE DU VER A SOIE TASAR DU CHENE

M.K. GHOSH¹ & R.C. SRIVASTAVA²

1. Regional Tassar Research Station, Imphal - 795002, Inde.

2. Department of Life Sciences, Manipur University, Canchipur, Imphal - 795003, Inde.

Une expérience a été réalisée afin d'évaluer l'effet de la taille sur la valeur nutritive des feuilles de Quercus serrata. La taille entraîne une augmentation significative des teneurs en protéines solubles, en sucres totaux, en acides aminés libres, etc. Le nourrissage des larves d'Antheraea proylei avec des feuilles de plants taillés donne une meilleure performance d'élevage que le nourrissage avec des feuilles de plants non taillés.

INTRODUCTION

En Inde, il existe environ 58 espèces de chênes réparties sur toute la ceinture tempérée et sub-himalayenne, de l'Etat du Jammu-et-Cachemire à l'ouest à l'Etat de Manipur dans le nord-est. Certaines de ces espèces sont utilisées comme plantes nourricières par le ver à soie tassar du chêne *Antheraea proylei*; *Quercus serrata* est la principale de ces plantes hôtes. La qualité et la quantité des feuilles de *Q. serrata* jouent un rôle primordial dans la production de cocons de bonne qualité. Certains chercheurs ont étudié l'effet de la taille sur le bourgeonnement et la croissance de *Q. serrata* appliqué à l'élevage du ver à soie tassar du chêne (Singh et Tikoo, 1989). Dans cette étude, les composants foliaires des plants taillés et non taillés de *Q. serrata* ont été analysés et l'effet de la taille sur la performance d'élevage a été évalué.

MATERIELS ET METHODES

Des plants de *Q. serrata* âgés de cinq ans, à espacements de 120 cm × 120 cm, ont été sélectionnés pour cette étude. Pour l'étude de la taille, les plants ont été taillés entièrement au mois de décembre. La taille a été réalisée en laissant une couronne de branches de 15 cm de longueur sur la tige principale à une hauteur de 150 cm au-dessus du sol. Pour les lots non taillés, les plants se sont défoliés à l'époque de défoliation naturelle. Cinquante plants par parcelle ont été taillés, parmi lesquels 10 ont été utilisés pour l'échantillonnage des feuilles destinées à l'évaluation des paramètres biochimiques, les plants restants ont été utilisés pour les expériences d'élevage. Le même nombre de plants a été utilisé pour les témoins non taillés. Des feuilles de maturité intermédiaire ont été prélevées sur les plants taillés et non taillés pour l'analyse biochimique. Les échantillons foliaires de chaque lot expérimental ont été prélevés 60 jours après le bourgeonnement, séchés au four à 60 °C pendant 24 heures puis pulvérisés et analysés.

Le contenu en eau des feuilles fraîches a été déterminé par la méthode du séchage au four. L'analyse biochimique porte sur les teneurs en chlorophylle (Arnon, 1949), en sucres totaux (Plumer, 1982), en acides aminés libres (Yemm et Cocking, 1955), en graisses brutes et en fibres brutes (AOAC, 1984). Les expériences concernant l'analyse des feuilles ont été répétées trois fois et les données obtenues ont été analysées statistiquement.

L'élevage en extérieur a été réalisé sur des plants taillés et non taillés répartis en 10 réplicats. Les expériences ont été répétées sur trois années consécutives.

RESULTATS

On observe des différences significatives pour ce qui concerne certains composants biochimiques de la feuille comme la chlorophylle totale, les protéines solubles, les acides aminés libres, les sucres totaux, les protéines brutes et les fibres brutes. Cependant, la teneur en eau ne diffère pas de manière significative entre plants taillés et non taillés. La teneur en fibres brutes est significativement plus élevée chez les feuilles des plants non taillés que chez les feuilles des plants taillés (Tableau I). Le rendement en feuilles des plants taillés est supérieur de 47 % à celui obtenu pour les plants non taillés. On observe une diminution sensible de la période larvaire chez les larves élevées sur plants taillés par rapport à celles élevées sur plants non taillés ; le nombre de cocons récoltés par plant, le poids du cocon et le poids de la coque sont significativement plus élevés chez les larves élevées sur plants taillés que chez les larves élevées sur plants non taillés.

DISCUSSION

Cette étude révèle que les feuilles de plants taillés sont qualitativement et quantitativement supérieures à celles des plants non taillés. Chez les plants non taillés, l'inhibition de la croissance est associée à un retardement complet ou partiel de l'activité mitotique dans le méristème apical du bourgeon latéral. D'après Nagao et Rubinstein (1976), la division des cellules augmente après étêtage ou taille des pousses ; dans notre étude, l'augmentation de la biomasse pourrait être due à une augmentation de l'activité mitotique de la pousse. L'une des modifications les plus rapides survenant après la taille est l'accumulation visible d'ions K^+ dans le tissu de la tige autour des noeuds chez *Bidens pilosus* (Kramer et coll., 1980). Il se peut que cette modification du mode de transport des ions joue un rôle fondamental dans l'activation du bourgeon en favorisant le transport d'autres éléments nutritifs. La valeur nutritive des feuilles de chêne diminue chez les feuilles matures (Pandey et Goel, 1991). Les nouvelles feuilles issues de plants non taillés sont matures beaucoup plus tôt en raison de la présence d'un pourcentage élevé de fibres brutes, comme on l'a observé ici ; parallèlement, on observe une diminution du contenu en protéines.

Le fait que la performance d'élevage soit supérieure chez les larves élevées sur plants taillés montre clairement que la taille est une pratique importante pour la sériciculture. En appliquant un calendrier de taille approprié, il est donc possible de synchroniser les élevages en fonction de la disponibilité de feuilles de qualité pour l'alimentation des larves de ver à soie.

SEM OBSERVATIONS ON LARVAL AND PUPAL SPIRACLES OF *BOMBYX MORI* L. (LEPIDOPTERA: BOMBYCIDAE)

S.K. TEWARI, VINEET KUMAR & R.K. DATTA

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

Surface ultrastructure observations on the larval and pupal spiracles of B. mori have been presented. The study reveals that several unbranched fringes form a sieve plate on the spiracular opening in the larval stage, whereas the pupal stage has several tubular projections bearing small spines which form a filter apparatus. Further, the functional morphology of spiracles in general and the structure of the last pair of non-functional, vestigial spiracle in the pupa have been discussed in relation to the respiratory system.

Keywords: Ultrastructure spiracles, larva, pupa, *Bombyx mori*.

INTRODUCTION

The domesticated silkworm, *Bombyx mori* Linn., being an insect of commercial importance, has been the target of intensive scientific study for a long time for the development of sericulture technology. During silkworm rearing and seed production, respiration is one of the most important physiological activities and plays a vital role in better cocoon harvest and seed production. The gaseous exchange in the silkworm, *Bombyx mori*, is carried out by spiracles, trachea and tracheoles. The spiracles are the external openings of the trachea and its closing mechanism prevents water loss from the respiratory surface to be kept on minimum. The spiracles are ectodermal in origin, and not only play an important role in gaseous exchange but are also considered as a major site of water loss, and during ecdysis the old tracheal lining is pulled out from them (Imms, 1977). The spiracles open in response to low concentrations of oxygen or a high concentration of carbon dioxide in the tissues. The oxygen is transported through spiracles to the tracheal system and further to the cell concerned. The spiracles in insects have been discussed superficially in relation to the tracheal system and respiration (Buck, 1962; Keister and Buck, 1964; Miller, 1964, 1966, 1974; Akai, 1976; Chapman, 1983). Moreover, the insect respiratory system has also been classified on the basis of the number and distribution of functional spiracles (Keilin, 1944). The location and number of spiracles of larvae and pupae of *B. mori* have been reported (Nunome, 1964c; Krishnaswami *et al.*, 1973; Tazima, 1978). The general morphology and rates of opening of spiracles in relation to physiological activities in different larval and pupal stages of the silkworm, *B. mori*, have been studied in detail by Nunome (1963, 1964a, 1964b). The literature reveals that the spiracles of *B. mori* have been studied for the physiological point of view by several workers; however, ultrastructure information has not been generated thoroughly. Therefore, in the present paper the functional morphology of larval and pupal spiracles of *B. mori* under a scanning electron microscope has been studied.

MATERIALS AND METHODS

The spiracles were dissected out from fifth instar larvae and six-day-old pupae of the NB18 strain of *B. mori*, fixed for 2 hr in 2.5% glutaraldehyde prepared in cacodylate buffer, dehydrated in ethanol series, critically dried, coated with gold, mounted onto copper stubs and scanned under JEOL 100 CX II at 20 kV.

RESULTS AND DISCUSSION

The larva of *B. mori* bears nine pairs of spiracles in total, one pair on the first thoracic segment and the others on the first to eighth abdominal segments, however, the pupa bears a total of seven pairs of spiracles. All the larval spiracles are dorsolateral in position, identical in structure and function, oval in shape and surrounded by a broad peritreme. The internal surface of the peritreme

Fig. 1: Single larval spiracle showing the peritreme (Pr), unbranched fringes (Fr) and spiracular opening (So).

(Scale bar = 50 μ m).

Fig. 1 : Stigmate larvaire simple comportant le pérित्रème (Pr), les cils non ramifiés (Fr) et un orifice du stigmate (So).

(Echelle du trait = 50 μ m).

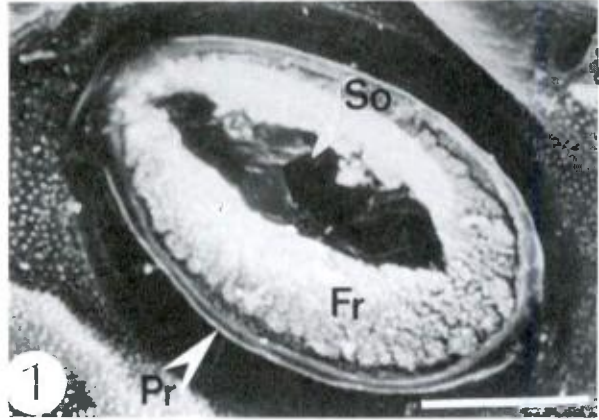


Fig. 2: A portion of larval spiracle showing peritreme (Pr) and unbranched fringes (Fr).

(Scale bar = 5 μ m).

Fig. 2 : Vue partielle d'un stigmate larvaire montrant le pérित्रème et des cils non ramifiés (Fr).

(Echelle du trait = 5 μ m).

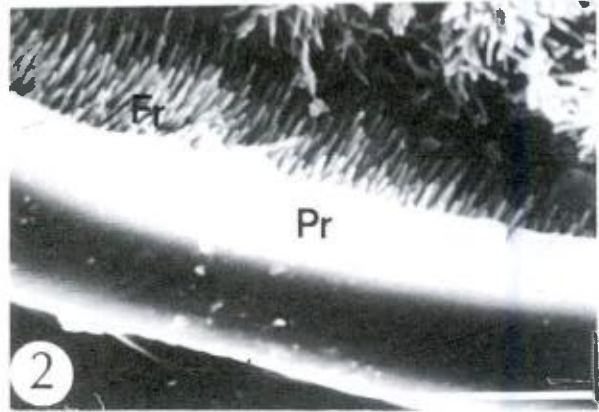
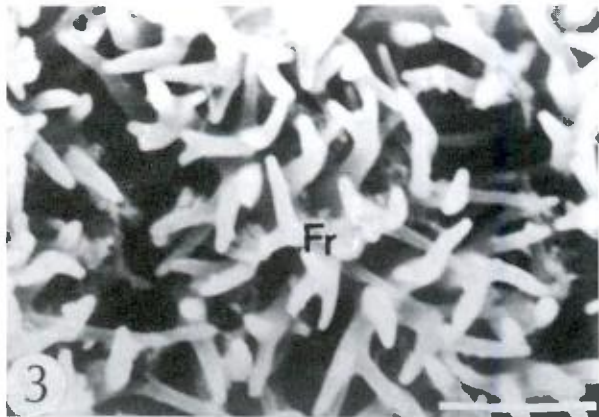


Fig. 3: Unbranched fringes (Fr) in larval spiracle.

(Scale bar = 1.5 μ m).

Fig. 3 : Cils non ramifiés (Fr) dans le stigmate larvaire.

(Echelle du trait = 1.5 μ m).



forms a circular ring and gives rise to several unbranched fringes directed towards the spiracular opening which forms a sieve plate, preventing the entry of dust particles and microorganisms inside the atrium (Fig. 1-3). The diffusion theory in respiration and spiracle covered by sieve plate have been reported previously in the silkworm (Nunome, 1944). The sieve plate of silkworm spiracle reduces the total cross section area to 1/10 and the total area of perforation is the smallest in the tracheal system.

Fig. 4: Single functional spiracle of pupa showing well-developed peritreme (Pr) and spiracular opening (So).

(Scale bar = 100 μ m).

Fig. 4 : Stigmate fonctionnel simple de chrysalide comportant le pérित्रème bien développé (Pr) et l'orifice du stigmate (So).
(Echelle du trait = 100 μ m).

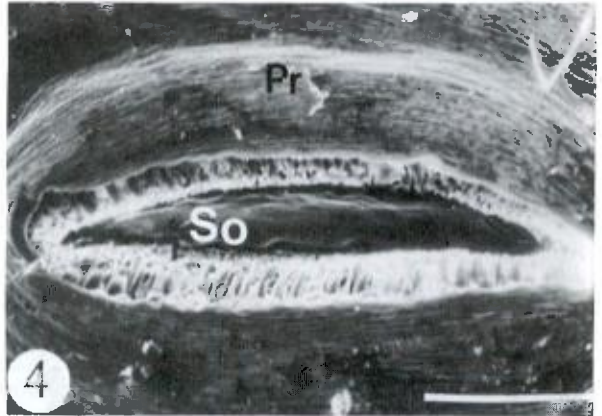


Fig. 5: A portion of functional spiracle showing tubular projections (Tp) directed towards spiracular opening (So).

(Scale bar = 20 μ m).

Fig. 5 : Vue partielle d'un stigmate fonctionnel montrant des projections tubulaires (Tp) dirigées vers l'orifice du stigmate (So).
(Echelle du trait = 20 μ m).

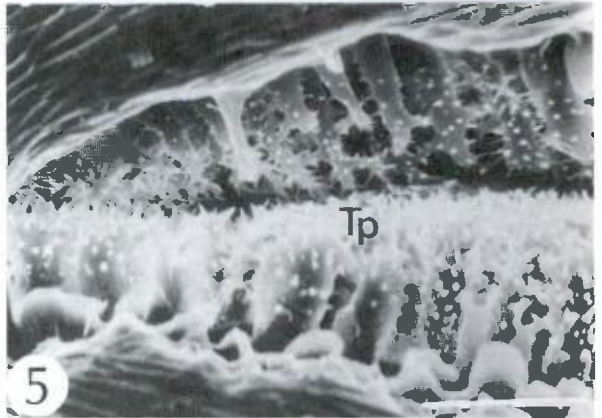
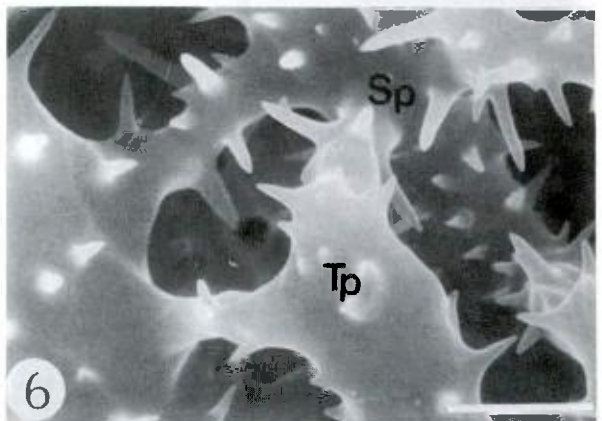


Fig. 6: Tubular projections (Tp) bearing spine-like structures (Sp).

(Scale bar = 3 μ m).

Fig. 6 : Projections tubulaires (Tp) comportant des structures en forme d'épines (Sp).
(Echelle du trait = 3 μ m).



But by virtue of the pore diffusion effect of Brown and Escombe, this reduction does not lower the rate of gaseous diffusion through it (Buck, 1962). Nunome (1964a) observed the opening of spiracles at 90% relative humidity which is considered to be indicative of the action designed to make up for the decrease of water loss by evaporation in high humidity. Nunome (1964b) observed that the rate of opening of spiracles itself indicates the degree of metabolism which is conducted through spiracles. Moreover, it was also observed that the hiatus of the silkworm sieve plate is open to some extent through the whole period from the first to the third instar, at an early period of fourth and fifth instars, and just after pupation, while it is closed during the remaining period of the fourth and fifth instars and in late-age pupae.

The first six pairs of functional spiracles of the pupa are elongated laterally, encircled by a broad, elevated peritreme. The inner surface of the peritreme gives rise to the filter apparatus comprising elongated tubular projections bearing several spine-like structures (Fig. 4-6). The filter apparatus in the spiracles of the pupa have the same function as the sieve plate in the spiracles of the larva. The seventh and last pair of spiracles are non-functional, vestigial, devoid of filter apparatus and located at the dorsolateral position of Ab VIII of the terminal cap (Fig. 7-8). Further, in non-functional spiracles the peritreme is not demarcated and developed as in the functional one. Akai (1976) has also illustrated

Fig. 7: Non-functional pupal spiracle showing vestigial peritreme (Vp) and spiracular opening (So).

(Scale bar = 100 μ m).

Fig. 7 : Stigmate nymphal non fonctionnel comportant un pérित्रème atrophié (Vp) et un orifice de stigmate (So).

(Echelle du trait = 100 μ m).

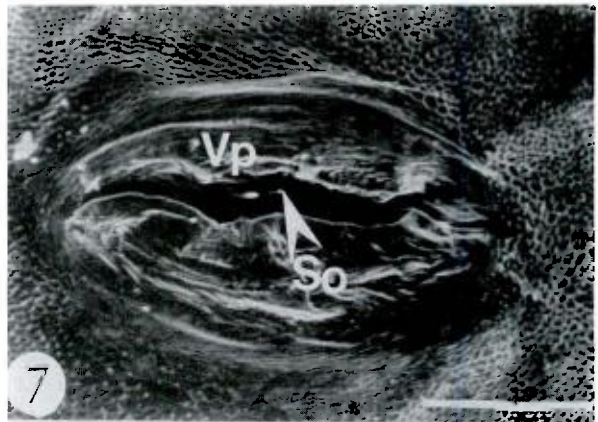
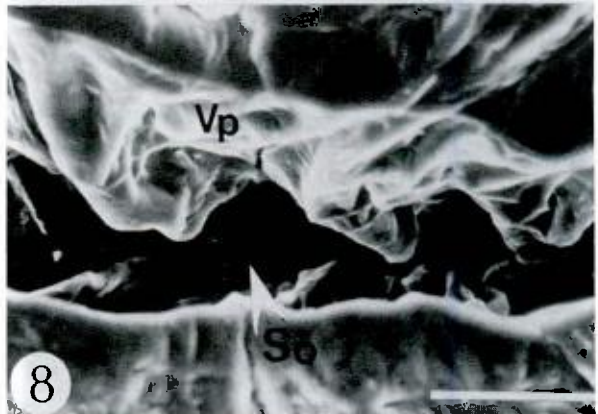


Fig. 8: A portion of non-functional spiracle showing vestigial peritreme (Vp), spiracular opening (So) and devoid of tubular projections.

(Scale bar = 20 μ m).

Fig. 8 : Vue partielle d'un stigmate non fonctionnel montrant le pérित्रème atrophié (Vp), un orifice de stigmate (So) et dépourvu de projections tubulaires.

(Echelle du trait = 20 μ m).



certain morphological structures of the tracheal system of *B. mori* under a scanning electron microscope. Similar to *B. mori*, the location and number of functional and non-functional spiracles have been reported recently in several lepidopterous pupae, i.e., *Diacrisia obliqua* (Goel and Kumar, 1983), *Lymantria marginata* (Singh and Goel, 1985), *Trabala vishnu* (Rao and Goel, 1990). It is reported that the rate of oxygen uptake by the silkworm pupa follows a U-shaped curve during the pupal period and that the age at which respiration is lowest may correspond to the turning point in metabolism from histolysis to histogenesis (Ito, 1954). The movement of spiracles in relation to gaseous exchanges in *B. mori* has also been studied by Nunome (1963). The respiratory activities in the posterior region of fused abdominal segments 8, 9 and 10 in the pupal stage of *B. mori* remain lowest, which probably makes the last pair of spiracles non-functional and vestigial.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks are due to Mr K.R. Chandrasekar, Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India, for photographic assistance.

REFERENCES

- AKAI H. (1976) Surface Structure of Insects. University of Tokyo Press, pp. 1-137.
 BUCK J. (1962) Some physiological aspects of insect respiration. *Ann. Rev. Ent.*, 7, 27-56.
 CHAPMAN R.F. (1983) The Insects – Structure and Function. Hodder and Stoughton Educational, Kent, 919 pp.
 GOEL S.C., KUMAR A. (1983) Morphology and weight loss in pupa of *Diacrisia obliqua* (Wlk.) (Lepidoptera: Arctiidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 76, 437-440.
 IMMS A.D. (1977) A General Text Book of Entomology. Volume 1, 418 pp.
 ITO T. (1954) *Bull. Sericult. Exp. Sta. Japan*, 14, 263.
 KEILIN D. (1944) Respiratory system and respiratory adaptations in larvae and pupae of Diptera. *Parasitology*, 36, 1-66.
 KEISTER M., BUCK J. (1964) Respiration: Some exogenous and endogenous effects on rate of respiration. *In The Physiology of Insecta*. Vol. 3, Academic Press, pp. 618-646.
 KRISHNASWAMI S., NARASIMHANNA M.N., SURYANARAYANA S.K., KUMARARAJ S. (1973) Manual of Sericulture. FAO, Rome, 2, 131.
 MILLER P.L. (1964) Respiration: aerial gas transport. *In The Physiology of Insecta*. Vol. 3, Academic Press, New York, 558-609.
 MILLER P.L. (1966) The regulation of breathing in insects. *Adv. Insect Physiol.*, 3, 279-344.
 MILLER P.L. (1974) *The Physiology of Insecta*. Vol. 6, Academic Press, New York, pp. 344-402.
 NUNOME J. (1944) Studies on the respiration of the silkworm. I. Diffusion of oxygen in the respiratory system of silkworm. *Bull. Sericult. Exp. Sta. Japan*, 12, 17.
 NUNOME J. (1963) Studies on the opening of spiracles in the silkworm (*Bombyx mori* L.) (I). *J. Sericult. Sci. Japan*, 32, 77-90.
 NUNOME J. (1964a) Studies on the rates of opening of spiracles in the silkworm (*Bombyx mori* L.) (II). *J. Sericult. Sci. Japan*, 33, 1-8.
 NUNOME J. (1964b) Studies on the opening of spiracles in the silkworm (*Bombyx mori* L.) (III). *J. Sericult. Sci. Japan*, 33, 134-145.
 NUNOME J. (1964c) Studies on the pseudospiracles of the silkworm pupae, *Bombyx mori* L. *J. Sericult. Sci. Japan*, 33, 146-152.
 RAO P.K., GOEL S.C. (1990) Gravimetrics of weight loss and sexing in the pupa of *Trabala vishnu* (Lef.) (Lep. Lasiocampidae). *Acta Entomol. Jugosl.*, 23, 59-66.
 SINGH J., GOEL S.C. (1985) Feature in sexing and loss in weight of the pupae of *Lymantria marginata* (Wlk.). *Dtsch. Ent. Z.N.F.*, 32, 355-361.
 TAZIMA Y. (1978) The Silkworm: An Important Laboratory Tool. Kodansha Scientific Books, Tokyo, p. 418.

OBSERVATION AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE A BALAYAGE DES STIGMATES LARVAIRES ET NYMPHAUX DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L. (LEPIDOPTERA : BOMBYCIDAE)

S.K. TEWARI, VINEET KUMAR & R.K. DATTA

Electron Microscopy Unit, Central Sericultural Research and Training Institute, Manandavadi
Road, Srirampura, Mysore - 570 008, Inde.

*Cette étude décrit l'ultrastructure superficielle des stigmates larvaires et nymphaux de *B. mori*. Les résultats obtenus révèlent que plusieurs cils non ramifiés forment une plaque de criblage sur l'ouverture du stigmate au stade larvaire ; au stade nymphal, plusieurs projections tubulaires comportant de petites épines servent d'organe de filtrage. La morphologie fonctionnelle des stigmates en général et la structure de la dernière paire de stigmates non fonctionnelle et atrophiée sont également discutées dans le contexte du système respiratoire.*

INTRODUCTION

Le ver à soie domestique *Bombyx mori* Linn. étant un insecte d'intérêt commercial, il constitue depuis longtemps l'objet d'études scientifiques intensives visant à développer la technologie séricicole. Au cours de l'élevage des vers à soie et de la production des graines, la respiration est l'une des activités physiologiques les plus importantes car elle est essentielle pour obtenir une bonne récolte de cocons et une bonne production de graines. L'échange gazeux chez le ver à soie *Bombyx mori* s'effectue par les stigmates, les trachées et les trachéoles. Les stigmates sont les ouvertures externes de la trachée et leur mécanisme de fermeture empêche de maintenir au minimum la perte d'eau à la surface respiratoire. Les stigmates sont d'origine ectodermique ; non seulement ils jouent un rôle important dans l'échange gazeux mais ils sont considérés comme le site principal de perte, l'ancienne paroi trachéenne s'en détache lors de l'ecdysis (Imms, 1977). Les stigmates s'ouvrent par réaction à de faibles concentrations d'oxygène ou à de fortes concentrations de dioxyde de carbone dans les tissus. L'oxygène est transporté par les stigmates vers le système trachéen puis vers la cellule concernée. Les stigmates des insectes ont été décrits de manière superficielle par rapport au système trachéen et à la respiration (Buck, 1962 ; Keister et Buck, 1964 ; Miller, 1964, 1966, 1974 ; Akai, 1976 ; Chapman, 1983). Le système respiratoire des insectes a également été classifié sur la base du nombre et de la position des stigmates fonctionnels (Keilin, 1944). On a également décrit l'emplacement et le nombre de stigmates larvaires et nymphaux chez *B. mori* (Nunome, 1964c ; Krishnaswami et coll., 1973 ; Tazima, 1978). La morphologie générale et les taux d'ouverture des stigmates par rapport aux activités physiologiques à différents stades larvaires et nymphaux du ver à soie *B. mori* ont été étudiés en détail par Nunome (1963, 1964a, 1964b). La lecture de la documentation révèle que les stigmates de *B. mori* ont été étudiés d'un point de vue physiologique par de nombreux chercheurs ; cependant, peu d'informations ont été obtenues concernant l'ultrastructure. Cet article vise donc à présenter la morphologie fonctionnelle des stigmates larvaires et nymphaux de *B. mori* observée au microscope électronique à balayage.

MATERIELS ET METHODES

Les stigmates ont été disséqués sur des larves du cinquième âge et sur des chrysalides âgées de six jours de la souche NB18 de *B. mori*, fixés pendant 2 heures dans du glutaraldéhyde à 2,5 % préparé dans un tampon cacodylate, déshydratés dans une série d'éthanol, séchés au point critique, enduits d'or, montés sur des grilles de cuivre et examinés au microscope à balayage JEOL 100 CX à 20 kV.

RESULTATS ET DISCUSSION

La larve de *B. mori* possède neuf paires de stigmates au total : une paire sur le premier segment thoracique et les autres entre le premier et le huitième segment abdominal tandis que la chrysalide possède un total de sept paires de stigmates. Tous les stigmates larvaires sont placés sur la partie dorso-latérale ; ils ont une structure et une fonction identiques, sont de forme ovale et entourés par un péritrème large. La surface interne du péritrème forme un cercle et donne naissance à plusieurs cils non ramifiés dirigés vers l'ouverture du stigmate, formant un tamis et empêchant l'entrée des particules de poussière et des micro-organismes dans l'atrium (Fig. 1 à 3). La théorie de la diffusion lors de la respiration et la couverture des stigmates par un tamis ont été déjà été observées chez le ver à soie (Nunome, 1944). Le tamis du stigmate du ver à soie réduit la zone totale de la coupe transversale à un 1/10^e et la zone totale de perforation est la partie la plus petite du système trachéen. Cependant, en vertu de l'effet de diffusion par les pores de Brown et Escombe, cette réduction ne diminue pas le taux de diffusion des gaz à travers le système trachéen (Buck, 1962). Nunome (1964a) a observé que le taux d'ouverture des stigmates indique le degré de métabolisme qui est transporté par les stigmates. De plus, la brèche du tamis du ver à soie est ouverte jusqu'à un certain point du premier au troisième âge, au début du quatrième et du cinquième âge et juste après la nymphose mais elle est fermée à la fin du quatrième et du cinquième âge et en fin de stade nymphal.

Les six paires de stigmates fonctionnels de la chrysalide sont allongées latéralement, surmontées par un péritrème large. La surface interne du péritrème donne naissance au système de filtrage qui est composé de projections tubulaires allongées comportant plusieurs structures en forme d'épine (Fig. 4 à 6). Le système de filtrage des stigmates de la chrysalide a la même fonction que le tamis des stigmates de la larve. La septième et dernière paire de stigmates est un organe non fonctionnel, atrophié, dépourvu de système de filtrage et situé sur la partie dorso-latérale de Ab VIII de la coiffe terminale (Fig. 7 à 8). De plus, chez les stigmates non fonctionnels, le péritrème n'est pas aussi démarqué et développé que chez les stigmates fonctionnels. Akai (1976) a également illustré certaines structures morphologiques du système trachéen de *B. mori* au microscope électronique à balayage. De même que chez *B. mori*, l'emplacement et le nombre de stigmates fonctionnels et non fonctionnels ont été décrits chez plusieurs chrysalides de lépidoptères : *Diacrisia obliqua* (Goel et Kumar, 1983), *Lymantria marginata* (Singh et Goel, 1985), *Trabala vishnu* (Rao et Goel, 1990). Le taux d'absorption d'oxygène par la chrysalide de ver à soie dessine une courbe en U au cours de la période nymphale et l'âge auquel la respiration est la plus faible pourrait correspondre au moment critique où le métabolisme passe de l'histolyse à l'histogenèse (Ito, 1954). Le mouvement des stigmates par rapport aux échanges gazeux chez *B. mori* a également été étudié par Nunome (1963). Les activités respiratoires dans la région postérieure des segments abdominaux 8, 9 et 10 fusionnés sont minimales au stade nymphal de *B. mori* ; c'est probablement la raison pour laquelle la dernière paire de stigmates est un organe non fonctionnel et atrophié.

SEM OBSERVATIONS ON SENSORY RECEPTORS ON THE HEAD CAPSULE OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L. (LEPIDOPTERA: BOMBYCIDAE)

S.K. TEWARI, VINEET KUMAR & R.K. DATTA

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

*An SEM study on sensory receptors, i.e., antennae, maxillae and labial palpi, of **Bombyx mori** L. has been carried out. The three segmented antenna bears sensory structures which are olfactory in function. Nine apical sensilla known to be olfactory were observed on the distal end of the maxillary palpus. The gustatory structures, i.e., three sensilla styloconica, two sensilla trichodea and a single sensillum chaeticum, were observed on the galea. A single pair of labial palpi, considered to be mechanoreceptors, was also observed. Further, the functional morphology of sensory receptors on the head capsule of other lepidopterous larvae have also been discussed.*

Keywords: Sensory receptors, *Bombyx mori*, SEM.

INTRODUCTION

The mouthpart and its accompanying sensory structures in lepidopterous larvae have been a subject of study to understand the systematics, sensory physiology and host plant selection. The head capsule possesses several types of sensory receptors (basiconic, trichoid and styloconic) which perceive various stimuli from the external environment (Schoonhoven, 1972; Reese and Carlson, 1974; Ma, 1976; Wieczorek, 1976; Albert, 1980; Ave, 1981; Devitt and Smith, 1982). The function of various types of sensory receptors on mouthparts of lepidopterans have been confirmed by behavioral and electrophysiological studies which indicate that the apical sensilla on the maxillary palpus are olfactory (Hanson and Dethier, 1973; Dethier, 1977), while the medial and lateral sensilla styloconica on the galea and sensory receptors on the epipharynx are gustatory (Dethier and Kuch, 1971; Deboer *et al.*, 1977; Blom, 1978). The sensory receptors on the maxilla of *B. mori* and their probable function have been discussed previously (Ishikawa *et al.*, 1963; Ishikawa and Hirao, 1965; Ishikawa, 1966; Akai, 1976; Tazima, 1978). Although the sensory receptors on the head capsule of *B. mori* are of paramount importance for discrimination between host and non-host plants, little attention has been paid to understanding the morphology at the ultrastructure level. As such, the present paper deals with the functional morphology of the sensory receptors on the head capsule of *B. mori* under a scanning electron microscope.

MATERIALS AND METHODS

The sensory receptors, i.e., antenna, maxilla and labium, were dissected out from the head capsule of fifth instar larva of *B. mori* (NB₁₈), fixed in 2.5% glutaraldehyde prepared in cacodylate buffer for 2 hr, dehydrated in ethanol series, critically dried, coated with gold, mounted onto copper stubs and scanned under JEOL 100 CX II at 20 kV.

RESULTS AND DISCUSSION

The head capsule of *B. mori* possesses three sensory receptors, i.e., antenna, maxilla and the labial palpi. The three segmented antenna consists of a proximal segment, scape (Sp); a second segment, the pedicel (Pd), and a third segment, the flagellum. The third segment of the antenna is further divided into proximal (F1 I) and distal (F1 II). The proximal segment (F1 I) bears two cone-like sensory basiconicae (Fsb1 and Fsb2), and a small sensory projection (Fsp), whereas the distal end of the flagellum (F1 II) is small. Adjacent to the flagellum, two sensilla basiconicae (Psb1 and Psb2), a sensory projection (Psp) and two unequal-sized setae (An1 and An2) are located on the articular membrane as the distal pedicellar membrane (Fig. 1). The maxilla consists of the galea and a maxillary

Fig. 1: SEM photograph of sensory receptors on the head capsule of *B. mori*.

Three segmented antenna showing the second segment pedicel (Pd) with two sensilla basiconica (Psb1 and Psb2), sensory projection (Psp), two setae (An1 and An2); the third segment of the antenna divides into flagellums I and II (F1 I and F1 II), further two sensory basiconica (Fsb1 and Fsb2) and a sensory projection (Fsp) located on F1 I. (Scale bar = 10 μ m).

Fig. 1 : Vue au microscope électronique à balayage des récepteurs sensoriels de la capsule céphalique chez *B. mori*.

Antenne à trois segments montrant le pédicelle du deuxième segment (Pd) et deux sensilles basiconiques (Psb1 et Psb2), une projection sensorielle (Psp), deux soies (An1 et An2) ; le troisième segment de l'antenne se divise en deux flagellums (F1 I et F1 II), on peut voir deux basiconiques sensorielles (Fsb1 et Fsb2) et une projection sensorielle (Fsp) situées sur F1 I. (Echelle du trait = 10 μ m).

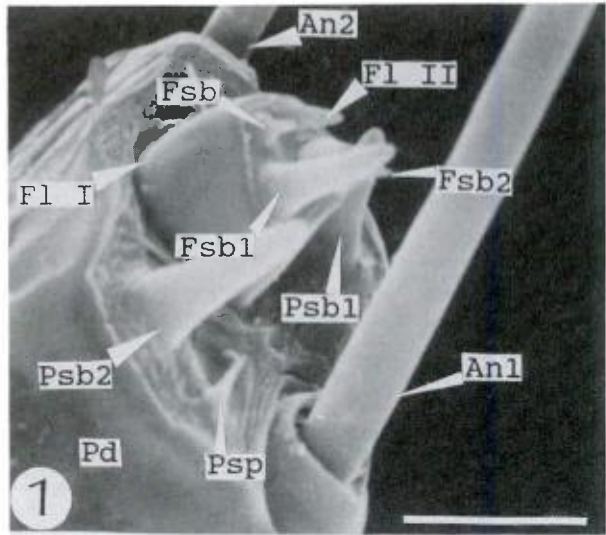
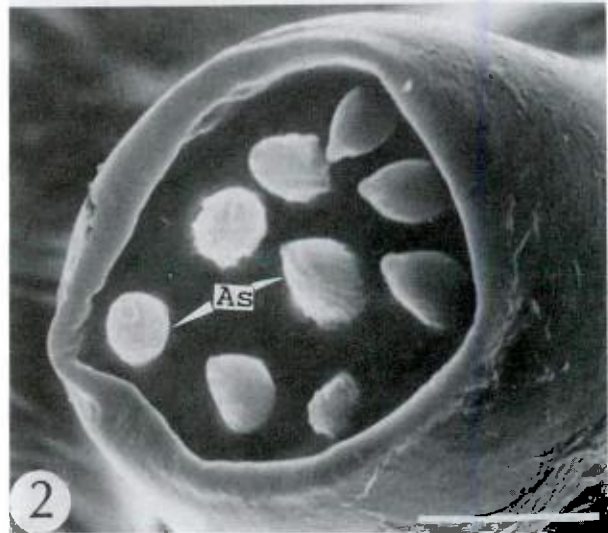


Fig. 2: SEM photograph of sensory receptors on the head capsule of *B. mori*.

Galea showing three sensilla styloconica (Ss1, Ss2, Ss3), two sensilla trichodea (St1 and St2) and a sensillum chaeticum (Sc). (Scale bar = 2 μ m).

Fig. 2 : Vue au microscope électronique à balayage des récepteurs sensoriels de la capsule céphalique chez *B. mori*.

Galee comportant trois sensilles styloconiques (Ss1, Ss2, Ss3), deux sensilles trichodées (St1 et St2) et une sensille chaetique (Sc). (Echelle du trait = 2 μ m).



palpus, the latter is characterized by nine apical sensilla (eight are arranged in the outer periphery and one in the centre) (Fig. 2). The galea bears two sensilla trichodea (St1 and St2), a sensillum chaeticum (Sc) and three sensilla styloconica (Ss1, Ss2 and Ss3), each of which terminates into a knobbed papilla (Fig. 3). The apical sensilla are olfactory receptors while the two sensilla styloconica (Ss1 and Ss2) are gustatory receptors. The two labial palpi (Lp) are mechanoreceptors and situated on either side of the spinneret (Sp). Each labial palpus is divided into two segments where the proximal end is cylindrical, long and terminating into a distal sensory peg, and the distal segment is minute with a small projection (Fig. 4). Similar to the present observations, Akai (1976) also studied the morphology of some important sensory structures of the head capsule of *B. mori* under a scanning electron microscope.

Fig. 3: SEM photograph of sensory receptors on the head capsule of *B. mori*.

Maxillary palpus showing nine apical sensilla (As).
(Scale bar = 15 μ m).

Fig. 3 : Vue au microscope électronique à balayage des récepteurs sensoriels de la capsule céphalique chez *B. mori*.

Palpe maxillaire comportant neuf sensilles apicales (As).
(Echelle du trait = 15 μ m).

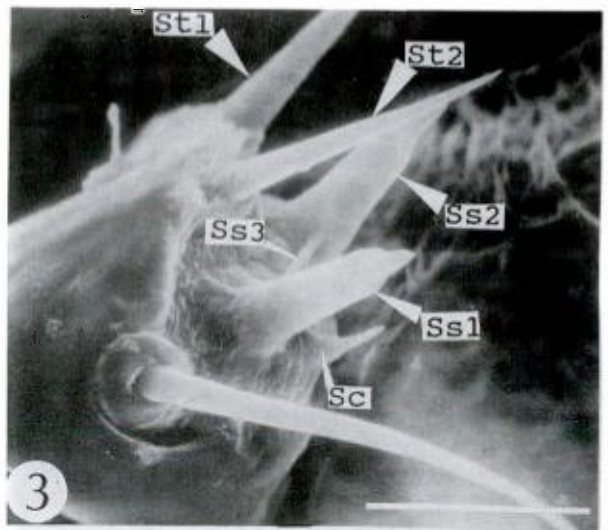
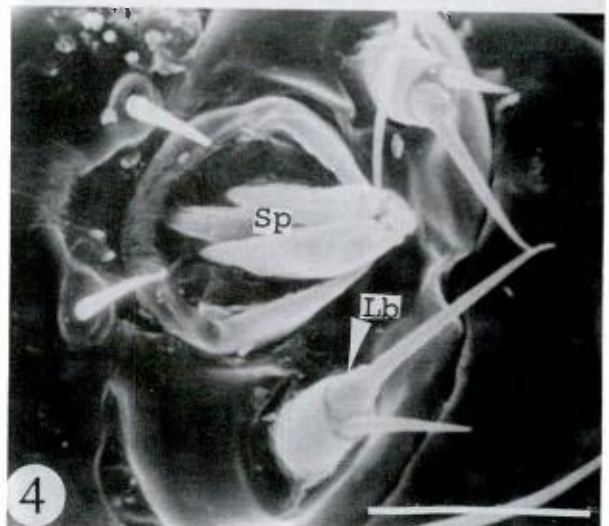


Fig. 4: SEM photograph of sensory receptors on the head capsule of *B. mori*.

Anteroventral view of head showing spinneret (Sp) and a pair of labial palpi (Lb).
(Scale bar = 15 μ m).

Fig. 4 : Vue au microscope électronique à balayage des récepteurs sensoriels de la capsule céphalique chez *B. mori*.

Vue antéroventrale de la tête montrant la filière (Sp) et une paire de palpes labiaux (Lb).
(Echelle du trait = 15 μ m).



Sensory receptors on the mouthparts of lepidopterous larvae respond to olfactory and gustatory stimuli that are produced by the host plant (Ave, 1981; Hanson and Dethier, 1973). Eight apical sensilla on the maxillary palpus in four different noctuid larvae, i.e., *Heliothis zea* and *H. virescens* (Baker *et al.*, 1986), *Agrotis ipsilon* (Reese and Carlson, 1974), *Euxoa messoria* (Devitt and Smith, 1982), have been reported, whereas nine apical sensilla were observed in *B. mori*. The ultrastructure and electrophysiological study shows that apical sensilla have multiple innervations and respond to gustatory mechanical and olfactory stimuli (Wieczorek, 1976; Albert, 1980).

The galea of *B. mori* comprises three sensilla styloconica (Ss1, Ss2 and Ss3), two sensilla trichodea (St1 and St2) and a single sensillum chaeticum (Sc). Further, the electrophysiological studies on sensilla styloconica on the maxilla of *B. mori* confirm that the sensillum styloconicum (Ss1) is sugar-sensory while the other one (Ss2) is water-sensory (Ishikawa *et al.*, 1963; Ishikawa and Hirao, 1965; Ishikawa, 1966; Tazima, 1978). Such studies in other lepidopterous larvae also confirm that sensory receptors are gustatory and respond to sugar, amino acids, salts and secondary plant substances (Wieczorek, 1976; Albert, 1980; Ave, 1981; Dethier and Kuch, 1971; Baker *et al.*, 1986). The sensory receptors on labial palpi in *B. mori* are mechanoreceptors similar to that of *Choristoneura fumiferana* (Albert, 1980).

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks are due to Mr K.R. Chandrasekar, Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India, for photographic assistance.

REFERENCES

- AKAI H. (1976) Surface Structure of Insects. University of Tokyo Press, pp. 1-137.
- ALBERT P.J. (1980) Morphology and innervation of the mouthpart sensilla in the larvae of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (Lepidoptera: Tortricidae). Can. J. Zool., 58, 842-851.
- AVE D.A. (1981) Induction of changes in the gustatory response by individual secondary plant compounds in the larvae of *Heliothis zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae). Ph.D. dissertation, Dept. of Entomology, Mississippi State University.
- BAKER G.T., PARROTT W.L., JENKINS J.N. (1986) Sensory receptors on the larval maxilla and labia of *Heliothis zea* (Boddie) and *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). Int. J. Insect Morphol. and Embryol., 15(3), 227-232.
- BLOM F. (1978) Sensory activity and food intake; a study input-output relationship in two phytophagous insects. Neth. J. Zool., 28, 277-340.
- DEBOER G., DETHIER V.G., SCHOONHOVEN L.M. (1977) Chemoreceptors in the preoral cavity of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and their possible function in feeding behaviour. Entomol. Exp. Appl., 21, 287-298.
- DETHIER V.G., KUCH J.H. (1971) Electrophysiological studies of gustation in lepidopterous larvae. I. Comparative sensitivity to sugars, amino acids and glycosides. Z. Vergl. Physiol., 72, 343-363.
- DETHIER V.G. (1977) Gustatory sensing of complex mixed stimuli by insects. In Proc. Int. Symp. Olfaction and Taste VI. J. Lemagnen Ed., IRL Press Ltd., London, pp. 323-331.
- DEVITT B.D., SMITH J.J.B. (1982) Morphology and fine structure of mouthpart sensilla in the dark-sided cutworm, *Euxoa messoria* (Harris) (Lepidoptera: Noctuidae). Int. J. Insect Morphol. Embryol., 11, 255, 270.
- HANSON F.E., DETHIER V.G. (1973) Role of gustation and olfaction in food plant discrimination in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. J. Insect Physiol., 19, 1010-1034.
- ISHIKAWA S., TAZIMA Y., HIRAO T. (1963) Response of the chemoreceptors of maxillary sensory hairs in a "non-preference" mutant of silkworm. J. Sericult. Sci. Japan, 32, 125-129.
- ISHIKAWA S., HIRAO T. (1965) Studies on olfactory sensation in the larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. (II) Chemotaxis of hatched larvae to various plant leaves. J. Sericult. Sci. Japan, 34, 15.
- ISHIKAWA S. (1966) Electrical response and function of a bitter substance receptor associated with the maxillary sensilla of the larvae of the silkworm (*Bombyx mori*). J. Cell Physiol., 67, 1.

- MA W.C. (1976) Mouthparts of receptors involved in feeding behaviour and sugar reception in the African armyworm, *Spodoptera exempta* (Lepidoptera: Noctuidae) Symp. Biol. Hung., 16, 139-151.
- REESE J.C., CARLSON S.D. (1974) Scanning electron microscopy of final-instar mouthparts of the black cutworm, *Agrotis ipsilon*. Ann. Entomol. Soc. Am., 67, 301-308.
- SCHOONHOVEN L.M. (1972) Plant recognition by lepidopterous larvae. In Insect/Plant Relationships. H.F. Van Emden Ed., Symp. R. Entomol. Soc. London, No. 6, London, pp. 87-99.
- TAZIMA Y. (1978) The Silkworm: An Important Laboratory Tool. Kodansha Scientific Books, Tokyo, pp. 45-47.
- WIECZOREK H. (1976) The glycoside receptors of the larvae of *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Comp. Physiol., 106, 153-176.

OBSERVATION AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE A BALAYAGE DES RECEPTEURS SENSORIELS DE LA CAPSULE CEPHALIQUE DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L. (LEPIDOPTERA : BOMBYCIDAE)

S.K. TEWARI, VINEET KUMAR & R.K. DATTA

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

*Les récepteurs sensoriels de **Bombyx mori** L., c'est-à-dire les antennes, les maxilles et les palpes labiaux, ont été examinés au microscope électronique à balayage. L'antenne, divisée en trois segments, comporte des structures sensorielles qui ont une fonction olfactive. On observe neuf sensilles apicales de nature olfactive à l'extrémité distale du palpe maxillaire. Les structures gustatives, c'est-à-dire trois sensilles styloconiques, deux sensilles trichodées et une seule sensille chaetique, ont été observées sur la galea. On a observé une seule paire de palpes labiaux, considérés comme des mécanorécepteurs. La morphologie fonctionnelle des récepteurs sensoriels de la capsule céphalique d'autres larves de lépidoptères est également discutée.*

INTRODUCTION

Les mandibules et les structures sensorielles des larves de lépidoptères ont fait l'objet d'études visant à comprendre la systématique, la physiologie sensorielle et la sélection des plantes hôtes. La capsule céphalique possède plusieurs types de récepteurs sensoriels (basiconiques, trichoïdes et styloconiques) qui perçoivent divers stimuli provenant de l'environnement extérieur (Schoonhoven, 1972 ; Reese et Carlson, 1974 ; Ma, 1976 ; Wieczorek, 1976 ; Albert, 1980 ; Ave, 1981 ; Devitt et Smith, 1982). La fonction des divers types de récepteurs sensoriels des mandibules de lépidoptères a été confirmée par des études comportementales et électrophysiologiques indiquant que les sensilles apicales du palpe maxillaire ont une fonction olfactive (Hanson et Dethier, 1973 ; Dethier, 1977), tandis que les sensilles médianes et latérales styloconiques de la galea et les récepteurs sensoriels de l'épipharynx ont une fonction gustative (Dethier et Kuch, 1971 ; Deboer et coll., 1977 ; Blom, 1978). Les récepteurs sensoriels de *B. mori* et leur fonction probable ont été déjà été discutés (Ishikawa et coll., 1963 ; Ishikawa et Hirao, 1965 ; Ishikawa, 1966 ; Akai, 1976 ; Tazima, 1978). Bien que les récepteurs sensoriels de la capsule céphalique de *B. mori* soient d'une importance capitale dans la distinction des plantes hôtes et non hôtes, il existe peu de travaux sur leur morphologie au niveau ultrastructural. Cet article traite donc de la morphologie fonctionnelle des récepteurs sensoriels de la capsule céphalique de *B. mori* observée au microscope électronique à balayage.

MATERIELS ET METHODES

Les récepteurs sensoriels, c'est-à-dire l'antenne, la maxille et le labium, ont été prélevés sur des capsules céphaliques de larves de *B. mori* (NB₁₈) au cinquième âge, fixés pendant deux heures dans du glutaraldéhyde à 2,5 % préparé dans un tampon cacodylate, déshydratés dans une série d'éthanol, séchés au point critique, enduits d'or, montés sur des têtes en cuivre et examinés au microscope électronique à balayage JEOL 100 CX II à 20 kV.

RESULTATS ET DISCUSSION

La capsule céphalique de *B. mori* possède trois récepteurs sensoriels : l'antenne, la maxille et les palpes labiaux. L'antenne est divisée en trois segments : un segment proximal (le scape), un deuxième segment (le pédicelle, Pd) et un troisième segment (le flagellum). Le troisième segment de l'antenne est subdivisé en une partie proximale (F1 I) et une partie distale (F1 II). Le segment proximal (F1 I) comporte deux basiconiques sensorielles en forme de cône (Fsb1 et Fsb2) et une petite projection sensorielle (Fsp) tandis que la partie distale du flagellum (F1 II) est petite. A côté du flagellum, deux sensilles basiconiques (Psb1 et Psb2), une projection sensorielle (Psp) et deux soies de taille inégale (An1 et An2) sont situées sur la membrane articulaire comme membrane du pédicelle distal (Fig. 1). La maxille est composée d'une galea et d'un palpe maxillaire, ce dernier se caractérise par neuf sensilles apicales (huit à la périphérie externe et une au centre) (Fig. 2). La galea comporte deux sensilles trichodées (St1 et St2), une sensille chaetique (Sc) et trois sensilles styloconiques (Ss1, Ss2 et Ss3), dont chacune se termine par une papille bosselée (Fig. 3). Les sensilles apicales sont des récepteurs olfactifs tandis que les deux sensilles styloconiques (Ss1 et Ss2) sont des récepteurs gustatifs. Les deux palpes labiaux (Lp) sont des mécanorécepteurs et sont situés de part et d'autre de la filière (Sp). Chaque palpe labial est divisé en deux segments dont l'extrémité proximale est cylindrique, longue et se termine par une pointe sensorielle distale tandis que le segment distal est minuscule et comporte une petite projection (Fig. 4). Akai (1976) a également étudié la morphologie de certaines structures sensorielles importantes de la capsule céphalique de *B. mori* au microscope électronique à balayage.

Les récepteurs sensoriels des mandibules des larves de lépidoptères réagissent aux stimuli olfactifs et gustatifs produits par la plante hôte (Ave, 1981 ; Hanson et Dethier, 1973). On a observé huit sensilles apicales sur le palpe maxillaire chez quatre larves différentes de noctuidés, *Heliothis zea* et *H. virescens* (Baker et coll., 1986), *Agrotis ipsilon* (Reese et Carlson, 1974), *Euxoa missoria* (Devitt et Smith, 1982) contre neuf sensilles apicales chez *B. mori*. Les études ultrastructurelles et électrophysiologiques montrent que les sensilles apicales ont des innervations multiples et réagissent aux stimuli mécaniques gustatifs et olfactifs (Wieczorek, 1976 ; Albert, 1980).

La galea de *B. mori* comprend trois sensilles styloconiques (Ss1, Ss2 et Ss3), deux sensilles trichodées (St1 et St2) et une seule sensille chaetique (Sc). Les études électrophysiologiques des sensilles styloconiques de la maxille de *B. mori* confirment que la sensille styloconique Ss1 est sensible aux sucres tandis que l'autre (Ss2) est sensible à l'eau (Ishikawa et coll., 1963 ; Ishikawa et Hirao, 1965 ; Ishikawa, 1966 ; Tazima, 1978). Des études portant sur d'autres lépidoptères confirment que les récepteurs sensoriels ont une fonction gustative et réagissent aux sucres, aux acides aminés, aux sels et aux substances des plantes secondaires (Wieczorek, 1976 ; Albert, 1980 ; Ave, 1981 ; Dethier et Kuch, 1971 ; Baker et coll., 1986). Les récepteurs sensoriels des palpes labiaux de *B. mori* sont des mécanorécepteurs similaires à ceux de *Choristoneura fumiferana* (Albert, 1980).

EVALUATION AND UTILIZATION OF SPECIFIC HYBRIDS OF THE MULTIVOLTINE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L., IN UNFAVOURABLE SEASONS OF WEST BENGAL

S. CHATTOPADHYAY*, S.K. DAS, G.C. ROY, N.K. DAS, S.K. SEN & T. PAVAN KUMAR

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

Studies on the evaluation and utilization of two specific silkworm hybrids and their reciprocals were undertaken in unfavourable seasons of West Bengal conditions. The performance data of two multivoltine hybrids, their reciprocals and parents were analyzed in different seasons. Heterosis of four hybrids (including reciprocals) in respect of survival rate and shell weight were calculated over both mid-parent and better parent values. The overall analysis of experimental data indicates that $N \times G$ and its reciprocal and $N \times OS-616$ and its reciprocal can be utilized for 'Jaistha' (May-June) and 'Bhaduri' (August-September) cocoon crop seasons of West Bengal, respectively.

Keywords: *Bombyx mori* L., heterosis breeding, seasonal races, reciprocal crosses.

INTRODUCTION

Hybrids of silkworms are superior to their parents in respect of silk production, which depends on the survival rate and cocoon shell weight of a particular breed or hybrid. The hybrid era in the sericulture industry in India commenced as early as 1922 in the State of Karnataka where hybrids of Pure Mysore and *C. nichi* combinations were very popular with the farmers of Karnataka (Nanavathy, 1965). Earlier, studies were undertaken to estimate the yield performance and genetic basis of various quantitative traits in hybrid combinations of Nistari and some local multivoltine breeds available (Krishnaswami *et al.*, 1964; Sengupta *et al.*, 1971); they have, however, not been commercially used. The indigenous multivoltine breed (Nistari) with poor qualitative and quantitative characters is widely reared by commercial rearers of West Bengal. With a view to replacing the indigenous race, hybrid combinations of Nistari (N) with G and OS-616 have been recommended by our Institute for unfavourable cocoon crop seasons, i.e. 'Jaistha', or dry summer (May-June), and 'Bhaduri', or wet summer (August-September).

Thus, in order to establish season-specific hybrid utilization, the present study was undertaken to determine the season-wise performance and extent of heterotic expression in respect of the survival rate, a character related to the disease resistance and healthiness of a breed/hybrid, and cocoon shell weight in different unfavourable seasons of West Bengal.

MATERIALS AND METHODS

Multivoltine silkworm races, i.e., Nistari (N), G and OS-616, were used for the present study and the various hybrids tested were $N \times G$ and $N \times OS-616$ and their reciprocals, $G \times N$ and $OS-616 \times N$. Rearing tests were conducted with three replications, each having 300 larvae in each combination, following the standard rearing technology.

* Present address: Entomology Unit, Department of Forest Science, Faculty of Forestry, Birsa Agricultural University, Kanke, Ranchi - 834 006, Bihar, India.

As such, for the present study, rearings during two unfavourable seasons, i.e., 'Jaistha', or dry summer (May-June), and 'Bhaduri', or wet summer (August-September), were considered consecutively and observations were recorded for the survival rate (SURV %) and single shell weight (SSW). Data were statistically analyzed in terms of heterosis over mid- and better parent values.

RESULTS AND DISCUSSION

The mean performance data for four hybrids along with their parents in two unfavourable cocoon crop seasons, i.e., 'Jaistha', or dry summer (May-June), and 'Bhaduri', or wet summer (August-September), are presented in Table I and the heterosis percentage over mid- and better parent values (MPV and BPV) are furnished in Table II.

Table I. Mean values of silkworm hybrids and their parents in unfavourable seasons.

Tableau I. Valeurs moyennes chez des hybrides de ver à soie et chez leurs parents au cours de saisons défavorables.

Race/Hybrid Race/Hybride	Jaistha (May-June) Jaistha (Mai-juin)		Bhaduri (August-September) Bhaduri (Août-septembre)	
	SURV %	SSW	SURV %	SSW
N × G	76.01	0.128	82.12	0.166
G × N	86.01	0.127	79.86	0.159
N × OS-616	91.26	0.149	66.36	0.209
OS-616 × N	96.94	0.163	68.99	0.196
N	65.31	0.087	68.23	0.109
G	61.42	0.130	60.01	0.142
OS-616	58.66	0.162	57.84	0.187
CD at 5%	11.62	0.019	3.71	0.028
CD at 1%	16.13	0.026	5.14	0.040

N: Nistari; SURV %: survival rate; SSW: single shell weight; CD: critical difference.

N: Nistari; SURV %: taux de survie; SSW: poids de la coque; CD: seuil.

Among the four hybrids, the survival rate was found to be maximum in OS-616 × N (96.94%), followed by its reciprocal, N × OS-616 (91.26%), in the 'Jaistha' crop season of West Bengal, whereas in the other unfavourable crop season, 'Bhaduri', it was maximum in N × G (82.12%), followed by its reciprocal, G × N, (79.86%). The single shell weight (SSW) was maximum in OS-616 × N (0.163), followed by N × OS-616 (0.149) in the 'Jaistha' crop season but it was observed to be maximum in N × OS-616 (0.209), followed by OS-616 × N (0.196) in the 'Bhaduri' crop season of West Bengal. Significant positive heterotic effects over mid- and better parents in respect of survival rate (SURV %) were observed in N × OS-616 and its reciprocal in the 'Jaistha' crop season and in N × G and its reciprocal in the 'Bhaduri' cocoon crop season.

Table II. Heterosis values of different silkworm hybrids over mid-parent (MPV) and better parental values (BPV) in unfavourable seasons.

Tableau II. Valeurs moyennes de l'hétérosis chez des hybrides de ver à soie par rapport aux valeurs des parents moyens (MPV) et des meilleurs parents (BPV) au cours de saisons défavorables.

Hybrid Hybride		Jaistha (May-June) Jaistha (Mai-juin)		Bhaduri (August-September) Bhaduri (Août-septembre)	
		SURV %	SSW	SURV %	SSW
N × G	MPV	19.96	17.97*	26.51**	32.27**
	BPV	16.38	-1.54	18.89**	16.90
G × N	MPV	35.74**	17.05*	24.56**	26.69*
	BPV	31.69*	-2.31	17.06**	11.67
N × OS-616	MPV	47.23**	19.68**	5.28	42.22**
	BPV	39.73**	-8.02	-2.74	11.76
OS-616 × N	MPV	56.39**	30.92**	41.18**	32.43*
	BPV	48.43**	0.62	30.42*	4.81

N: Nistari; SURV %: survival rate; SSW: single shell weight; CD: critical difference.

N: Nistari; SURV %: taux de survie; SSW: poids de la coque; CD: seuil.

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

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

During the unfavourable seasons, rearers of West Bengal lay emphasis on the survival rate in accepting the silkworm breed/hybrid. Thus N × G and its reciprocal, G × N, and N × OS-616 and its reciprocal, OS-616 × N, are useful for rearing in the 'Bhaduri' (wet summer) and 'Jaistha' (dry summer) seasons of West Bengal, respectively. The information generated from this experiment will justify further use of the hybrids, conforming to the previous recommendation of the Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, West Bengal.

REFERENCES

- KRISHNASWAMI S., JOLLY M.S., SUBBA RAO S. (1964) Diallel analysis of quantitative characters in multivoltine races. *Indian J. Genet. and Plant Breeding*, 24, 213-222.
 NANAVATHY M. (1965) From Grub to Glamour. Central Silk Board, Bombay.
 SENGUPTA K., DUTTA R.K., BISWAS S.N., SINGH B.C. (1971) Studies on the heterosis in multivoltine silkworm (*Bombyx mori* L.). 1. Yield performance of F₁ hybrids of Nistari and four evolved multivoltine breeds. *Indian J. Seric.*, 10, 6-13.

EVALUATION ET UTILISATION D'HYBRIDES SPECIFIQUES DU VER A SOIE POLYVOLTIN *BOMBYX MORI* L. AU COURS DE SAISONS DEFAVORABLES DANS LE BENGALE OCCIDENTAL

S. CHATTOPADHYAY*, S.K. DAS, G.C. ROY, N.K. DAS, S.K. SEN & T. PAVAN KUMAR

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

Des études sur l'évaluation et l'utilisation de deux hybrides spécifiques du ver à soie et de leurs croisements réciproques ont été réalisées au cours de saisons défavorables dans le Bengale occidental. Les données concernant la performance des deux hybrides polyvoltins, de leurs réciproques et de leurs parents ont été analysées en fonction des différentes saisons. L'hétérosis des quatre hybrides (y compris les réciproques) pour ce qui concerne le taux de survie et le poids de la coque a été calculée par rapport aux valeurs des parents médians et des parents supérieurs. L'analyse globale des données expérimentales indique que le croisement N × G et son réciproque peuvent être utilisés pour la saison de récolte "Jaistha" (mai à juin) et que le croisement N × OS-616 et son réciproque peuvent être utilisés pour la saison de récolte "Bhaduri" (août à septembre) dans les conditions du Bengale occidental.

INTRODUCTION

Les hybrides de vers à soie sont supérieurs à leurs parents pour ce qui concerne la production de soie, qui est fonction du taux de survie et du poids de la coque d'une souche ou d'un hybride donné. L'ère de l'utilisation des hybrides dans l'industrie séricicole indienne a débuté dès 1922 dans l'Etat du Karnataka où des hybrides combinant Pure Mysore et *C. nichii* étaient couramment exploités par les fermiers du Karnataka (Nanavathy, 1965). Des études ont déjà été réalisées afin d'évaluer la performance de rendement et la base génétique de divers caractères quantitatifs chez des combinaisons hybrides de Nistari et de certaines souches polyvoltines locales (Krishnaswami et coll., 1964 ; Sengupta et coll., 1971) ; ces croisements n'ont toutefois pas été utilisés à l'échelle commerciale. L'utilisation de la souche polyvoltine indigène Nistari, dont les caractères qualitatifs et quantitatifs sont médiocres, est largement répandue chez les éleveurs commerciaux du Bengale occidental. Afin de remplacer cette race indigène, des combinaisons hybrides de Nistari (N) avec G et OS-616 ont été recommandées par notre Institut pour l'élevage au cours des saisons défavorables, c'est-à-dire "Jaistha", ou été sec (mai à juin), et "Bhaduri" ou été humide (août à septembre).

Afin de mettre au point un plan saisonnier d'utilisation d'hybrides spécifiques, on a donc réalisé une étude sur la performance saisonnière et l'étendue de l'expression hétérotique pour ce qui concerne le taux de survie, caractère lié à la résistance aux maladies et à la vigueur d'une souche ou d'un hybride, et le poids de la coque soyeuse au cours de différentes saisons défavorables du Bengale occidental.

* Adresse actuelle : Entomology Unit, Department of Forest Science, Faculty of Forestry, Birsa Agricultural University, Kanke, Ranchi - 834 006, Bihar, Inde.

MATERIELS ET METHODES

Les races de ver à soie polyvoltines Nistari (N), G et OS-616 ont été utilisées dans cette étude et les différents hybrides testés sont $N \times G$ et $N \times OS-616$, ainsi que leurs réciproques, $G \times N$ et $OS-616 \times N$. Les tests d'élevage ont été effectués en trois réplicats de 300 larves pour chaque combinaison, suivant la technologie standard d'élevage.

Pour cette étude, deux saisons défavorables, à savoir "Jaishta", ou été sec (mai à juin), et "Bhaduri", ou été humide (août à septembre), ont été considérées consécutivement et les observations enregistrées portent sur le taux de survie et la poids de la coque soyeuse. Les données ont été analysées statistiquement afin de déterminer l'hétérosis par rapport aux valeurs du parent médian et du parent supérieur.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les données concernant les performances moyennes des quatre hybrides et de leurs parents au cours de deux saisons d'élevage défavorables, "Jaishta", ou été sec (mai à juin), et "Bhaduri", ou été humide (août à septembre), sont présentées dans le tableau I. Le pourcentage d'hétérosis par rapport aux valeurs du parent médian (MPV) et du parent supérieur (BPV) est donné dans le tableau II.

Parmi les quatre hybrides, le taux de survie est maximal chez $OS-616 \times N$ (96,94 %), devant son réciproque, $N \times OS-616$ (91,26 %) pour la saison "Jaishta" du Bengale occidental ; par contre, pour l'autre saison défavorable "Bhaduri", le taux de survie est maximal chez $N \times G$ (82,12 %), devant son réciproque $G \times N$ (79,86 %). Le poids de la coque soyeuse est maximal chez $OS-616 \times N$ (0.163), devant $N \times OS-616$ (0.149) pour la saison "Jaishta" ; cependant, pour la saison "Bhaduri", le poids de la coque est maximal pour $N \times OS-616$ (0.209) devant $OS-616 \times N$ (0.196). Des effets hétérotiques positifs et significatifs par rapport aux valeurs du parent médian et du parent supérieur pour ce qui concerne le taux de survie ont été observés chez $N \times OS-616$ et chez son réciproque pour la saison de récolte "Jaishta" et chez $N \times G$ ainsi que son réciproque pour la saison de récolte "Bhaduri".

Au cours des saisons défavorables, les éleveurs du Bengale occidental mettent l'accent sur le taux de survie lorsqu'ils choisissent une souche ou un hybride de ver à soie. Aussi, le croisement $N \times G$ et son réciproque, $G \times N$, peuvent être élevés pendant la saison "Bhaduri" (été humide) et le croisement $N \times OS-616$ et son réciproque, $OS-616 \times N$, pendant la saison "Jaishta" (été sec) dans le Bengale occidental. Les renseignements obtenus dans cette expérience permettront de justifier l'utilisation future d'hybrides, conformément aux recommandations du *Central Sericultural Research and Training Institute* de Berhampore, Bengale occidental.

FEEDING ADAPTABILITY OF DIFFERENT SILKWORM VARIETIES TO AN ARTIFICIAL DIET VARYING IN MULBERRY LEAF POWDER CONTENT

WU X.-f., XU J.-l., MIAO Y.-g.

Department of Sericulture, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029, China.

Keywords: Mulberry leaf powder, artificial diet, feeding adaptability, silkworm, *Bombyx mori* L.

INTRODUCTION

In the composition of present artificial diets for the silkworm, mulberry leaf powder accounts for a considerable percentage, which improves the silkworm appetite to the diet but makes it costly. In recent years, scientists have successfully developed low-cost artificial diets in which lower mulberry leaf powder content is one of the most important characteristics. Moreover, with this kind of diet, they have also bred special silkworm varieties — polyphagous varieties that show good adaptability to this kind of diet. Recently, in our research programme, we have hoped to breed polyphagous varieties from those original breeding materials which show good adaptability to artificial diet. The first step we should take is to select out these good breeding materials from many parent varieties. How to evaluate the adaptability of these varieties to artificial diet becomes a very interesting topic. It is known that there are a lot of setae on the body surface of newly hatched larvae (ants). As the setae are very dense, the ants look almost black. Along with the rapid enlargement of the body surface after the ants took the diet, the setae become thinly dispersed. This kind of larva is called 'seta-dispersed larva', while those larvae which did not take any or very little diet keep the same appearance as the ants. Thereby, we can judge whether the larvae have taken the diet or not, i.e. their adaptability, according to the situation of seta dispersion. The seta dispersion rate means the percentage of seta-dispersed larvae in the total. In this paper, we collected 20 parent silkworm varieties and took this index to evaluate their adaptability to an artificial diet varying in mulberry leaf powder content. It became possible for us to find out some good varieties which are promising for breeding into polyphagous varieties.

MATERIALS AND METHODS

1. Silkworm varieties: Twenty parent silkworm varieties were collected.

2. Diet: A simple composition was adopted as follows:

Table I. Composition of the diet.

Mulberry leaf powder	5	10	15	20	25	30	40	50
Cellulose powder	45	40	35	30	25	20	10	0
Basal diet*	50	50	50	50	50	50	50	50
Total	100	100	100	100	100	100	100	100

* Includes: starch 50, sugar 50, cellulose 98.4, sorbic acid 1.2, antiseptics 0.4.

3. Correlation between seta-dispersed larvae and larvae alive after the first moult:

Five silkworm varieties and 100 ($\times 3$) larvae were used for experiments. The number of seta-dispersed larvae and larvae alive after the first moult was determined 24 and 72 hours, respectively, after feeding. The experimental diet contained 25 per cent of mulberry leaf powder.

4. Assessment of the seta-dispersion rate:

Diet preparation: Water was added to the diet (3:1) and the diet was boiled for 30 minutes to kill the pathogens.

Assessment of the seta dispersion rate: The diet was cut into thin slices and the newly hatched larvae were placed on it and reared in the dark at 29 °C and 90% RH. After 24 hours, we assessed the seta dispersion rate of the larvae according to the following formula:

$$\text{Seta dispersion rate} = \frac{\text{Number of seta-dispersed larvae}}{\text{Number of total larvae}}$$

RESULTS

Table II shows that almost all the seta-dispersed larvae within 24 hours after feeding were alive and developed into second instar larvae. This result indicates that there was a very positive correlation between the number of seta-dispersed larvae and the number of larvae alive after the first moult. Therefore, the seta dispersion rate of silkworm larvae can be used as an index to estimate their adaptability to the diet.

Table II. Correlation between the number of seta-dispersed larvae and the larvae alive after the first moult.

Tableau II. Corrélation entre le nombre de larves à soies dispersées et le nombre de larves vivantes après la première mue.

Varieties	Number of newly-hatched larvae	Number of seta-dispersed larvae	Number of larvae alive after 1st moult
<i>Variétés</i>	<i>Nombre de larves néonates</i>	<i>Nombre de larves à soies dispersées</i>	<i>Nombre de larves vivantes après la 1ère mue</i>
Chunxiao	100	10	10
P301	100	16	16
Haoyue	100	9	9
Kuming	100	50	49
Peiyun	100	70	70

Table III. Feeding adaptability of different silkworm varieties to the diet: larval seta dispersion rate within 24 hours.

Tableau III. Adaptation de différentes variétés de vers à soie à l'aliment artificiel : taux de dispersion des soies larvaires en 24 heures.

Varieties Variétés	Mulberry leaf powder content (%) Contenu en poudre de feuilles de mûrier (%)							
	5	10	15	20	25	30	40	50
Longxi	0	0	0	0	0	0	3.7	16.5
D7	0	0	0	0	0	0	8.8	22.2
J901	0	0	0	0	0	13.5	24.4	68.8
Chunxiao	0	0	0	0	0	15.6	56.3	86.0
Qiaofeng	0	0	0	0	10.0	31.0	41.7	66.7
Fangshan	0	0	0	2.2	15.5	45.9	92.5	98.4
P301	0	0	0	2.4	16.1	23.8	37.9	56.8
Chunlai	0	0	0	5.3	13.0	10.3	44.9	62.6
Sun	0	0	0	5.9	10.8	14.8	39.1	35.8
Suhua	0	0	0	5.9	13.6	66.7	69.0	79.2
J911	0	0	0	6.5	19.4	50.0	51.7	78.3
C8420	0	0	0	9.1	7.4	9.3	29.7	51.3
354	0	0	3.9	9.3	9.4	23.3	62.5	84.6
C901	0	0	7.1	15.6	17.7	37.1	48.6	66.7
Haoyue	0	0	10.3	15.1	9.1	25.0	60.4	77.4
Kuming	0	3.3	10.5	45.7	50.0	66.7	70.5	80.0
Xinggu	0	16.1	16.0	29.0	38.9	45.7	58.3	76.0
A01	0	17.1	20.0	29.4	45.9	50.0	89.2	92.9
Peiyun	0	22.2	68.4	72.7	70.6	86.9	92.7	92.9
Qintu	4.8	34.5	64.3	66.4	76.7	89.7	93.5	98.9

Among the 20 silkworm varieties, there were significant differences in the feeding adaptability to the artificial diet. In general, they had a good adaptability to the diet with a higher content of mulberry leaf powder, but in some varieties such as Longxi and D7 the seta dispersion rate was very low, even with the 50% mulberry leaf powder diet. This suggests that they cannot adapt to the diet well. For the diet which had the lowest content of mulberry leaf powder, most of the 20 varieties showed poor adaptability, while five varieties, Kuming, Xingu, A01, Peiyun, Qintu, showed better adaptability, especially Qintu, gave a certain seta dispersion rate, even when fed on the diet which contained only 5% mulberry leaf powder. Therefore, these five varieties, especially Qintu, prove promising for breeding a polyphagous silkworm variety.

REFERENCES

- HAMANO K., YAMAMOTO T., MUKAIYAMA F. (1985) Relationship between preference to artificial diet and feeding habit of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Sericult. Sci. Japan, 54(6), 495-499.
 WU X.-f., XU J.-l. (1992) Studies on the young silkworm rearing with artificial diet. Bull. of Seric., 23(3), 42-43.

ADAPTATION DE DIFFERENTES VARIETES DE VER A SOIE A UN ALIMENT ARTIFICIEL EN FONCTION DU CONTENU EN POUDRE DE FEUILLES DE MURIER

WU X.-f., WU J.-l., MIAO Y.-g.

Department of Sericulture, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029, Chine.

INTRODUCTION

La feuille de mûrier entre pour une part importante dans la composition des aliments artificiels pour vers à soie existant actuellement ; ceci favorise l'appétit du ver à soie mais rend l'aliment onéreux. Depuis quelques années, les chercheurs ont réussi à élaborer des aliments artificiels à faible coût dont l'une des caractéristiques les plus importante est le pourcentage faible de poudre de feuilles de mûrier. Ils sont en outre parvenus à sélectionner des variétés de ver à soie spécifiques polyphages et montrant une bonne capacité d'adaptation à cet aliment. Dans le cadre de notre programme de recherche, nous souhaitons sélectionner des variétés polyphages à partir de matériels originaux de sélection présentant une bonne capacité d'adaptation à l'aliment artificiel. La première étape de ce programme consiste à identifier ces matériels de sélection à partir d'un grand nombre de variétés parentales. Le processus d'évaluation de l'adaptation de ces variétés à l'aliment artificiel est un sujet d'un grand intérêt. On sait qu'il existe un grand nombre de soies sur la surface du corps des larves néonates (fourmis). Lorsque les soies sont très denses, les fourmis paraissent presque noires. Chez les larves acceptant l'aliment artificiel, la surface du corps s'agrandit rapidement du fait de la prise de nourriture et les soies deviennent moins denses et se dispersent. Ce type de larve est appelé "larve à soies dispersées" tandis que les larves qui n'acceptent pas l'aliment artificiel, ou en consomment peu, conservent leur apparence initiale de fourmis. Il est ainsi possible d'évaluer le nombre de larves ayant consommé l'aliment artificiel, en d'autres termes, leur capacité d'adaptation, en fonction de l'état de dispersion des soies. Le taux de dispersion des soies correspond au pourcentage total de larves à soies dispersées. Dans cet article, nous avons prélevé 20 variétés parentales de ver à soie et avons utilisé cet indice pour évaluer leur adaptation à un aliment artificiel en fonction de son contenu en poudre de feuilles de mûrier. Il nous a ainsi été possible d'identifier des variétés prometteuses pouvant servir de base pour une sélection de variétés polyphages.

MATERIELS ET METHODES

- 1. Variétés de ver à soie :** Vingt variétés parentales de ver à soie ont été utilisées.
- 2. Aliment artificiel :** On a adopté une composition simple décrite ci-dessous :

Tableau I. Composition de l'aliment artificiel.

Poudre de feuilles de mûrier	5	10	15	20	25	30	40	50
Poudre de cellulose	45	40	35	30	25	20	10	0
Aliment de base*	50	50	50	50	50	50	50	50
Total	100	100	100	100	100	100	100	100

* amidon 50 ; sucre 50 ; cellulose 98,4 ; acide sorbique 1,2 ; antiseptiques 0,4.

3. Corrélation entre le nombre de larves à soies dispersées et le nombre de larves vivantes après la première mue :

Cinq variétés de vers à soie et 100 (×3) larves ont été utilisées pour cette expérience. Le nombre de larves à soies dispersées et le nombre de larves vivantes après la première mue ont été déterminés respectivement 24 heures et 72 heures après le nourrissage. L'aliment expérimental contient 25 % de poudre de feuilles de mûrier.

4. Evaluation du taux de dispersion des soies :

Préparation de l'aliment : Après addition d'eau (3:1), l'aliment a été porté à ébullition pendant 30 minutes pour éliminer les agents pathogènes.

Evaluation du taux de dispersion des soies : Les larves néonates ont été déposées sur l'aliment coupé en tranches fines et élevées dans l'obscurité à 29 °C et 90 % d'humidité relative. Après 24 heures, nous avons évalué le taux de dispersion des soies d'après la formule suivante :

$$\text{Taux de dispersion des soies} = \frac{\text{Nombre de larves à soies dispersées}}{\text{Nombre total de larves}}$$

RESULTATS

Le tableau II montre que toutes les larves à soies dispersées après 24 heures de nourrissage sont vivantes et passent au deuxième âge. Ce résultat indique qu'il y a une corrélation fortement positive entre le nombre de larves à soies dispersées et le nombre de larves vivantes après la première mue. Le taux de dispersion des soies chez les larves de *Bombyx mori* peut donc être utilisé comme indice pour estimer leur capacité d'adaptation à l'aliment artificiel.

Il y a des différences significatives d'adaptation à l'aliment artificiel entre les 20 variétés de ver à soie. En général, elles présentent une bonne capacité d'adaptation à l'aliment artificiel ayant un contenu élevé en poudre de feuilles de mûrier mais, chez certaines variétés comme Longxi et D7, le taux de dispersion des soies est très faible même avec l'aliment contenant 50 % de poudre de feuilles de mûrier. Ceci suggère que ces variétés acceptent mal l'aliment artificiel. La plupart des 20 variétés présentent une capacité d'adaptation médiocre à l'aliment contenant la quantité la plus faible de poudre de feuilles de mûrier. En revanche, cinq variétés, Kuming, Xingu, A01, Peiyun et Qintu, présentent une meilleure capacité d'adaptation, en particulier Qintu qui donne un certain taux de dispersion des soies même après nourrissage avec l'aliment contenant seulement 5 % de poudre de feuilles de mûrier. Ces cinq variétés, en particulier Qintu, s'avèrent prometteuses pour la sélection d'une variété de ver à soie polyphage.

AMINO ACID ANALYSIS OF THE COCOON OF *CRICULA TRIFENESTRATA*, A PEST OF THE *ANTHERAEA ASSAMA* HOST PLANT, *MACHILUS BOMBYCINA*

B.G. UNNI

Biochemistry Department, Regional Research Laboratory, Jorhat - 785006, Assam, India.

Cricula trifenestrata occurs as a pest specially on the muga host plant, som (*Machilus bombycina*). The loosely webbed, perforated and golden bright coloured cocoon is formed between the leaves. Sixteen amino acids are reported, with a higher concentration of aspartic acid, serine, glycine, alanine, tyrosine and arginine. Threonine, glutamic acid, proline, cysteine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine, histidine and lysine are at a low concentration.

Keywords: Amino acids, cocoon, *Cricula trifenestrata*, *Machilus bombycina*.

INTRODUCTION

Cricula trifenestrata and *Cricula endrei*, locally known as 'Amphutukoni muga', occur as pests mostly on som trees, sometimes defoliating the entire tree. As a result, it prevents the rearing of the muga silkworm. *Cricula* is the smallest moth belonging to the family Saturniidae. Its larvae found in mango trees were found to be defoliating the entire trees at a site in Tamil Nadu (Singh, 1992). It is a polyphagous insect and feeds on more than ten plants in addition to muga host plants (Gupta *et al.*, 1993). The presence of cellulases in a phytophagous lepidopteran, the eri silkworm, *Philosamia ricini*, has been reported quite recently by Pant and Ramana (1989). The muga silkworm, *Antheraea assama*, is generally known to grow on a specific range of host plants, the primary being som (*Machilus bombycina*), and a few other secondary host plants. The common occurrence of this pest on som plants causes a competition to muga larvae to feed on the plants. Since the dietary source of this pest, *Cricula trifenestrata*, and of *Antheraea assama* is the same and are grown on the same plants, an attempt was made to study the amino acid composition of the cocoon of this pest.

MATERIALS AND METHODS

The cocoon of *C. trifenestrata* was thoroughly washed with a very mild soap solution and absolute ethanol and dried in an oven at 40-50 °C for about an hour. The dried samples were hydrolysed by the standard acid method using 6N HCl at 110 °C for 22 hours. Protection was done for cysteine, methionine and tyrosine using proper protecting reagents. The amino acid analysis was done at the Centre for Cellular and Molecular Biology, Hyderabad, by Pharmacia LKB Alpha Plus Amino Acid analyser.

RESULTS AND DISCUSSION

The cocoon of *C. trifenestrata* is formed between two leaves, sometimes singly and more often in clusters. The cocoons are loosely webbed with perforations on all sides. The results, shown in Table I, revealed higher concentrations of six amino acids, i.e. aspartic acid, serine, glycine, alanine, tyrosine and arginine, and low levels of threonine, glutamic acid, proline, cysteine, valine, isoleucine,

leucine, phenylalanine, histidine and lysine. The S-containing amino acid, methionine, was not detected. The amino acid composition of the silk fibres of muga silkworms fed on som plants has the same pattern (Unni *et al.*, 1995) as that observed in the cocoon of *C. trifenestrata*. It was observed that the shape, size and colour of the cocoon of *C. trifenestrata* was different from that of the cocoon of *A. assama*. Although the composition of the amino acids was found to be the same, the level of some amino acids such as serine, alanine, valine, leucine, phenylalanine are recorded to be higher in the cocoon. This finding also suggests that the source of the amino acids for silk protein biosynthesis

Table I. Amino acid composition of the cocoon.

Tableau I. Composition du cocon en acides aminés.

Amino acid / Acide aminé	Concentration*
Aspartic acid / Acide aspartique	22.154
Threonine / Thréonine	6.897
Serine / Sérine	44.452
Glutamic acid / Acide glutamique	5.652
Proline	0.994
Glycine	68.614
Alanine	65.619
Cysteine / Cystéine	0.332
Valine	5.523
Methionine / Méthionine	-
Isoleucine	1.582
Leucine	7.064
Tyrosine	15.233
Phenylalanine / Phénylalanine	3.825
Histidine	2.496
Lysine	1.639
Arginine	10.328

* nanomole per 40 microgram cocoon powder / nanomole pour 40 microgrammes de cocon pulvérisé.

by *A. assama* or the cocoon of *C. trifenestrata* is derived from the host plant, som (*M. bombycina*), and did not make any difference in the mechanism of biosynthesis and the transport of amino acids for silk synthesis. The presence of nutritional substances available from plants, as elucidated here, the amino acid composition and other parameters such as sugars, etc. also play a decisive role in the choice of food by the insects and pests. According to Nair *et al.* (1982), the selection of food, the affinity of specific plant protein and some other attractive substances such as glucosides, essential oil, alkaloid saponins, tannins, etc., provide odour and tastes to insects and pests. The higher concentrations of tannins, fatty acid profiles and sugars in muga host plants in our studies support this observation (Unni, 1994). The silk produced by the larva is found to be very thin and soft. The cocoon is loosely webbed with perforations on all sides and has a bright golden colour (Chaudhury, 1982). This larva can be exploited as a good genetic material for further studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author is grateful to the Director, Regional Research Laboratory, Jorhat, for permission to communicate this paper and to Mr Abijit Katakya for technical assistance.

REFERENCES

- CHAUDHURY S.N. (1982) *In* Muga Silk Industry. Dir. of Seric. & Weaving, Gauhati, Assam.
- GUPTA B.K., CHATTERJEE K.K., HEMBRAM I. (1993) *Cricula*, a wild silkworm of Kishangang. Indian Silk, 32(7), 48.
- NAIR K.K., ANTHAKRISHNAN T.N., DAVID B.V. (1982) *In* Insects and Host Plants. *In* General and Applied Entomology. Tata McGraw Hill Publishing Co. Ltd., New Delhi.
- PANT R., RAMANA D. (1989) Cellulolytic activity in a phytophagous lepidopteran insect, *Philosamia ricini* – the origin of the enzymes. Insect Biochem., 19(3), 269.
- UNNI B.G. (1994) Biochemical studies on Muga silkworm, *Antheraea assama*, and host plants. Entomological Soc. of America, Annual Conf., Dallas, Texas, USA, Dec. 13-17. Abstract (Section B).
- SINGH S.P. (1992) Frequent outbreaks of *Cricula trifenestrata* on mangoes. Indian J. Plant Protection, 20, 114-115.
- UNNI B.G., DEKA P.C., HAZARIKA L.K., KATAKY A. (1995) Amino acid composition of silk fibres of muga silkworm, *Antheraea assama* Westwood, in relation to host plants. Indian J. Comp. Animal Physiol., 12(2).

ANALYSE DES ACIDES AMINES DU COCON DE *CRICULA TRIFENESTRATA*, PARASITE DE *MACHILUS BOMBYCINA*, PLANTE HÔTE D'*ANTHERAEA ASSAMA*

B.G. UNNI

Biochemistry Department, Regional Research Laboratory, Jorhat - 785006, Assam, Inde.

Cricula trifenestrata est un parasite infestant en particulier la plante hôte muga som (*Machilus bombycina*). Le cocon, de texture lâche, perforé et de couleur dorée, est filé entre les feuilles. On a observé seize acides aminés, avec des concentrations élevées en acide aspartique, en sérine, en glycine, en alanine, en tyrosine et en arginine. La thréonine, l'acide glutamique, la proline, la cystéine, la valine, l'isoleucine, la leucine, la phénylalanine, l'histidine et la lysine sont présents en faibles concentrations.

INTRODUCTION

Cricula trifenestrata et *Cricula endrei*, localement appelés "Amphutukoni muga" sont des parasites infestant principalement *Machilus bombycina*, parfois défoliant entièrement l'arbre infesté et rendant ainsi impossible l'élevage du ver à soie muga. *Cricula* est le plus petit des papillons de la famille des saturniidés. On a observé que des larves de cet insecte présentes sur des manguiers avaient défolié entièrement la plantation d'un site du Tamil Nadu (Singh, 1992). C'est un insecte polyphage qui peut se nourrir sur plus de dix plantes, outre la plante hôte muga (Gupta et coll., 1993). La présence de cellulase chez un lépidoptère phytophage, le ver à soie eri *Philosamia ricini*, a été observée récemment par Pant et Ramana (1989). On sait que le ver à soie muga *Antheraea assama* possède un nombre limité de plantes hôtes, la plante primaire étant som (*Machilus bombycina*) et quelques autres plantes nourricières secondaires. La présence simultanée de ce parasite sur les plants de som occasionne une compétition pour la nourriture avec les larves muga. Etant donné que *Cricula trifenestrata* et *Antheraea mylitta* ont la même source alimentaire et qu'ils vivent sur les mêmes plantes, nous avons étudié la composition en acides aminés du cocon du parasite.

MATERIELS ET METHODES

Les cocons de *C. trifenestrata* ont été lavés soigneusement avec une solution de savon très faiblement concentrée et de l'éthanol absolu puis séchés au four à une température de 40 à 50 °C pendant environ une heure. Les échantillons séchés ont été hydrolysés à l'acide selon la méthode standard avec du 6N HCl pendant 22 heures. La cystéine, la méthionine et la tyrosine ont été protégées avec les réactifs de protection appropriés. L'analyse des acides aminés a été réalisée au Centre for Cellular and Molecular Biology (Hyderabad) à l'aide d'un analyseur d'acides aminés Pharmacia LKB Alpha Plus.

RESULTATS ET DISCUSSION

C. trifenestrata file son cocon entre deux feuilles, parfois séparément et le plus souvent en grappes. Les cocons ont une texture lâche et sont perforés de tous côtés. Les résultats présentés dans le tableau I font apparaître des concentrations élevées en acide aspartique, en sérine, en glycine, en

alanine, en tyrosine et en arginine et de faibles concentrations en thréonine, en acide glutamique, en proline, en cystéine, en valine, en isoleucine, en leucine, en phénylalanine, en histidine et en lysine. La méthionine, acide aminé soufré, n'a pas été détectée. La composition en acides aminés des fibres de soie des vers à soie muga nourris avec *Machilus bombycina* présente le même profil (Unni et coll., 1995) que celui observé chez le cocon de *C. trifenestrata*. La forme, la taille et la couleur du cocon de *C. trifenestrata* sont différentes de celles du cocon d'*A. assama*. Bien que la composition en acides aminés soit la même, la concentration de certains acides aminés comme la sérine, l'alanine, la valine, la leucine et la phénylalanine est plus élevée dans le cocon. Ce résultat suggère que la source des acides aminés nécessaires à la biosynthèse des protéines de la soie chez *A. assama* et chez le cocon de *C. trifenestrata* est dérivée de la plante hôte som (*M. bombycina*) et qu'il n'y a aucune différence dans le mécanisme de biosynthèse ou le transport des acides aminés pour la synthèse de soie. La présence de substances nutritives dans les plantes, telle que mise en évidence dans cette étude, la composition en acides aminés et d'autres paramètres comme les sucres, etc., jouent également un rôle déterminant dans le choix de la nourriture par les insectes et les parasites. D'après Nair et coll. (1982), la sélection de la nourriture et l'affinité pour une protéine spécifique d'une plante sont basées sur certaines substances appétantes comme les glucosides, les huiles essentielles, les saponines alcaloïdes, les tanins, etc., qui dégagent des odeurs et des goûts attirant les insectes et les parasites. Les concentrations élevées en tanins, en acides gras et en sucres observées chez les plantes hôtes muga corroborent cette observation (Unni, 1994). La soie produite par la larve est très fine et molle. Le cocon a une texture lâche, des perforations de tous côtés et est de couleur dorée (Chaudhury, 1982). Cette larve peut constituer un matériel génétique intéressant pour d'autres études.

BIBLIOGRAPHIE - BIBLIOGRAPHY

Sériciculture générale	180
General sericulture	
Mûrier	182
Mulberry	
<i>Bombyx mori</i> : élevage, nutrition, pathologie	185
<i>Bombyx mori</i> : rearing, feeding, pathology	
Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie	189
Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology	
Vers à soie : génétique	191
Silkworms: genetics	
Vers à soie : physiologie, biochimie	193
Silkworms: physiology, biochemistry	
Vers à soie : oeufs, embryologie	196
Silkworms: eggs, embryology	
Glandes séricigènes	198
Silk glands	
Soie	199
Silk	

INDICATIFS DES LANGUES UTILISEES - LANGUAGE SYMBOLS USED

(Bg) Bulgare / <i>Bulgarian</i> .	(C) Chinois / <i>Chinese</i> .
(D) Allemand / <i>German</i> .	(E) Anglais / <i>English</i> .
(F) Français / <i>French</i> .	(J) Japonais / <i>Japanese</i> .
(I) Italien / <i>Italian</i> .	(Pl) Polonais / <i>Polish</i> .
(K) Coréen / <i>Korean</i> .	(R) Russe / <i>Russian</i> .
(Pt) Portugais / <i>Portuguese</i> .	(S) Espagnol / <i>Spanish</i> .
(Ro) Roumain / <i>Rumanian</i> .	

Les lettres minuscules correspondantes sont utilisées pour indiquer la langue du résumé.
The corresponding small letters indicate the language of the abstract.

Sericulture générale

General sericulture

Human labour employment in sericulture - an empirical study in Andhra Pradesh.

L'emploi de la main d'oeuvre en sériciculture : une étude empirique en Andhra Pradesh.

GANAPATHI RAO RATNALA, MALLIKARJUNA B., DATTA R.K.

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

1995 Indian J. Seric., Vol. 34(2), 90-92. (E)

Mulberry nursery raising in Assam.

Les pépinières de mûriers en augmentation dans l'Assam.

GARGI, KUMAR R., CHAKRABORTY R., PRASAD D.N.

PSDP, Varanasi, India.

1996 Indian Silk, Vol. 34(10), 13-14. (E)

Silkworm seed production by LSPs (Licensed Seed Preparers) in Karnataka.

Production des graines de vers à soie par les LSP (préparateurs de graines autorisés) au Karnataka.

HURKADLI H.K., MANGALA NAYAK, DANDIN S.B., VEERESHY S., GURURAJ C.S.

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

1996 Indian Silk, Vol. 34(10), 21-24. (E)

Economics of cocoon production in Bijapur District.

Economie de la production de cocons dans le district de Bijapur.

KERUTAGI M.G., SHANKARA MURTHY H.G.

Agricultural Research Station, University of Agricultural Sciences, Hagari, India.

1996 Indian Silk, Vol. 34(11), 19-20. (E)

Prospects of multi x bivoltine silkworm cross-breeds in Assam.

Perspectives pour des croisements de vers à soie bivoltins et polyvoltins en Assam.

PRASAD D.N., SAHU A.K., PHUKHAN J.D., KUMAR R.

Central Tasar Research and Training Institute, PO Piska Nagri, Ranchi 835 303, Bihar, India.

1996 Indian Silk, Vol. 34(11), 17-18. (E)

CSRTI, Berhampore and its contribution to sericulture.

Le CSRTI de Berhampore et sa contribution à la sériciculture.

SARATCHANDRA B.

Central Sericultural Research and Training Institute, Central Silk Board, Berhampore 742 101, West Bengal, India.

1996 Indian Silk, Vol. 34(10), 8-12. (E)

Mulberry silkworm seed organisation in South Bihar.

Organisation du grainage des vers à soie du mûrier dans le sud du Bihar.

SHARMA S.D., JAYANT JAYASWAL.

Silkworm Seed Production Centre, Ranchi, India.

1996 Indian Silk, Vol. 34(10), 15-16. (E)

Mechanisation of silkworm rearing in Japan.

Mécanisation de l'élevage des vers à soie au Japon.

SINGH G.B.

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

1996 Indian Silk, Vol. 34(10), 25-29. (E)

Bivoltine silkworm breeding in India and Japan - A comparison.

Élevage des vers à soie bivoltins en Inde et au Japon - Une comparaison.

SURESH KUMAR N., YAMAMOTO T.

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

1996 Indian Silk, Vol. 34(10), 5-7, 12. (E)

The silkworm egg in northern provinces (of Vietnam), a problem without the best solution.

Les oeufs de vers à soie dans les provinces du nord du Vietnam, un problème sans bonne solution.

TIEN S.

1993 Nong Nghiep Cong Nghiep Thuc Pham (Vietnam), Vol. 4, 154-155. (V,e)

Silk industry in Brazil.

L'industrie de la soie au Brésil.

VEERAAIAH T.M.

Regional Sericultural Research Station, Salem, India.

1996 Indian Silk, Vol. 34(11), 35-43. (E)

Rajasthan Vidyapeeth: sprinkling success.

Rajasthan Vidyapeeth : un succès respectable.

VINOD SHARMA.

Rajasthan Vidyapeeth, Jhadol, Udaipur, Rajasthan, India.

1996 Indian Silk, Vol. 34(11), 6. (E)

Discussions on the distribution of sericulture in South Hebei.

Discussions sur la distribution de la sériciculture dans le sud du Hebei.

WU F.

Department of Economic Forests, Hebei Forestry College, Baoding, China.

1994 Journal of Hebei Forestry College (China), Vol. 9(1), 70-73. (C,e)

Studies on the labour-saved rearing of grown silkworm larvae.

Études sur l'économie de main d'oeuvre dans l'élevage des larves de vers à soie matures.

ZHANG Z.

Haiyan County Bureau of Agriculture and Forestry, Zhejiang, China.

1994 Bulletin of Sericulture, Vol. 25(1), 31-32. (C)

Mûrier

Mulberry

Modèles pour une estimation rapide de la biomasse foliaire de *Morus alba* (cv Kokuso 21) croissant en confitions diverses.

Models for a quick estimation of leaf biomass in *Morus alba* (cv Kokuso 21) grown under different conditions.

ARMAND D.

INRA, Unité d'Ecodéveloppement, Domaine Saint Paul, BP 91, 84143 Montfavet Cedex, France.

1994 *Cahiers Options Méditerranéennes (CIHEAM)*, Vol. 4, 77-83. (F)

Evaluation of leaf quality of some germplasm genotypes of mulberry through chemical analysis and bioassay with silkworm, *Bombyx mori* L.

Evaluation de la qualité des feuilles de quelques génotypes de la banque génétique du mûrier par des analyses chimiques et des tests biologiques avec le ver à soie *Bombyx mori* L.

CHALUVACHARI, BONGALE U.D.

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Bangalore 560 062, India.

1995 *Indian J. Seric.*, Vol. 34(2), 127-132. (E)

Studies on the preservation and reproduction of pathogens of mulberry yellow dwarf disease with tissue culture method.

Etudes sur la conservation et la reproduction des pathogènes de la maladie du nanisme jaune du mûrier avec une méthode de culture des tissus.

CHEN P., KUAI Y., XIA Z.

Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China.

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(1), 5-8. (C,e)

Cultivation of mulberries. / Cultivo de la morera.

Culture des mûriers.

CRUZ FLORES C.

Instituto Nacional de Investigacion Agraria, Proyecto Transformacion de la Tecnologia Agropecuaria, Lima, Peru.

1993 *Serie Manual - Instituto Nacional de Investigacion Agraria (Peru)*, N 14. (S)

Varietal and seasonal incidence of bacterial leaf blight disease of mulberry caused by *Pseudomonas mori* (Boyer et Lambert) Stevens.

Incidence variétale et saisonnière de la maladie bactérienne de la rouille des feuilles du mûrier causée par *Pseudomonas mori* (Boyer et Lambert) Stevens.

GANGWAR S.K., THANGAVELU K.

Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore 742 103, India.

1995 *Indian J. Seric.*, Vol. 34(2), 110-113. (E)

Seasonal changes and regional differences in the sprouting ability of mulberry lateral buds.

Variations saisonnières et différences régionales dans la capacité de débourrement des bourgeons latéraux du mûrier.

ITO D., SEGAWA H.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1995 Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci., Vol. 15, 147-158. (J,e)

Development of riding type of full row mulberry shoot harvester with binding device.

Développement d'une machine motorisée pour récolter les branches de mûriers en pleine rangée avec un mécanisme d'attache.

KURIBAYASHI S., ICHIKAWA A., NAOI T.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1995 Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci., Vol. 15, 23-32. (J,e)

Studies on the soil quality and manure for mulberry fields. I Effects of soil manure on cocoon filament.

Etudes sur la qualité du sol et la fumure pour les mûraies. I. Effets de la fumure sur le filament du cocon.

LI M.

College of Forestry, Shandong Agricultural University, Taian, China.

1994 Journal of Hebei Forestry College (China), Vol. 9(4), 305-308. (C,e)

A study on shoot apex grafting of mulberry *in vitro*.

Une étude sur les greffes *in vitro* des apexes des pousses de mûriers.

MA F., GUO C., LI M., MA T., LIU Y.

Shaanxi Institute for the Loess Plateau Control, Yanling 712100, China.

1996 Canye Kexue, Vol. 22(1), 1-4. (C,e)

High-yielding BC259 mulberry variety is suitable for Darjeeling hills.

La variété de mûriers à haut rendement BC259 convient à la région des collines de Darjeeling.

MISRA A.K., DAS B.K., AHSAN M.M.

Regional Sericultural Research Station, Central Silk Board, Darjeeling, India.

1995 Indian Farming (India), Vol. 44(11), 30-31. (E)

Development of mulberry harvesting system suitable for frequent silkworm rearing.

Développement d'un système de récolte des mûriers adapté aux élevages fréquents du ver à soie.

NAOI T., KOBAYASHI T.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1995 Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci., Vol. 15, 7-21. (J,e)

Studies on the transpiration characteristics of mulberry plants. 2. Hourly changes of transpiration and exudation in potted mulberry plants.

Etudes sur les caractéristiques de transpiration des mûriers. 2. Variations horaires de transpiration et exsudation des mûriers en pot.

RAMA KANT, NAOI T.

National Institute of Sericulture and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1995 Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci., Vol. 15, 107-117. (J,e)

A preliminary study on the characteristics and regulation of accumulation of starch and sucrose in chlorotic mulberry leaves resulted from iron deficiency.

Une étude préliminaire sur les caractéristiques et la régulation de l'accumulation d'amidon et de saccharose dans les feuilles de mûriers chlorotiques résultant d'un manque en fer.

SU G. *et al.*

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(1), 53-54. (C)

Intensity of mulberry powdery mildew in West Bengal with some measures to control.

Intensité du mildiou poudré du mûrier au Bengale occidental avec quelques mesures de contrôle.

SUBRATA BISWAS, MANDAL S.K., TEOTIA R.S., NAIR B.P., SENGUPTA K.

Regional Sericultural Research Station, Kalimpong 734 301, India.

1995 *Indian J. Seric.*, Vol. 34(2), 114-117. (E)

Rapid *in vitro* multiplication of high yielding mulberry (*Morus* sp.) genotypes V1 and S34.

Multiplication rapide *in vitro* des génotype V1 et S34 des mûriers (*Morus* sp.) à haut rendement.

TEWARY P.K., SARKAR A., VINEET KUMAR, CHAKRABORTI S.

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

1995 *Indian J. Seric.*, Vol. 34(2), 133-136. (E)

***Pestalotiopsis disseminata* (Thum.) Steyaert - a new pathogen on mulberry.**

Pestalotiopsis disseminata (Thum.) Steyaert - un nouveau pathogène du mûrier.

TOMY PHILIP, GOVINDAIAH.

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

1995 *Indian J. Seric.*, Vol. 34(2), 159-160. (E)

Some observations on the incidence, associated microflora and control of root-rot disease of mulberry in South India.

Quelques observations sur l'incidence, la microflore associée et le contrôle de la maladie du pourrissement des racines du mûrier dans le sud de l'Inde.

TOMY PHILIP, LATHA JANARDHAN, GOVINDAIAH, MALLIKARJUNA B., MANDAL K.C., BAJPAI A.K.

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

1995 *Indian J. Seric.*, Vol. 34(2), 137-139. (E)

Peroxidase isoenzyme studies in triploids of mulberry (*Morus* sp.).

Etudes des isoenzymes de la peroxydase chez les triploïdes du mûrier (*Morus* sp.).

VENKATESWARU M., SUSHEELAMMA B.N., RAJAN M.V., TEWARY P.K., SARKAR A.

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

1995 *Indian J. Seric.*, Vol. 34(2), 153-155. (E)

Influence of soil moisture effect of the double furrow project on the growth of mulberry tree in the hilly red soil.

Influence de l'effet de l'humidité du sol du projet du double sillon sur la croissance des mûriers sur le sol rouge des montagnes.

ZHANG G., CHEN J., XIAO J.

Department of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, China.

1994 *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis (China)*, Vol. 16(1), 25-32. (C,e)

***Bombyx mori* : élevage, nutrition, pathologie**

***Bombyx mori*: rearing, feeding, pathology**

Correlation studies on different economic and nutritional parameters in *Bombyx mori* L. hybrids.

Etudes de corrélation sur différents paramètres économiques et nutritionnels chez des hybrides de *Bombyx mori* L.

ANANTHA RAMAN K.V., MAGADUM S.B., SHIVAKUMAR G.R., GIRIDHAR K., DATTA R.K.

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

1995 *Indian J. Seric.*, Vol. 34(2), 118-121. (E)

Basic stock multiplication at P4 level.

Multiplication des souches parentales au niveau P4.

BHAT D.V., GOPAL D.M., BASAVARAJ H.K., AHSAN M.M., DATTA R.K.

P4 Basic Seed Farm, Hassan, India.

1996 *Indian silk*, Vol. 34(11), 11-15. (E)

A new method for *Nosema bombycis* spores to infect insect cell lines efficiently.

Une nouvelle façon pour les spores de *Nosema bombycis* d'infecter les lignées de cellules d'insectes efficacement.

CAO G. *et al.*

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(1), 62. (C)

The practice and improvement of silkworm leaf vertical feeding method.

L'utilisation et l'amélioration de la méthode de nourrissage vertical du ver à soie.

CHENG D. *et al.*

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(1), 57-58. (C)

A study on pebrine prevention by using bleaching powder to disinfect mulberry leaves.

Une étude sur la prévention de la pébrine par utilisation de chaux pour désinfecter les feuilles de mûriers.

FEN Y. *et al.*

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(1), 55-56. (C)

Effect of different pruning heights on the mulberry yields and silkworm rearing.

Effet des différentes hauteurs de taille sur les rendements du mûrier et l'élevage des vers à soie.

FOTADAR R.K., ANIL DHAR, SHIVA DHAR, MUKHERJEE P.

Central Sericultural Research and Training Institute, Pampore 180 004, India.

1995 *Indian J. Seric.*, Vol. 34(2), 105-109. (E)

Susceptibility of the races of the silkworm, *Bombyx mori*, preserved in NISES to the nuclear polyhedrosis virus and denonucleosis viruses.

Sensibilité au virus de la polyédrose nucléaire et aux virus denonucéaires des races de vers à soie entretenues au NISES.

FURUTA Y.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1995 *Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci.*, Vol. 15, 119-145. (J,e)

Causes for the death of original silkworm pupae and its control measures.

Causes de la mort des chrysalides de vers à soie et les mesures de contrôle.

GAO X.

Department of Economic Forests, Hebei Forestry College, Baoding, China.

1994 *Journal of Hebei Forestry College (China)*, Vol. 9(3), 236-239. (C,e)

Continuous culture of *Vairimorpha* sp. NIS M12 (Microsporidia: Protozoa) in insect cell lines.

Culture continue de *Vairimorpha* sp. NIS M12 (Microsporidia: Protozoa) dans des lignées de cellules d'insectes.

INOUE S., YOKOTA S., YASUNAGA C., FUNAKOSHI M., KAWARABATA T., HAYASAKA S.

Institute of Biological Control, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-81, Japan.

1995 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 64(6), 512-522. (J,e)

Effect of feeding nitrogen, calcium and potassium treated mulberry leaves on the larval development and silk yield of *Bombyx mori* (L.).

Effet du nourrissage avec des feuilles de mûriers traitées à l'azote, au calcium et au potassium sur le développement larvaire et le rendement en soie chez *Bombyx mori* (L.).

ISHTIAQ A.

Department of Agricultural Entomology, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan.

1993 *Thesis, Faisalabad (Pakistan)*, 170 p. (E)

Antimicrobial effect of each solvent fraction of *Morus alba* Linne, *Sophora flavescens* AITON on *Listeria monocytogenes*.

Effet anti-microbien de chaque fraction de *Morus alba* Linne et *Sophora flavescens* AITON sur *Listeria*.

KIM S.G.

Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Chonju, Korea Republic.

1994 *Korean Journal of Food Science and Technology (Korea Republic)*, Vol. 26(5), 539-544. (K,e)

Development of a machine for separating mulberry leaves from shoots and a rearing bed cleaner with a collector for matured silkworm.

Développement d'une machine à séparer les feuilles de mûriers des pousses et un nettoyeur de litières d'élevage avec un collecteur pour les vers à soie matures.

KURIBAYASHI S., ICHIKAWA A., FURUTA Y., NAOI T.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1995 *Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci.*, Vol. 15, 33-45. (J,e)

Studies on the effect of sucrose as a feed additive in cocoon production.

Etudes sur l'effet du saccharose comme additif alimentaire dans la production de cocons.

LU S., XU J., XIAO Z., MA X.

Department of Sericulture, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou, China.

1994 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 25(2), 18-20. (C)

Effect of feeding silkworm larva with sucrose addition to the mulberry leaves grown under different illumination on the cocoon and silkworm egg.

Effet du nourrissage des larves de vers à soie avec un additif de saccharose aux feuilles de mûriers cultivés sous différents éclairages sur les cocons et les oeufs de vers à soie.

LU S., XU J., ZHU S.

Department of Sericulture, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou, China.

1994 *Journal of Zhejiang Agricultural University (China)*, Vol. 20(3), 292-296. (C,e)

An approach to the application of artificial diet in young silkworm larvae rearing.

Une approche de l'utilisation de l'aliment artificiel pour l'élevage des jeunes vers à soie.

MIAO Y., XU J., WU X.

Department of Sericulture, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou, China.

1994 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 25(2), 13-14. (C)

Newly isolated cytoplasmic polyhedrosis virus (CPV) derived from *Dendrolimus spectrabilis* CPV (DsCPV).

Un nouveau virus de la polyédrose cytoplasmique (CPV), dérivé du CPV de *Dendrolimus spectrabilis* (DsCPV).

NOGUCHI Y.

Saitama-ken Sericultural Experiment Station, Ishihara, Kumagaya, Saitama 360, Japan.

1995 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 64(6), 493-497. (J,e)

Identification of cry V gene from *Bacillus thuringiensis* isolates.

Identification du gène cry V à partir d'isolats de *Bacillus thuringiensis*.

SASAKI J., ASANO S., BANDO H., LAY B.W., HASTOWO S., IIZUKA T.

Laboratory of Applied Molecular Entomology, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(1), 56-61. (J,e)

Pre-disposing factors for viral diseases of the silkworm, *Bombyx mori* L. under agroclimatic conditions of Northern Karnataka.

Facteurs de prédisposition aux maladies virales du ver à soie *Bombyx mori* L. sous les conditions agroclimatiques du Karnataka du Nord.

SAVANURMATH C.J. *et al.*

Department of Post-graduate Studies and Research in Sericulture, Karnatak University, Dharwad 580 003, India.

1995 *Indian J. Seric.*, Vol. 34(2), 93-99. (E)

Studies on the pathogenecity and transovarian transmission of two microsporidia isolated from the *Hemerophela atrilineata* Butler and *Calospilos suspecta* Warren to the silkworm, *Bombyx mori*.

Etudes sur la pathogénie et la transmission transovarienne de deux microsporidies isolées à partir d'*Hemerophela atrilineata* Butler et *Calospilos suspecta* Warren chez le ver à soie *Bombyx mori*.

SHEN A., XU L., LIU T., HUANG K.

Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China.

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(1), 36-41. (C,e)

Measuring method of vomited water on steam boiling part of cocoon cooking machine.

Méthode de mesure de l'eau rejetée par la vapeur de la machine à cuire les cocons.

SHIMIZU S., OHURA M.

Silk Science Research Institute, Shinjyuku, Tokyo 169, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(1), 45-49. (J,e)

Preparation of artificial diets common to *Agrius convolvuli* and *Bombyx mori*.

Préparation des aliments artificiels communs à *Agrius convolvuli* et *Bombyx mori*.

SHIMODA M., KIGUCHI K., MOTEKI N., HAMANO K.

National Institute of Sericultural and Entomological Sci., 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(1), 21-30. (J,e)

First record of *Trichomalopsis apanteloctena* on the uzifly, *Blepharipa zebina* Walker.

Premier enregistrement de *Trichomalopsis apanteloctena* sur la mouche uzi *Blepharipa zebina* Walker.

SINGH R.N., THANGAVELU K.

Central Tasar Research and Training Institute, PO Piska Nagri, Ranchi 835 303, Bihar, India.

1995 *Indian J. Seric.*, Vol. 34(2), 165-166. (E)

Inducing tolerance to grasserie in silkworm, *Bombyx mori* L. by feeding heat-inactivated polyhedra.

L'induction de la tolérance à la grasserie chez le ver à soie *Bombyx mori* L. par ajout de polyèdres inactivés par la chaleur à la nourriture.

SIVAPRAKASAM N., RABINDRA R.J.

Department of Sericulture, Tamilnadu Agricultural University, Coimbatore 641 003, India.

1995 *Indian J. Seric.*, Vol. 34(2), 147-148. (E)

Incidence of grasserie in silkworm, *Bombyx mori* L., in selected districts of Tamilnadu.

Incidence de la grasserie chez le ver à soie *Bombyx mori* L. dans des districts sélectionnés du Tamilnadu.

SIVAPRAKASAM N., RABINDRA R.J.

Department of Sericulture, Tamilnadu Agricultural University, Coimbatore 641 003, India.

1995 *Indian J. Seric.*, Vol. 34(2), 100-104. (E)

Cow-dung smearing contributes to silkworm disease incidence.

L'enduction à la bouse de vaches contribue à l'incidence des maladies des vers à soie.

THANGAVELU K.

National Silkworm Seed Project, IV Floor, CSB Complex, BTM Layout, Hosur Road, Bangalore 560 068, India.

1996 *Indian Silk*, Vol. 34(10), 17-20. (E)

Quantitative requirements for amino acids and effects of dietary amino acid balance on growth in polyphagous strains of the silkworm, *Bombyx mori*.

Besoins quantitatifs en acides aminés et effets de l'équilibre des acides aminés du régime alimentaire sur la croissance chez les souches polyphages du ver à soie *Bombyx mori*.

YANAGAWA H., WATANABE K., HIRAYAMA C., SHINBO H.

National Institute of Sericultural and Entomological Sci., 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1995 *Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci.*, Vol. 15, 63-83. (J,e)

Effect of foliar spray of micronutrients and urea on the nutritional quality of mulberry (*Morus* sp.) leaves.

Effet de la pulvérisation foliaire de micronutriments et d'urée sur la qualité nutritionnelle des feuilles de mûriers (*Morus* sp.).

YEASMIN T., ABSAR N., SARKER A.A.

Department of Biochemistry, Rajshahi University, Rajshahi 6205, Bangladesh.

1995 *Indian J. Seric.*, Vol. 34(2), 149-152. (E)

Séricigènes non-mûriers : élevage, nutrition, pathologie

Non-mulberry silkworms: rearing, feeding, pathology

Stabilization of oak tasar silkworm seed crop in J & K.

Stabilisation de la récolte des graines du ver à soie tasar du chêne au Jammu et Cachemire.

DHAR S.L., SINHA S.S.

Regional Tasar Research Station, Batote, India.

1996 *Indian Silk*, Vol. 34(10), 33-35. (E)

Studies on the brief method of individual selection for cocoon filament size in silkworm (*Bombyx mori*) breeding.

Etudes sur la méthode rapide de sélection individuelle pour la taille de la bave du cocon dans le breeding des vers à soie (*Bombyx mori*).

JIANG Y., XU M.

Department of Sericulture, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou, China.

1994 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 25(2), 15-17. (C)

Toxicity of some insecticides on the larvae of weevil *Crinorrhinus nebulosus* Marshall (Coleoptera: Curculionidae) - a pest of tasar food plants.

Toxicité de quelques insecticides sur les larves du charançon *Crinorrhinus nebulosus* Marshall (Coleoptera : Curculionidae) - un parasite des plantes nourricières du tasar.

MISHRA P.K., JAYASWAL J.

Central Tasar Research and Training Institute, PO Piska Nagri, Ranchi 835 303, Bihar, India.

1995 *Indian J. Seric.*, Vol. 34(2), 167-168. (E)

Estimation of combining ability in eri silkworm *Samia cynthia ricini* Boisduval for pupal and allied traits.

Estimation de la capacité combinatoire chez le ver à soie eri *Samia cynthia ricini* Boisduval pour la pupe et les traits apparentés.

NAGARAJA M., GOVINDAN R., NARAYANASWAMY T.K.

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

1996 *Mysore J. Agric. Sci.*, Vol. 30(1), 48-51. (E)

Selection of the best period for terminating summer diapause of *Antheraea yamamai* pupae by light control.

Sélection de la meilleure période pour la fin de la diapause d'été des chrysalides d'*Antheraea yamamai* par le contrôle de la lumière.

SHEN X. *et al.*

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(1), 63-64. (C)

Effect of certain insecticides on pumpkin beetle, *Aulacophora foveicollis* L., a pest of tasar food plants.

Effet de certains insecticides sur le scarabée du potiron *Aulacophora foveicollis* L., un parasite des plantes nourricières du tasar.

SINGH R.N., MANDAL K.C., SINHA S.S.

Central Tasar Research and Training Institute, PO Piska Nagri, Ranchi 835 303, Bihar, India.

1995 *Indian J. Seric.*, Vol. 34(2), 140-141. (E)

Stray emergence in *Antheraea mylitta* Drury.

Emergence erratique chez *Antheraea mylitta* Drury.

SRIVASTAVA A.K. *et al.*

Central Tasar Research and Training Institute, CSB Complex, BTM Layout, Madivala, Bangalore 560 068, India.

1996 *Indian Silk*, Vol. 34(10), 29-31. (E)

Evaluation of some chemicals for prevention of diseases in tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera: Saturniidae).

Evaluation de quelques produits chimiques pour la prévention des maladies chez le ver à soie tasar *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera : Saturniidae).

THANGAVELU K., BANSAL A.K., SHUKLA R.M., SAXENA N.N., JAYASWAL J., GOEL A.K.

Central Tasar Research and Training Institute, PO Piska Nagri, Ranchi 835 303, Bihar, India.

1995 *Indian J. Seric.*, Vol. 34(2), 142-144. (E)

Species composition of thrips inhabiting *Quercus serrata* Thug.

Composition des espèces de thrips habitant *Quercus serrata* Thug.

VARATHARAJAN R., JAMES KEISA T., DWIJAMANI SINGH O., NOAMANI M.K.R.

Regional Tasar Research Station, Imphal 795 002, India.

1995 *Indian J. Seric.*, Vol. 34(2), 146. (E)

Tasar ecorace Bhandara - need for conservation.

L'écorace du tasar Bhandara - la nécessité de sa préservation.

YADAV G.S., JAIPAL REDDY K., SINGH B.M.K., SINHA B.R.R.P., SINHA S.S.

Central Tasar Research and Training Institute, PO Piska Nagri, Ranchi 835 303, Bihar, India.

1996 *Indian Silk*, Vol. 34(11), 31-34. (E)

Preliminary study on the nutrient analysis and toxicity test of chrysalis of *Philosamia cynthia*.

Etude préliminaire sur l'analyse des nutriments et les tests de toxicité des chrysalides de *Philosamia cynthia*.

YAN Y. *et al.*

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(1), 65. (C)

Vers à soie : génétique

Silkworms: genetics

Precise excision of TTAA-specific lepidopteran transposons piggyBac (IFP) and tagalong (TFP3) from the baculovirus genome in cell lines from tow species of Lepidoptera.

Excision précise des transposons de lépidoptères, piggyBac (IFP) et tagalong (TFP3), à partir du génome du baculovirus dans des lignées de cellules de deux espèces de lépidoptères.

FRASER M.J., CISZCZON T., ELICK T., BAUSER C.

Department of Biological Sciences, University of Notre Dame, Notre Dame, IN 46556, USA.

1996 Insect Molecular Biology, Vol. 5(2), 141-151. (E)

Effect of silkworm hemolymph on *Escherichia coli* beta-galactosidase expression in insect cell lines infected with a recombinant baculovirus.

Effet de l'hémolymphe du ver à soie sur l'expression de la beta galactosidase d'*Escherichia coli* dans les lignées de cellules d'insectes infectées avec un baculovirus recombinant.

HARA T., TARUI H., KAWAGUCHI H., YOSHIMURA N., KAWARABATA T.

Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan.

1995 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 64(6), 477-481. (J,e)

Maximum likelihood estimates of recombination parameters between a marker gene locus and a quantitative trait locus in the silkworm (*Bombyx mori*).

Estimation de vraisemblance maximum des paramètres de recombinaison entre un locus de gène marqueur et un locus de caractère quantitatif chez le ver à soie (*Bombyx mori*).

HE K., XIA J., YIE A., NAKADA T.

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

1996 Canye Kexue, Vol. 22(1), 31-35. (C,e)

Genome fingerprinting of the silkworm, *Bombyx mori*, using random arbitrary primers.

Empreinte génomique du ver à soie *Bombyx mori* par utilisation de séquences initiatrices arbitraires et aléatoires.

NAGARAJU G.M., NAGARAJU J.

Seribiotech Research Laboratory, No. 8, West of Chord Road, II Stage Mahalkshimipuram Post, Bangalore 560 086, India.

1995 Electrophoresis, Vol. 16, 1633-1638. (E)

DNA fingerprinting in silkworm *Bombyx mori* using banded krait minor satellite DNA-derived probe.

Empreinte de l'ADN chez le ver à soie *Bombyx mori* par utilisation d'une sonde dérivée d'une bande mineure d'ADN satellite.

NAGARAJU J., SHARMA A., SETHURAMAN B.N., RAO G.V., SINGH L.

Seribiotech Research Laboratory, II Stage Mahalakshimpuram Post. No. 8, West of Chord Road, Bangalore 560 086, India.

1995 *Electrophoresis*, Vol. 16, 1639-1642. (E)

Peroral inoculation of a baculovirus vector to the silkworm, *Bombyx mori*, treated with a low temperature.

Inoculation par voie buccale d'un vecteur de baculovirus du ver à soie *Bombyx mori* traité à basse température.

OKAZAKI H., KANAYA T., NISHIMURA S., OGAWA K., WATANABE H.

Research Institute of Biological Science, Katakura Industries Co., Ltd., Matsumoto, Nagano, Japan.

1995 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 64(6), 504-508. (J,e)

Amylase - its genetics and prospects as a marker in silkworm breeding.

Amylase : sa génétique et son avenir comme marqueur dans la sélection des vers à soie.

PATNAIK A.K., DATTA R.K.

Central Sericultural Res. and Training Inst., Manandavadi Road, Srirampura, Mysore 570 008, India.

1995 *Indian J. Seric.*, Vol. 34(2), 82-89. (E)

Determining gene location on chromosomes of *Bombyx mori* using fluorescence *in situ* hybridization (FISH).

Détermination de la localisation des gènes sur les chromosomes de *Bombyx mori* par hybridation *in situ* fluorescente (FISH).

TSUCHIDA K., MIYAJIMA N., KAMEOKA Y., TAKADA N., MAEKAWA H.

Division of Radiation Control and Biology, National Institute of Health, Kamiosaki 2-chome, Shinagawa-ku, Tokyo 141, Japan.

1995 *Appl. Entomol. Zool.*, Vol. 30(1), 225-230. (E)

A study on conditions, and repeatability and inheritance pattern of random amplification polymorphic DNA (RAPD) in F1 of silkworm (*Bombyx mori*).

Une étude sur les conditions, la reproductibilité et le modèle d'héritage de l'ADN polymorphe par amplification aléatoire (RAPD) chez les F1 de ver à soie (*Bombyx mori*).

XIA Q., ZHOU Z., LU C., FENG L., XIANG Z.

Sericultural Key Laboratory of Ministry of Agriculture, College of Sericulture and Silk, Southwest Agricultural University, Chongqing 630716, China.

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(1), 20-25. (C,e)

Breeding of polyphagous silkworm races with a thin cocoon filament.

Sélection de races de vers à soie polyphages donnant une bave fine.

YAMAMOTO T., MASE K., ENOKIJIMA M.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1995 *Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci.*, Vol. 15, 47-62. (J,e)

P10 genes of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus.

Les gènes P10 du virus de la polyédrose nucléaire chez *Bombyx mori* et du virus de la polyédrose nucléaire multiple d'*Autographa californica*.

ZHANG Y., WU X., LI Z.

1995 *Sci. China, Ser. B*, Vol. 38(1), 50-59. (C,e)

Vers à soie : physiologie, biochimie

Silkworms: physiology, biochemistry

Effect of nickel chloride supplementation on the lipid content in *Bombyx mori* L.

Effet de d'ajout de chlorure de nickel sur le titre en lipides chez *Bombyx mori* L.

BIRENDRO NATH SAHA, ATAUR RAHMAN KHAN.

Department of Zoology, Rajshahi University, Rajshahi 6205, Bangladesh.

1995 *Indian J. Seric.*, Vol. 34(2), 156-158. (E)

Insecte et température. Poïkilothermie et domestication chez *Bombyx mori*.

Insect and temperature. Poikilothermy and domestication of *Bombyx mori*.

BUATOIS A.

INRA, Unité nationale séricicole, 25 quai Jean-Jacques Rousseau, 69350 La Mulatière, France.

1995 *L'Année biologique*, Vol. 34(4), 194-229. (F,e)

High density and large scale culture of suspension type of cells from insects.

Culture en suspension de cellules d'insectes à grande échelle et à haute densité.

IMANISHI S., TOMITA S., NAKAO H.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 35(1), 7-12. (J,e)

Acquisition of competence for pupal development of the wing disc during the final feeding stage of *Bombyx mori*.

Acquisition de la compétence du disque alaire pour le développement nymphal au cours de la phase finale d'alimentation chez *Bombyx mori*.

KAWASAKI H., NAGATA M., TSUCHIDA K., KANKE E.

Faculty of Agriculture, Utsunomiya University, Minemachi, Utsunomiya 321, Japan.

1995 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 64(6), 487-492. (J,e)

Quoi de neuf sur le front des régulateurs de croissance des insectes ?

What is new about insect growth regulators ?

MAUCHAMP B.

INRA, Unité nationale séricicole, 25 quai Jean-Jacques Rousseau, 69350 La Mulatière, France.

1995 *Phytoma - La Défense des Végétaux*, N 469, 13-15. (F)

Sensitive, rapid and simple method for evaluation of ecdysteroid agonist activity based on the mode of action of the hormone.

Méthode simple, rapide et sensible pour l'évaluation de l'activité agoniste des ecdystéroïdes basée sur le mode d'action de l'hormone.

MIKITAMI K.

Agricultural Chemicals Research Laboratory, Sumitomo Chemical Co., Ltd, 4-2-1 Takatsukasa, Takarazuka, Hyogo 665, Japan.

1995 *J. Seric. Sci. Jpn.*, Vol. 64(6), 534-539. (E)

Identification of the receptor-recognition surface of bombyxin-II, an insulin-like peptide of the silkmoth, *Bombyx mori*: critical importance of the B-chain central part.

Identification de la surface de reconnaissance des récepteurs de la bombyxine-II, un peptide du papillon du ver à soie *Bombyx mori* semblable à l'insuline : importance cruciale de la partie centrale de la chaîne B.

NAGATA K. *et al.*

Department of Molecular Physiology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Honkomagome 3-18-22, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

1995 *J. Mol. Biol.*, Vol. 253, 759-770. (E)

Three-dimensional solution structure of bombyxin-II, an insulin-like peptide of the silkmoth *Bombyx mori*: structural comparison with insulin and relaxin.

Structure tri-dimensionnelle de la bombyxine-II en solution, un peptide du papillon du ver à soie *Bombyx mori* analogue à l'insuline : comparaison de la structure avec l'insuline et la relaxine.

NAGATA K. *et al.*

Department of Molecular Physiology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Honkomagome 3-18-22, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

1995 *J. Mol. Biol.*, Vol. 253, 749-758. (E)

Effect of 20-hydroxyecdysone on the duration of the fifth instar larva and quantitative characters of cocoon in the silkworm, *Bombyx mori*.

Effet de la 20-hydroxyecdysone sur la durée du cinquième âge larvaire et les caractères quantitatifs du cocon chez le ver à soie *Bombyx mori*.

NINAGI O., MARUYAMA M.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1995 *Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci.*, Vol. 15, 85-95. (J,e)

Glycogen phosphorylase in the male reproductive system and spermatophore of the silkmoth, *Bombyx mori*.

Glycogène-phosphorylase dans le système de reproduction mâle et le spermatophore du papillon du ver à soie *Bombyx mori*.

OSANAI M., KUNITOMO Y., NAGAOKA S.

Department of Biology, Faculty of Science, Kanazawa University, Kakumamachi, Kanazawa 920-11, Japan.

1995 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 64(6), 523-533. (E)

Seasonal variations in the haemolymph free amino acids of *Antheraea assama* Westwood.

Variations saisonnières des acides aminés libres de l'hémolymph de *Antheraea assama* Westwood.

SHARMA D.K., DIPALI DEVI, TURCHETTO M.

Zoology Department, Gauhati University, Guwahati 781 041, India.

1995 *Indian J. Seric.*, Vol. 34(2), 122-126. (E)

Purification and characterization of alkaline phosphatase from fat body of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Drury.

Purification et caractérisation de la phosphatase alcaline du corps adipeux du ver à soie tasar tropical *Antheraea mylitta* Drury.

SRIVASTAVA P.P., CHAUDHURI A., REDDY K.D., THANGAVELU K., PRASAD R.K.

1995 *Indian J. Exp. Biol.*, Vol. 33(4), 284-286. (E)

The developmental phenomenon of losing and reappearing of silkworm endoderm.

Le phénomène de perte et de réapparition de l'endoderme du ver à soie au cours du développement.

SUN C.

1996 *Canye Kexue*, Vol. 22(1), 60-61. (C)

Morphological changes of BM-N4 cells induced by bombyxin, an insulin-related peptide of *Bombyx mori*.

Changements morphologiques des cellules BM-N4 induits par la bombyxine, un peptide proche de l'insuline chez *Bombyx mori*.

TANAKA M., KATAOKA H., NAGATA K., NAGASAWA H., SUZUKI A.

Department of Agricultural Chemistry, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.

1995 *Regul. Pept.*, Vol. 57(3), 311-318. (E)

Effect of imidazole compounds on development of larva silk gland and pupa ovary in silkworm.

Effet des composés d'imidazole sur le développement de la glande séricigène de la larve et les ovaires de la pupe chez le ver à soie.

XU M., JIANG Y., WU X.

Department of Sericulture, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou, China.

1994 *Acta Agriculturae Zhejiangensis (China)*, Vol. 6(2), 115-118. (C,e)

Vers à soie : oeufs, embryologie

Silkworms: eggs, embryology

Some biochemical modulations during embryogenesis in a bivoltine strain of silkworm, *Bombyx mori* L.

Quelques modulations biochimiques au cours de l'embryogénèse chez une souche de vers à soie bivoltins *Bombyx mori* L.

CHANDRASEKHARAI AH, YADAV P.R.

1994 *J. Entomol. Res.*, Vol. 18(4), 345-349. (E)

Studies on the three-step refrigeration system of the hibernating silkworm eggs.

Etudes sur le système de réfrigération en trois étapes des oeufs de vers à soie diapausants.

CHEN Q., TAO T., LI S., SHENG J.

Zhejiang Provincial Silkworm Seed Company, Hangzhou, China.

1994 *Bulletin of Sericulture*, Vol. 25(1), 11-14. (C)

Presence of PIN factor(s) responsible for the time-interval activation of esterase A4 in the diapause duration timer of *Bombyx mori*.

Présence du (des) facteur(s) PIN responsable(s) du rythme d'activation de l'estérase A4 au cours de la diapause chez *Bombyx mori*.

KAI H., KOTANI H., ODA K., ARAI T., MIWA T.

Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tottori University, Minami 4-101, Koyama, Tottori 680, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(1), 31-38. (Ej)

Changes of yolk and haemolymph proteins during ovarian development in the miniature egg mutant, emi, of *Bombyx mori*.

Changements des protéines du vitellus et de l'hémolymph au cours du développement ovarien chez emi, le mutant aux oeufs miniatures de *Bombyx mori*.

KAWAGUCHI Y., BANNO Y., KOGA K., DOIRA H.

Laboratory of Sericultural Science, Hakozaki 6-10-1, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan.

1996 *J. Seric. Sci. Jpn*, Vol. 65(1), 13-20. (Ej)

Responses to localized UV-laser irradiation are different between *Bombyx* and *Drosophila* eggs.

Les réponses aux irradiations UV-laser localisées sont différentes entre les oeufs de *Bombyx* et ceux de la *Drosophila*.

MYOHARA M.

Department of Insect Genetics, National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

1995 *Develop. Growth Differ.*, Vol. 37, 93-98. (E)

Studies on sensitive period of silkworm embryo to environment during body pigmentation stage of silkworm.

Etudes sur la période sensible de l'embryon du ver à soie à l'environnement au cours du stade de pigmentation du corps du ver à soie.

SONG Q.

Hebei Forestry College, Baiding, China.

1994 Journal of Hebei College (China), Vol. 9(3), 232-235. (C,e)

Studies on artificial chilling time limit of silkworm bluish eggs.

Etudes sur la date limite de refroidissement artificielle des oeufs de vers à soie bleutés.

TU Z. *et al.*

1996 Canye Kexue, Vol. 22(1), 59. (C)

Application of moulting hormone in silkworm rearing for egg production.

Application de l'hormone de mue dans l'élevage du ver à soie pour la production des oeufs.

XU M., JIANG Y.

Department of Sericulture, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou, China.

1994 Bulletin of Sericulture, Vol. 25(1), 33-35. (C)

A study on the corona hatching method for silkworm eggs.

Une étude sur la méthode d'éclosion en couronne pour les oeufs de vers à soie.

YE S., CHEN J., YE Y., SUN S., YANG M., WU C.

Biophysics Research Laboratory, East China Normal University, Shanghai 200062, China.

1996 Canye Kexue, Vol. 22(1), 26-30. (C,e)

Comparison of the ovary weight of the silkworm treated with hormones (MH, JHA and CA3) during the pupal stage.

Comparaison du poids ovarien des vers à soie traités avec des hormones (MH, JHA et CA3) au cours du stade chrysalide.

ZHANG J., HUANG L.

Department of Sericulture, Anhui Agricultural University, Hefei, China.

1994 Bulletin of Sericulture, Vol. 25(1), 26-28. (C)

Glandes séricigènes

Silkglands

Las glangulas ampuladas mayores de *Nephila clavipes* : un sistema modelo lucrativo. / Major ampulla glands of *Nephila clavipes*: a model system.

Les glandes ampoulaire majeures de *Nephila clavipes* : un système modèle performant.

ARROYO CRUZADO C. *et al.*

Department of Biology, University of Puerto Rico, P.O. 2336, University Station, San Juan P.R. 00931-3360, Puerto Rico. (Candelas G.C.)

1996 Ciencia Desarrollo, Vol. 22(126), 24-31. (S)

Influence of the magnetic field on the nucleic acids in developing silk gland of *Bombyx mori* L.

Influence du champ magnétique sur les acides nucléiques au cours du développement de la glande séricigène de *Bombyx mori* L.

CHOUGALE A.K., PAWAR B.K., MORE N.K.

Department of Zoology, Shivaji University, Kolhapur 416 004, India.

1995 Indian J. Seric., Vol. 34(2), 161-164. (E)

Silk properties determined by gland-specific expression of a spider fibroin gene family.

Les propriétés de la soie déterminées par l'expression spécifique d'une glande d'une famille de gènes de la fibroïne d'araignée.

GUERETTE P.A., GINZINGER D.G., WEBER B.H.F., GOSLINE J.M.

Department of Zoology, University of British Columbia, 6270 University Boulevard, Vancouver, British Columbia V6T 1Z4, Canada.

1996 Science, Vol. 272(5258), 112-115. (E)

Flagelliform or coronata glands of *Nephila clavipes*.

Glandes couronnées ou flagelliformes de *Nephila clavipes*.

RODRIGUEZ, CANDELAS G.C.

Department of Biology, University of Puerto Rico, P.O. 2336, University Station, San Juan P.R. 00931-3360, Puerto Rico.

1995 J. Exp. Zool., Vol. 272, 275-280. (E)

Molecular biology of silkworm fibroin protein.

Biologie moléculaire de la fibroïne du ver à soie.

SHIMURA K.

1996 Canye Kexue, Vol. 22(1), 47-52. (C)

Soie

Silk

Quality and productivity of tasar yarn: some fundamental aspects.

Qualité et productivité du fil tasar : quelques aspects fondamentaux.

CHATTOPADHYAY R., SUBRATA DAS

Indian Institute of Technology, New Delhi, India.

1996 Indian silk, Vol. 34(10), 36-38. (E)

Evolutionary shifts in the spectral properties of spiders silks.

Changements évolutifs dans les propriétés spectrales des soies d'araignées.

CRAIG C.L., BERNARD G.D., CODDINGTON J.A.

Yale University, New Haven, Connecticut, CT 06525, USA.

1994 Evolution (USA), Vol. 48(2), 287-296. (E)

Determination of dyeing method of silk / modified polyester fiber composite materials.

Détermination d'une méthode de teinture des matériaux composites fibres polyester modifiées - soie.

KATO H., OBO M., MIYAZAWA M.

1995 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 64(6), 540-542. (J)

Comparative studies on the physical properties of silk thread from cocoons of local and improved varieties of Chinese origins of the silkworm, *Bombyx mori*.

Etudes comparatives sur les propriétés physiques des fils de soie provenant de cocons de variétés locales et améliorées d'origine chinoise du vers à soie *Bombyx mori*.

LU Q., KAI T., HASHIMOTO T., IIZUKA E.

1996 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 65(1), 62-64. (J)

Adsorption of copper salt into the silk powder.

Adsorption du sel de cuivre dans la poudre de soie.

LU X., HIRABAYASHI K.

Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo 184, Japan.

1995 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 64(6), 482-486. (J,e)

Preparation of laminated silk sheet and its properties.

Préparation des feuilles de soie laminées et leurs propriétés.

LU X., OKAZAKI M., HIRABAYASHI K.

Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2-24-16 Nakamachi, Koganei, Tokyo 184, Japan.

1996 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 65(1), 50-55. (J,e)

Production of blended fibroin-plastic resin and its properties.

Production d'une résine fibroïne-plastique et ses propriétés.

LU X., TAKAHASHI M., HIRABAYASHI K.

Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2-24-16 Nakamachi, Koganei-shi, Tokyo 184, Japan.

1995 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 64(6), 509-514. (E)

The pigments in a powdered dry Indian madder.

Les pigments dans une teinture de garance indienne en poudre.

SAKATA K., KATAYAMA A.

Faculty of Home Economics, Kyoto Women's University, 35 Kitahiyoshicho, Imakumano, Higashiyama-ku, Kyoto 605, Japan.

1996 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 65(1), 39-44. (J,e)

Classification of cleanness and neatness defects of raw silk by using fuzzy rules.

Classification des défauts de propreté et de netteté de la soie grège par utilisation du système des ensembles flous.

TAJIMA F., ISHIGURO Y.

Faculty of Education, Yokohama National University, Hodogaya-ku, Yokohama 240, Japan.

1995 J. Seric. Sci. Jpn, Vol. 64(6), 498-503. (J,e)

Evaluation of cocoon and raw silk properties of a polyphagous silkworm, Shin-Asagiri.

Evaluation des propriétés du cocon et de la soie grège d'un ver à soie polyphage Shin-Asagiri.

TSUBOUCHI K., IMAI T., AKAHANE T.

National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1995 Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci., Vol. 15, 97-105. (J,e)

INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

1) Les articles présentés doivent concerner soit des travaux originaux soit des synthèses. Ils doivent être rédigés en français ou en anglais. Ils doivent avoir trait à la sériciculture qui inclut les vers à soie, les plantes nourricières, la filature de la soie quelle que soit la nature des recherches (fondamentales ou appliquées) et des sujets (biochimie, écologie, économie, virologie, génétique, etc.).

2) Les articles doivent être soumis à : **Dr G. CHAVANCY**. Les articles soumis au Rédacteur doivent être inédits et ne doivent pas être présentés pour publication chez un autre éditeur. Les articles acceptés pour publication dans *SERICOLOGIA* ne pourront être publiés ailleurs sous la même forme sans le consentement écrit de l'éditeur.

3) Les manuscrits et illustrations doivent être soumis en double exemplaire, l'auteur conservant une copie. Dans le cas d'une co-rédaction, les auteurs doivent indiquer le nom de celui qui recevra les épreuves.

4) Les manuscrits doivent être dactylographiés avec un double interligne et des marges importantes. Les auteurs sont priés de rédiger des communications aussi concises que possible. Les renvois de bas de page sont à éviter et les caractères en italique ne doivent pas être utilisés pour la mise en relief.

5) L'article doit être présenté de la façon suivante:

- Le titre suivi du nom de l'auteur et de son adresse complète.
- Le résumé qui doit indiquer le contenu et les conclusions de l'article et doit faire référence à des informations nouvelles. Le résumé ne doit pas excéder 200 mots et peut être divisé en paragraphes numérotés.
- Les mots clés. Une petite liste de mots clés permettant une rapide analyse du contenu de l'article et utilisable pour la compilation de l'index.

- Les articles doivent être divisés en : Introduction, Matériel et Méthodes, Résultats et Discussion. Pour les articles de synthèse, les auteurs peuvent choisir la présentation qui leur convient.

- Remerciements.

- Références. Les auteurs doivent suivre le "Harvard system". Les références doivent être données dans l'ordre suivant : nom de l'auteur et ses initiales, date (entre parenthèses), titre de l'article, nom du journal tel qu'il est abrégé dans la liste mondiale des périodiques scientifiques (4ème édit. 1963), le volume et les première et dernières pages de l'article.

Pour les livres, il est nécessaire d'indiquer le nom de l'auteur et ses initiales, la date de publication, le titre, l'édition, le nombre de pages, le nom de l'éditeur et le lieu d'édition.

Dans le texte, les références doivent être indiquées sous la forme suivante : Dupont (1964) ou (Dupont, 1964). Lorsque la référence comprend plus de deux auteurs, par exemple Dupont, Durand et Martin, l'article doit être cité comme Dupont et coll. sauf si cela peut prêter à confusion. Si l'on cite des articles d'un même auteur publiés la même année, ils doivent être distingués par les lettres a, b, etc.

La référence à un article sous presse doit signifier que l'article a été accepté pour publication et elle doit s'écrire de la façon suivante :

SETOYAMA K. (1962) Effect of water on molecular motion of silk fibroin. *J. Seric. Sci. Jpn.* Sous presse.

6) Illustrations. Le manuscrit sera accompagné de toutes les illustrations nécessaires mais celles-ci ne doivent pas être insérées dans le texte. Toutes les photographies, graphiques et diagrammes doivent être numérotés consécutivement en chiffres arabes, dans l'ordre de citation du texte.

Les photographies sur papier brillant, ou les épreuves positives (pas de négatifs ou de diapositives) doivent être envoyées si possible sans montage et en nombre limité.

Les cartes, graphiques ou diagrammes doivent être dessinés nettement à l'encre noire sur le papier ou du carton blanc de bonne qualité. Les inscriptions apparaissant sur les illustrations doivent être complètes et de taille suffisante pour permettre une réduction importante si nécessaire.

Les illustrations ne doivent pas dépasser le format 14 x 19 cm. Au dos de chaque illustration doivent être indiqués le nom de l'auteur, le n° de la figure (en chiffres arabes) et l'orientation de l'illustration si nécessaire.

Les légendes des figures doivent être dactylographiées sur une feuille séparée et non pas au dos de l'original et elles doivent être suffisamment explicites pour éviter que l'on se reporte au texte.

7) Tableaux. Ils doivent être numérotés en chiffres romains et dactylographiés sur des feuilles séparées. Les titres doivent être suffisamment clairs sans qu'il soit nécessaire de se reporter au texte. Tous les tableaux et figures doivent être cités dans le texte.

8) Seules les abréviations normalisées sont autorisées. Lorsque des abréviations particulières sont utilisées, le nom devra d'abord être donné en entier suivi de l'abréviation entre parenthèses.

9) Le nom latin de toutes les espèces étudiées doit être indiqué.

10) Les corrections des épreuves doivent se limiter aux fautes de frappe. Toutes modifications importantes de l'article seront facturées à l'auteur.

11) Un bon de commande de tirés-à-part est fourni en même temps que les épreuves. Les auteurs peuvent ainsi commander des tirés-à-part en renvoyant les épreuves. Il est à noter que 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 holdly in black ink on good quality white paper or card. Lettering to appear on the illustration should be given in full and should be of sufficient size to allow for considerable reduction where necessary.

Illustrations should not be larger than 14 x 19 cm. On the back of each illustration should be indicated the author's name, the figure number (in arabic numerals) and the top of illustration, when it is not clear.

Legends to figures should be typed on a separate sheet and not on the back of the original, and should give sufficient data to make the illustration comprehensible without reference to the text.

7) Tables. They should be numbered in roman numerals, typed on separate sheets and should have a title which will make the meaning clear without reference to the text. All tables and figures would be referred to in the text.

8) Only standard abbreviations should be used. Where specialized abbreviations are used, the name should firstly be given in full with the abbreviation indicated in parentheses.

9) The Latin names should be given for all species used in investigation.

10) Corrections to proofs should be restricted to printer's errors only. Other than these, substantial alterations will be charged to the author.

11) A reprint order form will be supplied with the proofs, and authors may order such reprints as they require when the proofs are returned. Please note that 25 free reprints are sent by the Editor.

* * *