

superiore della figura) con quelle sane (parte inferiore della figura). Larva di 1 giorno. Color. Mallory-eosina (x 1600).

Fig. 9 - Tubulo malpighiano in sezione trasversale. Larva di 10 giorni. Color. Mallory-eosina (x 1000).

Fig. 10 - Cellule ipostigmatiche a nucleo vescicolare con ammassi di spore. Si noti la cromatofagia del parassita. Larva di 4 giorni. Color. Giemsa (x 800).

Fig. 11 - Porzione di corpo adiposo con avanzata distruzione del reticolo plasmatico. Forme giovanili e spore. Larva di 1 giorno. Color. Mallory-eosina (x 1600).

Fig. 12 - Ghiandola esuviale addominale invasa e semidistrutta dal *Nosema*, in sezione longitudinale. Larva di 4 giorni. Color. Giemsa (x 1600).

Fig. 13 - Tessuto ipodermico in sezione longitudinale in corrispondenza di una cellula tricogena; spore e meronti. Notare la forte ipertrofia. Larva di 1 giorno. Color. Carazzi (x 1800).

Fig. 14 - Porzione di tessuto ipodermico in sezione longitudinale con forte vacuolizzazione. Spore e meronti. Larva di 1 giorno. Color. Mallory-eosina (x 2000).

Fig. 15 - Parte corticale di un ganglio nervoso addominale in sezione trasversa con numerose lesioni. Larva di 3 giorni. Color. Giemsa (x 1600).

Fig. 16 - Ganglio frontale e porzione del nervo ricorrente in sezione longitudinale con enorme cavità e forti ammassi di spore, che occupano, insieme ai detriti citoplasmatici, la maggior parte del volume del ganglio. Larva neonata. Color. Carazzi (x 1600).

TAVOLA II.

Fig. 17 - Masse muscolari toraciche in sezione longitudinale con numerosi infarti di parassiti. Larva neonata. Color. Mallory tricromica (x 1000).

Fig. 18 - Porzione di vaso dorsale con tumori sporgenti dalla parete nel lume del canale. Larva di 1 giorno. Color. Carazzi (x 1000).

Fig. 19 - Come la precedente, con tumore nella parete. Si notino all'estremità della cellula i residui del nucleo. Larva di 2 giorni. Color. Mallory-eosina (x 1000).

Fig. 20 - Tubo malpighiano con tumori alquanto sviluppati e diffusi in tutta la cavità interna e nelle pareti. In mezzo agli ammassi di parassiti si vedono i residui dei nuclei. Larva neonata. Color. Mallory tricromica (x 1000).

Fig. 21 - Porzione di ghiandola setifera (canale secernente fibroina) in sezione tangenziale. Spore e meronti. Larva neonata. Color. Mallory tricromica (x 1000).

Fig. 22 - Parete del serbatoio del seritterio con tumore caratteristico. Larva di 15 giorni. Color. Giemsa (x 1000).

Fig. 23 - Porzione di testicolo con spore nei follicoli e nella regione dell'ilo. Larva di 2 giorni. Color. Mallory-eosina (x 1000).

Fig. 24 - Ganglio nervoso addominale in sezione trasversale con numerose lesioni. Larva di 3 giorni. Color. Giemsa (x 1000).

Fig. 25 - Porzione di ganglio nervoso sopraesofageo in sezione longitudinale con lesione gravissima estesa in tutta la parte corticale e iniziata anche nella parte midollare, alla cui periferia si vedono forme giovanili del parassita. Larva neonata. Color. Carazzi (x 1000).

Fig. 26 - Sezione longitudinale di una porzione di larva neonata con evidenti lesioni in vari organi. Color. Mallory tricromica (x 500).

Studi sperimentali intorno agli effetti di sostanze varie sulla crescita del Baco da seta

PARTE I

Piano generale degli esperimenti del 1935

Le esperienze da noi compiute nel 1935 sul *Bombyx mori* trassero la loro origine da incerti accenni di alcuni Autori sulla possibilità di una sorta d'immunità naturale verso i microsporidi da parte degli insetti, e in ispecial modo del Bombyce del gelso verso il *Nosema bombycis*.

KUDO nel 1924 (43) riferiva che « pochi osservatori si erano occupati dell'immunità dell'ospite del *Nosema*. PASTEUR (1870), BOLLE (1898), STEMPELL (1909) ed altri osservano che i bachi delle razze giapponesi dimostrano essere più resistenti di quelle europee all'invasione di *Nosema bombycis*. Gli allevatori pratici giapponesi di bachi da seta pare abbiano la stessa opinione. I risultati da me ottenuti tendono a dimostrare che ciò è vero ».

Il PAILLOT (49) nel 1933, a questo proposito così si esprime: « Il n'a pas encore été signalé jusqu'ici de cas d'immunité contre les Microsporidies. Cependant, PASTEUR, BOLLE, STEMPELL ont constaté que les races japonnaises de Vers à soie sont plus résistantes à la pébrine que les races européennes; des constatations analogues ont été faites pour les Abeilles au sujet de leur réceptivité vis-a-vis du *Nosema apis*. Mais on peut se demander s'il s'agit là d'immunité proprement dite; la résistance absolue peut être due simplement au fait que les barrières naturelles qui, chez tous les êtres vivants, s'opposent aux infections en général, offrent une résistance plus grande au *Nosema* ».

Pur rendendoci conto che la ricerca su questo argomento presentava molti lati difficili e complessi, l'abbiamo affrontata istituendo due serie di esperimenti.

Una prima serie fu condotta al fine di vedere se, infettando contemporaneamente e con la stessa intensità bachi di razze diverse, talune indigene e alcune anche appena importate dal Giappone, si sarebbe verificata una sensibile differenza nel comportamento delle diverse razze di fronte all'infezione.

Una seconda serie di esperienze fu invece condotta al fine di vedere se una razza giapponese di nuova importazione in Italia, infettata sperimentalmente con *Nosema bombycis* ci potesse fornire, per mezzo di reazioni immunitarie, sostanze che, somministrate ai bachi di razze nostrane,

generassero in queste un'immunità, o comunque un certo grado di resistenza al *Nosema*. Somministriamo anche a bachi appartenenti alle stesse razze nostrane che servivano per gli esperimenti precedenti, estratti di bachi di razza Giapponese di nuova importazione, non preventivamente infettata. In tutti e due i casi la somministrazione degli estratti di bachi di razza giapponese preventivamente infettata sperimentalmente col *Nosema* o del tutto indenne di pebrina, in alcuni lotti era seguita da infezione sperimentale con *Nosema*, mentre altri lotti ne furono lasciati esenti.

Una difficoltà grave si presentava nel pericolo che i lotti in esperimento s'infettassero l'uno con l'altro. Per evitare tale pericolo usammo campane in cellofane, che permettevano all'aria l'entrata dal basso, con le quali si mantenevano permanentemente coperti i singoli lotti. Che queste protezioni siano state efficaci è stato dimostrato dall'esito degli esperimenti, nei quali nessuna infezione secondaria (cioè dall'ambiente) ebbe a verificarsi, bensì attecchirono soltanto le infezioni da noi somministrate.

Inoltre, le persone addette agli allevamenti, si sottoposero a tutte le precauzioni e cautele che si usano per le malattie contagiose umane, e cioè lavatura e disinfezione di oggetti, vestaglie, strumenti, ed uso di guanti di gomma, di camici, di cuffie di gomma, scarpe di gomma lavabili da indossare per i locali ove soggiornavano lotti esenti da infezione, mentre indossavano vestaglie e scarpe apposite per i locali dei lotti infetti.

La somministrazione dei pasti veniva iniziata dopo accurata lavatura delle mani, e disinfezione di coltelli e di assicelle per il taglio della foglia, incominciando la distribuzione dai lotti ritenuti sani. La pulizia dei locali si faceva bagnando i pavimenti con soluzione di formalina al 5%, e usando spugne di gomma, in modo da non sollevare mai polvere.

In nessun caso l'esito è stato incerto, nè mai ha dato luogo al dubbio che l'infezione possa essere stata diffusa per mancanza di cautele.

Contemporaneamente a questi esperimenti che si compivano a Bernareggio nella filanda del Dottor Gallese, nel Laboratorio dell'Università di Milano venivano condotte esperienze apposite per determinare il grado d'efficacia della protezione esercitata da coperture più o meno complete contro la caduta del pulviscolo atmosferico, e quindi contro la diffusione della pebrina insieme con esso. Questi esperimenti furono nettamente probativi, dimostrando che una copertura ben adatta, anche se non a chiusura completa, preserva perfettamente l'allevamento da ogni infezione pebrinosa proveniente dall'ambiente, anche se la fonte dell'infezione si trova a brevissima distanza dai lotti protetti.

Su questi esperimenti riferisce uno di noi in una nota a parte (31).

Gli esperimenti di somministrazione di estratti di razze giapponesi

di nuova importazione a razze nostrane, fatti allo scopo di trasmettere ai bachi nostrani un'immunità passiva supposta nei bachi giapponesi, furono eseguiti in parte per via orale, e in parte con iniezioni per via cruenta.

I controlli sani, senza alcun trattamento, furono allevati dalla stessa persona che allevava i lotti trattati, ma in locale separato e in edificio diverso; ebbero lo stesso numero di pasti e le stesse cure di allevamento dei lotti sottoposti all'azione degli estratti. Il buon esito degli allevamenti di controllo è dimostrato dal fatto che i bachi allevati salirono al bosco senza subire perdita alcuna (0% di perdite). La durata dell'allevamento è stata press'a poco la stessa per tutti i lotti trattati o no (al massimo una giornata di differenza).

I lotti che servivano per la prima serie di esperienze, fatte allo scopo di ricercare una differenza di resistenza o immunità verso l'infezione pebrinosa a seconda della razza, furono affidati per l'allevamento ad altra persona esperta di Bernareggio, e allevati essi pure con lo stesso numero di pasti dei lotti trattati e dei controlli sani, e con le stesse cure di allevamento. L'esito degli esperimenti è stato di tal natura da allontanarci di molto dal fine che ci proponevamo. E cioè, mentre dalla prima serie di esperimenti non è risultata una netta resistenza speciale di razza verso l'infezione pebrinosa, dalla seconda serie di esperienze invece la razza *Ascoli*, trattata con estratti di razza giapponese di nuova importazione, dimostrava d'aver acquisito non un'immunità specifica verso il *Nosema*, ma un notevole irrobustimento verso le cause di morbilità generale, e raggiungeva in alcuni lotti trattati un peso unitario medio del bozzolo talmente superiore a quello dei controlli e a quello dei buoni allevamenti ordinari dell'ambiente agrario, da far ritenere che le sostanze somministrate dovevano in qualche modo aver prodotto un effetto nel metabolismo dei bachi trattati.

Non era possibile pensare che ciò fosse dovuto direttamente o indirettamente al parassita, ma piuttosto era naturale pensare ad un fenomeno determinato da qualche fattore di crescita introdotto nel corpo dell'animale, e facente parte degli estratti. Per cui gli esiti degli esperimenti furono considerati e studiati soprattutto tenendo conto della supercrescita e dell'irrobustimento; e il problema della possibilità di un'eventuale immunità contro la pebrina passò in seconda linea.

Questo cambiamento del nostro orientamento dà ragione dell'apparente complessità degli esperimenti, in cui diversi fattori che, almeno per quello che a noi risulta, non hanno importanza agli effetti della supercrescita e dell'irrobustimento, servono però a contraddistinguere i vari gruppi di esperimenti e i singoli lotti con denominazioni che sembrano non aver nulla a che fare con la supercrescita e con l'irrobustimento,

ma che abbiamo preferito lasciare inalterate, perchè da noi adottate fin dall'impostazione del piano generale degli esperimenti.

In questo lavoro quindi riferiamo sul modo con cui fu condotta la seconda serie di esperienze e sull'esito che esse hanno dato.

Preparazione e tecnica degli esperimenti

Razze usate — Le razze sottoposte al trattamento con estratti di bachi d'altra razza furono: la razza *Ascoli* e la *Chinese Oro*.

La razza fonte d'estratto fu la razza *Kokusan Giappone 7*, importata in Europa nel 1935 a cura dell'Ente Nazionale Serico, e che veniva allevata per la prima volta su terra europea.

Estratti usati e loro preparazione — Gli estratti furono ottenuti dai bachi *Kokusan Giappone 7* nella prima giornata della 4.a età, e furono di 3 tipi:

1°) Estratti di bachi *Kokusan 7* non preventivamente infettati con pebrina e non diluiti (estratto S).

2°) Estratti di bachi della stessa razza preventivamente infettati di pebrina (24 ore o 48 ore avanti la preparazione dell'estratto) e somministrati subito dopo la preparazione in due modi: diluiti, per via cruenta; concentrati, per os (estratto A).

3°) Estratti di bachi preventivamente infettati, diluiti, e poi trattati col formolo (estratto B).

Preparazione dell'estratto S — La preparazione degli estratti fu affidata al Dr. Luigi Provasoli.

Cento bachi *Kokusan G. 7* vennero lavati in H₂O₂ diluita e addizionata dell'1% di oleato di sodio per abbassare la tensione superficiale. Indi si fecero due lavaggi in acqua distillata e due in acqua bidistillata sterile. I 100 bachi vennero poi pestati in un mortaio di porcellana con polvere di quarzo sterile; il pestato venne centrifugato una prima volta per 10 minuti a 3000 giri. La parte liquida del centrifugato venne trasportata sterilmente in tubi da centrifuga e sottoposta per 15 minuti a centrifugazione a 4500 giri. Il liquido ottenuto, di color verde giallastro, non venne diluito e fu posto in frigorifero a 0° per qualche ora; tolto dal frigorifero venne trasportato sterilmente a temperatura ambiente in provette sterili, senza diluirlo. L'estratto venne usato solo per via cruenta.

Preparazione dell'estratto A — N. 538 bachi *Kokusan G. 7*, appena usciti dalla 3.a muta, vennero infettati, somministrando loro con la foglia una poltiglia ricavata pestando bachi di 3.a e 4.a età ereditaria-

mente infetti; la poltiglia veniva diluita fino a che si scorgevano nei preparati 17-18 corpuscoli per campo. Dopo 48 ore 300 di questi bachi, prima del pasto del mattino, vennero portati da Bernareggio a Milano, ove vennero sottoposti agli stessi procedimenti usati per l'estratto S, e cioè pestatura e centrifugazione ripetuta. Il centrifugato appariva come un liquido spesso, opaco, di color verde pisello sporco. Fu messo in frigorifero a 0° per un'ora e mezza, poi si aggiunsero 20 cm. di acqua, ottenendosi in tutto 50-60 cmc. di liquido, che venne travasato, a mezzo di pipette a bolla, nelle provette sterili (2 cmc. di estratto per provetta).

Preparazione dell'estratto B — Una parte dell'estratto A venne trattata con formolo, portandolo gradatamente fino al 4.5% di contenuto in formolo; e fino a completamento di tali aggiunte fu conservato in frigorifero a 0°. Indi una parte di esso fu somministrata ai bachi di alcuni lotti per via cruenta, mediante micropipette sterili, e un'altra parte (circa 10 cmc.) venne usufruita per le somministrazioni per os.

Per i lotti IX e XV (razza *Ascoli*) e XXVII e XXXIII (*Chinese Oro*) anzichè usare un estratto, usammo il pesto totale di 20 bachi *Kokusan G. 7* sani, somministrato appena fatto.

Aspetto microscopico dell'estratto — Al microscopio gli estratti A e B si presentavano come liquidi omogenei; soltanto in qualche campo d'osservazione si vedevano minute goccioline di grasso. Mancava assolutamente ogni traccia di corpuscoli di pebrina; e non erano visibili batteri con l'osservazione a fresco.

Recipienti usati per gli estratti e loro preparazione — Fu usata esclusivamente vetreria in vetro neutro; essa venne lasciata in miscela solfo-cromica per 6 giorni, risciacquata abbondantemente in acqua corrente fino ad eliminare tutte le tracce di acido, poi lavata in acqua distillata (purezza chimica). Venne adottato il vetro neutro per evitare che variasse il pH nei tessuti del baco o nei liquidi da somministrare.

Effetti macroscopici dell'inoculazione — L'iniezione degli estratti larvali e, come in seguito abbiamo verificato, di qualsiasi liquido, aumentando repentinamente la quantità di liquido circolante, produce nel baco uno *shock* il quale lo immobilizza per un periodo di tempo che va da un quarto d'ora a mezz'ora. Il corpo del baco s'irrigidisce, di solito esso inarca il torace ripiegando la testa in basso, e s'inturgida in modo impressionante distendendo le pieghe della pelle della regione toracica che assume color paonazzo; la circolazione subisce qualche istante di fortissimo rallentamento, per poi lentamente riprendere. Talvolta il baco si capovolge con le zampe verso l'alto, dando l'impressione d'essere morto. I bachi in queste condizioni, se toccati, non reagiscono o reagiscono con movimenti minimi. Questi sono gli effetti immediati dell'iniezione; ma anche la pic-

cola ferita da essa prodotta può indurre qualche disturbo, il cui effetto si nota soprattutto durante le mute; e cioè, nel punto dell'iniezione si formano delle aderenze di tessuti che ostacolano qualche volta la muta del baco operato, a un punto tale che esso riesce a liberarsi dalla vecchia spoglia per tutta la regione del corpo anteriore alla ferita, ma non riesce a staccare il resto, per cui muore in breve tempo. Ma questi sono casi rari che nelle esperienze del 1936 si sono verificati solo eccezionalmente, perchè la pratica acquistata dall'operatore (R. GRANDORI) era tale che la ferita non era neppure visibile, anche poco tempo dopo l'operazione.

Luogo dell'iniezione — Questa veniva fatta, introducendo la punta della micropipetta, sterilizzata all'istante, nell'addome della larva tenuta opportunamente ferma fra le dita, e scegliendo, come linee atte all'introduzione, le linee intersegmentali fra 3° e 4° o fra 4° e 5° segmento addominale. In queste linee si aveva cura di scegliere un punto latero-dorsale topograficamente individuato in modo da non provocare alcuna lesione al vaso dorsale nè alle alette muscolari del medesimo, e neppure ai grossi tronchi laterali tracheali. Si aveva cura altresì che la punta della pipetta non ledesse i tubi malpighiani e l'intestino, ma cadesse insomma negli spazi del lacunoma. Con tutte queste precauzioni e operando con rapidità, e sotto moderato ingrandimento, si otteneva che il liquido iniettato si mescolasse all'emolinfa del lacunoma. Il più delle volte una gocciolina di emolinfa fuoriusciva dalla ferita dopo estratta la micropipetta; qualche volta però non v'era affatto o quasi affatto fuoriuscita di emolinfa. Per ogni inoculazione veniva usata una pipetta sterile.

Somministrazione degli estratti — Gli estratti furono somministrati in parte *per os* e in parte per via cruenta.

Nei trattamenti *per os* la foglia veniva tagliata a piccole strisce, immersa nell'estratto, ove si lasciava qualche minuto, e poi veniva data in pasto ai bachi ancora tutta bagnata. Ai bachi ai quali si voleva somministrare l'estratto si faceva precedentemente saltare un pasto, affinché essi appetissero meglio la foglia bagnata; negli esperimenti del 1935 l'espedito raggiunse sempre il suo scopo; nel 1936 i bachi di parecchi lotti rifiutarono la foglia benchè affamati, e di ciò si tenne sempre scrupolosamente nota, poichè è evidente l'importanza fondamentale del fatto che la sostanza somministrata venga realmente mangiata.

Nelle iniezioni per via cruenta, la quantità di estratto inoculata si calcolò da 3 a 5 mme. per ogni baco.

Le iniezioni si eseguivano nel Laboratorio di Milano, ove i bachi venivano portati in automobile al momento dell'iniezione, e subito dopo venivano riportati al luogo dell'allevamento (Bernareggio), e ciò perchè nei locali rustici di campagna non era possibile impiantare un Labora-

torio con tutti i mezzi di centrifugazione, sterilizzazione, ecc., nè disponevamo di bigattiere per condurre tali allevamenti a Milano, che del resto è ambiente poco adatto.

Infezioni pebrinose susseguenti alle somministrazioni degli estratti — Dopo 24 ore e 48 ore dalla somministrazione degli estratti, una parte dei bachi veniva infettata con foglia bagnata nella poltiglia di pochi bachi eredo-pebrinosi, diluita in modo che al microscopio si contavano 17-18 corpuscoli per campo.

Una parte invece dei bachi trattati con estratti non veniva infettata con pesto pebrinoso.

I risultati degli esperimenti

(Tabelle I - IV)

Razza Ascoli — Già durante l'allevamento, poco dopo i trattamenti, i bachi di razza *Ascoli* denotarono grande vivacità e voracità; la foglia fu somministrata ad essi con lo stesso numero di pasti e nella stessa quantità dei controlli; era data sempre in abbondanza, in modo che fra un pasto e l'altro ne rimaneva della residua; quindi non ci è possibile dire se i bachi trattati con gli estratti, dopo il trattamento abbiano mangiato di più.

Dopo qualche giorno si notava che i bachi crescevano più rapidamente di quelli dei controlli e raggiungevano, verso la maturanza, dimensioni vistosamente maggiori di questi ultimi. Infatti le cifre della tabella I, dimostrano che gli estratti somministrati hanno agito sui bachi come fattore di accrescimento supernormale, giacchè il peso unitario dei bozzoli di quasi tutti i lotti oscillò da un minimo di gr. 2,30 a un massimo di gr. 3,68, all'11° giorno dalla salita al bosco.

L'estratto B, contenente il formolo, abbinato alla susseguente infezione pebrinosa, che ha dato il 100% di infetti, ha esercitato, tanto *per os* che per via cruenta, un'azione decisamente sfavorevole sulla crescita del baco da seta. Inoltre, le somministrazioni per via cruenta di questo estratto davano origine, nel punto dell'inoculazione, a fenomeni di necrosi dei tessuti, ai quali seguì in parecchi individui, la morte. Però i superstiti che non subirono infezione pebrinosa susseguente all'inoculazione dell'estratto (lotto XIV) riuscirono a tessere bellissimi bozzoli con peso medio unitario di gr. 3,39. La sfavorevole azione dell'estratto B al formolo su quei bachi che subirono anche infezione pebrinosa, si spiega pensando che, se con l'estratto somministrato si

dava ai bachi una sostanza utile in mezzo al miscuglio, quei bachi però subivano intanto l'azione di due fattori sfavorevoli: formolo e infezione pebrinosa.

Supercrescita. — Colpisce in modo speciale il risultato massimo presentato dal lotto II, trattato con estratto A, con un peso unitario di

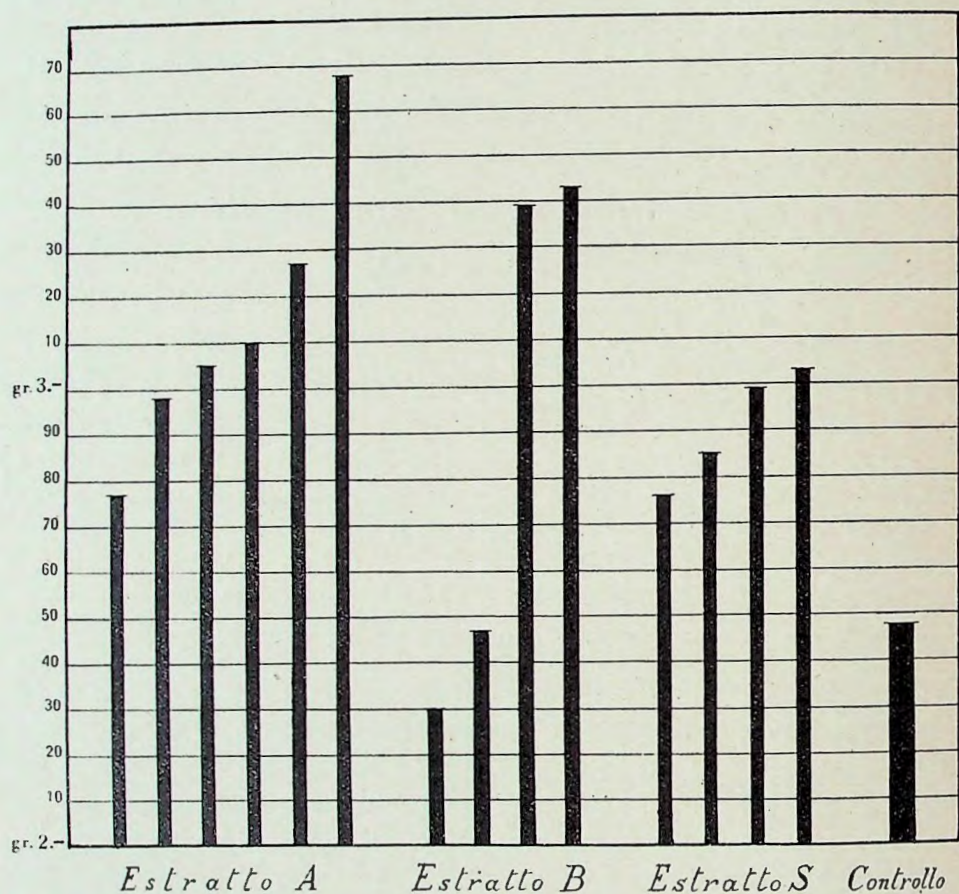


Fig. 1. — Effetti degli estratti larvali su razza *Ascoli* (1935). Ogni striscia nera indica, sull'asse delle ordinate, il peso medio unitario dei bozzoli del lotto che simboleggia.

gr. 3,68 per bozzolo, di fronte a un peso medio di gr. 2,48 presentato dall'allevamento di controllo della razza *Ascoli*, e nelle stesse condizioni di speciale accuratezza nell'allevamento; il guadagno nella crescita, in confronto al controllo, fu dunque del 48,38%. Se poi si confronta il massimo peso unitario dei bozzoli del lotto II, con quelli che si

sogliono ottenere per la razza *Ascoli* nei buoni allevamenti da riproduzione, si trova che contro il peso massimo da noi ottenuto di gr. 3,68 all'11° giorno, sta una media di gr. 2,23 per bozzolo (media del *QUAJAT* (53)) vale a dire un maggior rendimento in peso che supera del 65,02% il peso normale. Se infine si confronta il peso massimo unitario dei bozzoli del lotto II con quello della grande media dei bozzoli gialli indigeni cinturati, che è di gr. 1,85 (medie di *VERSON*) si trova che l'aumento fu del 98,91%.

Meno attivo, in complesso, si è dimostrato l'estratto S e la poltiglia ottenuta da 20 bachi *Kokusun* 7 e data *per os* ai lotti IX e XV.

Si è pensato che la differenza dell'efficacia dimostrata dai vari estratti per la supercrescita, dipendesse dal diverso grado di diluizione. Infatti, se si eccettuano i lotti ai quali fu somministrata infezione pebrinosa susseguente all'estratto, e cioè si considerano soltanto i lotti che hanno subito l'azione dell'estratto e non quella del parassita, raggruppando i lotti trattati a seconda della diluizione, si vede che i lotti trattati con estratto diluito (tabella III) segnano un peso medio unitario (gr. 3,35) molto superiore a quello dei lotti trattati con estratto concentrato (gr. 2,799), indipendentemente dalla presenza del formolo e dal modo di somministrazione (*per os* o *per via cruenta*). Dunque il grado di concentrazione ha influenza sul grado di efficacia dell'estratto.

Questi risultati concernenti la supercrescita sono graficamente riassunti nel diagramma della fig. 1.

Ricchezza in seta. — Furono pesati alla bilancia di precisione i bozzoli di tutti i lotti allo stato verde all'11° giorno dalla salita al bosco; dopo di ciò ne furono estratte le crisalidi e le spoglie, e furono pesati i corrispondenti involucri serici, ottenendo le cifre riportate nella tabella I. Risulta che la ricchezza in seta in tutti i lotti sperimentali si è mantenuta oscillante fra il 13% e il 17% circa, giungendo a un massimo del 17,63% nel lotto II e di 18,08% nel lotto 11, che è uno dei controlli. Giudichiamo che quest'ultima piccola differenza rientri nelle oscillazioni che si verificano fra diverse partite.

È da osservare che il minimo di 13,02% è stato raggiunto sempre dal lotto V, che è uno di quelli che hanno subito la somministrazione di un estratto con aggiunta di formolo e poi anche un'infezione sperimentale. E se si tien conto di questi particolari fattori avversi che si sono sommati in questo lotto, concludiamo che la ricchezza in seta si è mantenuta in tutti i lotti ottima, anche se la si confronta con la media presentata dai bozzoli di allevamenti da riproduzione, che è di 14,36% (*QUAJAT*).

Uniformità dei bozzoli. — Un altro fatto che colpisce l'osservatore è la grande uniformità dei bozzoli ottenuti dai lotti trattati con gli e-

stratti in questione, segnatamente per i lotti II e XIII, che sono riprodotti nella Tavola I (III) insieme al lotto 11 di controllo.

Irrobustimento generale. — Altre osservazioni risultanti dai nostri esperimenti convergono a dimostrare che gli estratti da noi usati hanno conferito a molti lotti, sempre della razza *Ascoli*, un sensibile o anche assai spiccato grado di irrobustimento generale, che si esprime con un grado più o meno elevato di resistenza generale alle malattie.

Questo grado di resistenza generale alle cause morbose o debilitanti è leggibile abbastanza chiaramente attraverso le cifre delle perdite dei bachi nei singoli lotti durante il corso dell'allevamento, dettagliatamente esposte nella tabella II, dalla quale si rileva che l'effetto di irrobustimento generale fu variabile:

a) a seconda del modo di somministrazione dell'estratto, e cioè a seconda che la somministrazione sia stata per via cruenta o per os. Precisamente, gli effetti massimi si ebbero nei lotti a cui l'estratto fu somministrato per os (perdite durante l'allevamento 7,9%), e gli effetti meno sensibili o minimi si ebbero con le somministrazioni per via cruenta (perdite durante l'allevamento 23,5%);

b) a seconda della natura dell'estratto; e precisamente, il massimo delle perdite si riscontrò nei lotti trattati con l'estratto B, al formolo (media delle perdite 18,5%) mentre i lotti trattati con l'estratto A ebbero una media di perdite del 4,4%, e quelli trattati con l'estratto S presentarono una media di 2,1%.

Razza Chinese Oro. — Dalla Tabella IV risulta ben evidente che la razza *Chinese Oro* non fu sensibile ai trattamenti con l'estratto di *Kokusan G. 7*. I pesi medi unitari dei singoli lotti di questa razza a cui fu somministrato l'estratto oscillarono intorno a quelli del controllo, con una tendenza però verso valori inferiori a questo.

Anche per ciò che riguarda l'irrobustimento, la razza *Chinese Oro*, come si rileva dalla Tabella IV, ha dato in parecchi lotti perdite (escluse quelle per trauma dell'iniezione) uguali o superiori a quelle del controllo, giungendo fino al 30% di perdite; anzi, ben confrontando i risultati ottenuti per le due razze, si arriva a concludere che l'estratto *Kokusan G. 7* deve aver nuocito alla razza *Chinese Oro*. Questo effetto malefico è ben evidente nei trattamenti per via cruenta, in cui la barriera intestinale non ha potuto impedire l'entrata in circolo di sostanze evidentemente sfavorevoli ai bachi di questa razza.

Naturalmente, questo fatto non implica, come deduzione necessaria, che le sostanze ritenute quali fattori di supercrescita e d'irrobustimento, che si dimostrano attive sulla razza *Ascoli*, non possano anche essere favorevoli alla razza *Chinese Oro* quando si potessero isolare e

somministrare allo stato di purezza. E cioè si può pensare che l'estratto totale di bachi *Kokusan G. 7* potesse contenere, insieme ai principi attivi, sostanze sfavorevoli al metabolismo dei bachi di razza *Chinese Oro*, che annullassero l'azione favorevole dei fattori di crescita e d'irrobustimento.

Gli effetti degli estratti larvali in rapporto all'infezione pebrinosa

Come risultava dall'osservazione diretta dell'estratto, e come risulta dall'esame della tabella II, nessuna spora matura di *Nosema* era presente negli estratti dei bachi *Kokusan G. 7*, in seguito alla preparazione degli stessi, dimodochè i bachi di razza *Ascoli* e *Chinese Oro* che ebbero somministrazione di estratti di bachi *Kokusan G. 7* preventivamente infettati diedero farfalle sane al 100%. Siccome questi lotti, che potevamo anche ritenere infetti sino all'esame delle farfalle, furono allevati vicini a quelli effettivamente infettati, e furono protetti da infezioni sopravvenienti dall'ambiente mediante campane di cellofane, si ribadisce qui ciò che si è affermato sull'efficacia della protezione per mezzo di campane contro l'infezione pebrinosa. Al contrario, i lotti in cui alla somministrazione degli estratti seguì l'infezione pebrinosa, diedero sempre in tutte e due le razze un certo numero d'infetti, e in qualche caso si arrivò al 100% di infetti per la razza *Ascoli*. Il che dunque significa che gli estratti larvali non comunicarono direttamente l'infezione pebrinosa ai bachi di razza *Ascoli* e *Chinese Oro*, ai quali furono somministrati, ma che però appena i corpuscoli furono somministrati ai bachi trattati con estratto, la pebrina attecchì dando altissime percentuali di pebrinosi. Quindi, certamente l'estratto *Kokusan G. 7* non ha comunicato immunità specifica contro la pebrina. Ma, data la bassa percentuale di perdite e la forte supercrescita, bisogna concludere che l'estratto larvale somministrato ai bachi di razza *Ascoli* ha ad essi conferito, oltre alla supercrescita, un certo grado d'irrobustimento, che si esprime nella minor percentuale di perdite, anche in quei lotti che furono, dopo la somministrazione dell'estratto, infettati gravemente di pebrina.

PARTE II

Piano generale degli esperimenti del 1936

Il risultato degli esperimenti del 1935 indusse ad approfondire il problema della natura delle sostanze che potevano aver determinato l'effetto della supercrescita e dell'irrobustimento. Il compito della ricerca di queste sostanze ci apparve necessario, benchè difficile e complesso, per togliere dall'empirismo, nel cui campo restavano relegati, i risultati delle nostre esperienze del primo anno di lavoro.

D'altra parte, gli estratti usati erano estratti totali, nei quali erano compresi gli estratti di tutti gli organi larvali, oltrechè il contenuto intestinale. Ed appariva sommamente arduo operare con estratti dei singoli organi in esperienze separate, per ricercare da quali di essi provenissero le sostanze attive. Molto più logico ci parve, dopo uno studio biochimico del problema, fissarci su un certo numero di sostanze, la cui presenza è già da tempo accertata nel corpo del Bombice, e che potevano, con una certa verosimiglianza, ritenersi come cause agenti specifiche dei fatti da noi accertati.

Ma oltre a queste sostanze, pensammo anche di estendere la sperimentazione ad altre sostanze di natura ormonica, vitaminica e trofica, al fine di accertare se — oltre alle sostanze normalmente presenti nel corpo del Bombice — altre ve ne fossero capaci di spiegare analoga azione attivatrice del ricambio dell'insetto.

Nello stesso tempo, nel 1936, decidemmo di ripetere le esperienze del 1935, con estratti larvali da somministrare *per os* e per via cruenta.

Predisponemmo quindi due serie di allevamenti sperimentali:

A) allevamenti *precoci*, da effettuarsi in aprile, usando in parte foglia ottenuta da gelsi coltivati nella serra del Laboratorio. Questo primo gruppo doveva servirci di orientamento per gli allevamenti normali di maggio-giugno, inquantochè, somministrando ad essi diversi estratti di lepidotteri, nonchè preparati e sostanze chimiche varie, noi avremmo potuto, alla fine di aprile o nei primi giorni di maggio, raccogliere dati e risultati sull'efficacia o meno dei singoli trattamenti e prescegliere, per una più larga sperimentazione sugli allevamenti normali primaverili, quelle sostanze che si fossero dimostrate attive.

B) allevamenti *in epoca normale* (maggio-giugno), da eseguirsi in varie località, possibilmente in pieno ambiente agrario, affidando le cure dell'allevamento ed anche la somministrazione delle sostanze ritenute attive (sempre sotto la nostra sorveglianza) a mani di contadine semplicemente esperte nell'allevamento ordinario del baco da seta.

Nell'esposizione del lavoro abbiamo seguito il criterio di distribuzione della materia in capitoli, distinguendoli per trattamenti; per ogni trattamento poi abbiamo tenuto distinti gli esperimenti precoci da quelli normali.

Possiamo distinguere i seguenti gruppi di sostanze sperimentate:

I°) Estratti larvali di razza Kokusan Giappone 7 e di Bivoltino Awoijku.

II°) Aminoacidi: tirosina, valina, istidina, triptofano, prolina, leucina, serina, alanina, arginina, glicocola, fenilalanina, acido aspartico, acido glutammico.

III°) Vitamine: lattoflavina (vitamina B₂), vitamina A, B (complesso), C, D.

IV°) Peptone di seta.

V°) Abbinamenti di lattoflavina con altre sostanze.

VI°) Ormoni: tirossina, deidrofollicolina, deidroandrosterone, androstendiolo.

VII°) Trasfusione di emolinfa di bachi da razza a razza.

VIII°) Estratti e sostanze varie.

IX°) Acqua bidistillata.

Somministrazione di estratti larvali

a) *Allevamenti precoci*

(Tabella V)

Negli allevamenti precoci si fecero esperienze d'orientamento con estratti larvali tendenti a chiarire se l'efficacia di questi fosse in relazione con l'età dei bachi fonte dell'estratto, e con le quantità di larve da usare per la preparazione dell'estratto stesso.

Decidemmo di preparare un estratto di larve di Kokusan 7 per ogni età larvale, da somministrare a bachi coetanei o a bachi di età maggiore di razza *Ascoli*. Riguardo alla quantità di larve da usare per l'estratto, si stabilì di sacrificare un numero di larve di razza Kokusan G. 7 che complessivamente pesassero circa 1/20 del peso complessivo

dei bachi a cui l'estratto veniva somministrato. Si venne così a somministrare ad ogni baco degli allevamenti precoci del 1936 una quantità di estratto incomparabilmente minore di quella usata nel 1935.

La preparazione degli estratti, che furono somministrati per sola via orale, fu eseguita secondo la tecnica del 1935.

Si stabilì di usare l'estratto in due diluizioni: 2 parti di estratto e 1 di acqua, e 1 parte di estratto e 5 di acqua.

Delle somministrazioni date a bachi di 1.a e 2.a età non si poté tener conto, essendo difficile decidere, anche con accurata osservazione, se i bachi avevano effettivamente mangiato, e in quantità sufficiente, gli estratti aggiunti alla foglia.

Fra le somministrazioni fatte a bachi di 3.a, 4.a e 5.a età, si tenne conto soltanto di quelle per le quali eravamo matematicamente sicuri che gli estratti erano stati mangiati dai bachi.

L'esito di questi esperimenti fu in parte assai dubbio, inquantochè un certo numero di lotti trattati diedero pesi medi unitari oscillanti intorno a quello dei rispettivi controlli, qualche altro lotto diede peso inferiore ai controlli, qualche altro infine diede pesi nettamente superiori ai controlli. Però, riflettendo che tutti i lotti che hanno servito a quell'esperimento si trovavano nello stesso locale ed ebbero le stesse cure, a prescindere naturalmente dalle speciali somministrazioni, si deve concludere che le oscillazioni dei pesi medi unitari dei lotti di controllo, che vanno da un minimo di gr. 2,34 a un massimo di gr. 2,78, ed entro cui sono compresi quasi tutti i valori dei lotti trattati, sono tali da far dubitare dei risultati in parte positivi ottenuti. È vero che il peso medio unitario di maggior valore è stato raggiunto da un lotto di *Ascoli* in 5.a età, a cui fu somministrato estratto di *Kokusan G. 7* in 3.a età (gr. 2,88), ma è anche vero che il lotto 48, a cui fu pure somministrato un pasto con estratto di *Kokusan G. 7* di 3.a età per due volte (cioè in 4.a e 5.a età) ha dato un peso medio unitario molto basso, cioè gr. 2,26, inferiore non soltanto a quello del rispettivo controllo, ma anche a quello del controllo peggiore di gr. 2,34.

Ritenemmo quindi che l'esito di questi esperimenti precoci non fosse tale da poterci servire di guida per decidere (onde applicarlo negli allevamenti primaverili) se ed in qual misura influissero sull'efficacia del trattamento l'età della fonte di estratti e quella dei soggetti, e la ripetizione del trattamento. E perciò decidemmo, per gli allevamenti di maggio-giugno, di preparare gli estratti larvali press'a poco con le stesse modalità con cui si prepararono nel 1935.

b) *Allevamenti normali*

Si dispose per eseguire somministrazioni di estratti tanto per via cruenta come per via orale. Purtroppo però gli esperimenti per via orale, per i quali avevamo istituito una cinquantina di lotti di 100 bachi ciascuno, non ci fornirono risultati perchè i bachi rifiutarono di mangiare la foglia bagnata con gli estratti.

Riferiremo quindi soltanto sugli esperimenti per via cruenta.

Razze fonte d'estratto. — Usammo la *Kokusan G. 7*, importata dal Giappone nel 1935 e il *Bivoltino Awojku*, tutte cortesemente forniteci dai Colleghi Prof. FOÀ, LOMBARDI e PICORINI.

Razze soggette alle somministrazioni. — Ci fornimmo di seme di razza gialla indigena, proveniente da due diverse Ditte confezionatrici, alle quali avevamo richiesto esplicitamente razza *Ascoli*. In effetto i bachi nati dal seme proveniente da una delle due Ditte diedero bozzoli misti, in parte di razza gialla indigena sferica, in parte di razza cinturata. La razza a bozzolo cinturato era verosimilmente *Ascoli*, e quella sferica verosimilmente *Majella*; numericamente era in prevalenza quest'ultima. Tenendo conto di questo fatto e dell'altro, già a noi noto dall'anno scorso, che razze diverse non reagiscono in ugual misura all'azione degli estratti, i risultati ottenuti, per quanto costantemente positivi, tuttavia nella loro entità vanno considerati sempre tenendo conto del fatto che noi lavoravamo su una mescolanza di razze.

L'*Ascoli* proveniente dall'altra Ditta, trattato con estratto di *Kokusan G. 7*, non diede alcun risultato.

Le altre razze trattate furono la *Majella* e il *Bianco Novi*, che risultarono razze pure.

Gli estratti preparati. — Per attenerci a tutte le modalità seguite per gli esperimenti del 1935, infettammo di pebrina alcuni lotti di *Kokusan G. 7* e *Awojku*, che ci dovevano servire come fonti dell'estratto di tipo A.

Preparammo anche estratti di tipo S, e cioè di bachi di *Kokusan G. 7* o *Awojku* non preventivamente infettati. Tutti e due gli estratti vennero diluiti con una parte di acqua su due di estratto.

Anche per la preparazione di questi estratti si usò la stessa tecnica del 1935, precedentemente descritta.

I risultati. — La tabella V presenta i risultati ottenuti i quali denotano che, pur non essendo essi così cospicui come l'anno scorso, un guadagno netto nel peso medio unitario si è avuto tanto per la razza *Majella* pura quanto per la razza mista cinturata-sferica. Rispetto ai propri controlli, i bozzoli dei lotti trattati hanno raggiunto un aumento

massimo in peso del 24,6%. Tuttavia si deve tener conto che alcuni controlli erano già stirpi di bachi di splendido sviluppo corporeo, e i loro bozzoli raggiunsero pesi molto alti; quindi resta più difficile alle sostanze attive indurre nei soggetti trattati aumenti di peso tali da superare quelli di così splendidi controlli, nei quali l'accrescimento è già giunto verso i limiti massimi. Inoltre, nessun lotto di razza mista cinturata-sferica, trattato o no con estratto, allevato negli stessi locali, dalle stesse persone, con le stesse cure, ha dato un peso medio unitario così forte come quello del lotto 31 B, che fu di gr. 3,145 all'8° giorno dalla salita al bosco, valore che supera del 37% quello dei buoni allevamenti da riproduzione, e supera del 70% la grande media agraria dei gialli indigeni cinturati. Tale risultato fu ottenuto con estratto di bachi *Awoijku* di 4.a età a bachi di razza mista gialla indigena a bozzolo cinturato e sferico di 4.a età.

L'esperimento dei lotti 39B e 40B su razza mista in 4^a età, che hanno dato pure un guadagno del peso medio unitario del bozzolo rispetto al controllo del 24,3% e 24,6%, hanno particolare valore perchè furono condotti su un buon numero d'individui (50 bachi per lotto).

Infine si è voluto sperimentare anche l'inoculazione degli estratti di *Kokusau G. 7* di 3.a età a *Majella* di 3.a età, ottenendosi anche in questo caso, un guadagno del 9,2%. Il peso medio unitario del lotto trattato supera in modo sensibile il massimo valore raggiunto dalla razza *Majella* in altri lotti di controllo allevati nella stessa località.

La razza *Bianco Novi* invece ha dato, nei due lotti trattati, pesi medi unitari che oscillano intorno a quello del controllo.

Discussione dei risultati. — Non avendo operato in quattro casi (lotti 31B, 32B, 39B, 40B) su razze pure, difficile è giungere a conclusioni precise, anche perchè — appunto perciò — non si possono comparare i risultati del 1936 con quelli del 1935, anno in cui si è operato su una razza molto pura.

Tuttavia, pur restando il massimo peso medio unitario del 1936 (lotto 31) notevolmente al disotto del massimo raggiunto nel 1935 (lotto II trattato per via cruenta con estratto di *Kokusau G. 7* appena importato dal Giappone) non si può negare che anche nel 1936 i risultati dimostrano sempre una supercrescita connessa certamente con l'azione di sostanze attive introdotte con l'estratto. Anche quest'anno i bozzoli dei lotti trattati sono molto più uniformi di quelli dei controlli, e cioè si sono ripetuti gli stessi effetti di *supercrescita* e *uniformità* osservati l'anno scorso. Ma tanto nei lotti trattati come in quelli di controllo si sono avute quest'anno parecchie perdite, come ben si rileva dalla tabella V.

Se si tien conto del fatto che le somministrazioni si fecero per via cruenta e talvolta furono seguite da infezioni pebrinose gravi, si può anche ritenere molto significativo il risultato offerto dalla razza pura *Majella* nel lotto 43B. In questo lotto si ebbero dieci bozzoli da dieci bachi

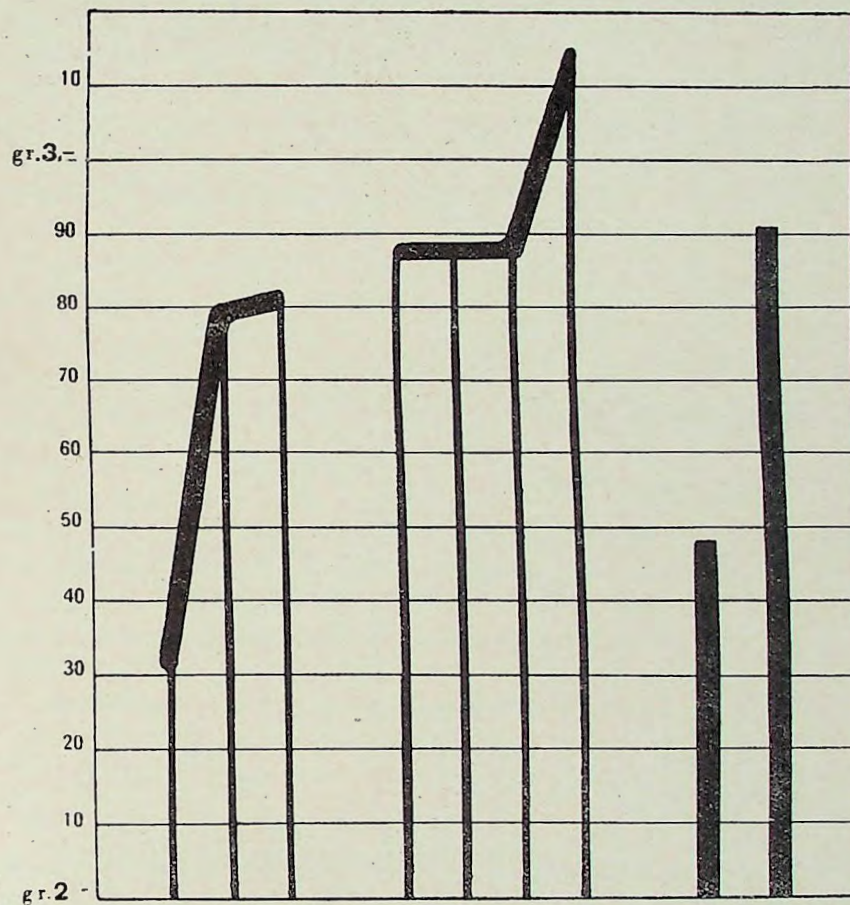


Fig. 2. — Effetti dei trattamenti per via cruenta con estratti larvali di razza *Awoijku* e *Kokusau Giappone 7* su razza *Ascoli-Majella* mista. Ogni striscia nera rappresenta sull'asse delle ordinate, il peso medio unitario dei bozzoli del lotto che rappresenta. Le prime tre strisce a sinistra indicano i pesi medi del bozzolo dei 3 lotti di controllo; le 4 strisce successive indicano quelli dei lotti trattati; le ultime due strisce più grosse indicano le medie dei controlli e dei trattati.

iniettati in 3.a età con estratto di *Kokusau G. 7* coetanei, preventivamente infettati; a tale iniezione seguì una infezione sperimentale di pebrina. Ebbene, questo lotto diede tuttavia 0% di perdite, mentre il lotto di controllo dava il 7% di perdite. È evidente in questo caso che

l'azione d'irrobustimento è stata efficacissima perchè un'infezione pebrinosa data in 3.a età anzichè in 4.a, avrebbe dovuto produrre una certa percentuale di perdite, maggiore di quella del controllo sano.

In quanto alla razza *Bianco Novi*, essa, oltre a non aver presentato supercrescita con l'estratto di *Kokusan G. 7*, segna anche un peggioramento deciso nella percentuale delle perdite, che nei lotti trattati (104B e 105B) oscilla dal 14% al 16%, mentre nel lotto di controllo (108B) è del 4%.

Una maggiore irregolarità nei risultati delle perdite si nota nella razza mista cinturata-sferica, che, in complesso, dà perdite talvolta uguali, talvolta superiori, talvolta inferiori a quelle del controllo.

Se si confrontano in complesso i risultati del 1936 con quelli del 1935, si conclude che certamente nel 1935 devono aver agito, molto più intensamente che nel 1936, fattori di crescita e d'irrobustimento contenuti nell'estratto, e che ci restano ancora sconosciuti.

Non è possibile dire se la differenza fra il 1935 e il 1936 nell'efficacia dei fattori attivi dipenda dalla fonte diversa dell'estratto, il quale certamente differiva nelle due annate, tanto dal punto di vista qualitativo che quantitativo. Infatti i bachi *Kokusan G. 7* fonti di estratti nel 1935 erano allevati per la prima volta in Europa e quelli del 1936 erano i figli di questi. Inoltre per quanto si continuo i bachi da pestare, è impossibile pensare che iniettando in ogni baco 2-3 mm.³ di estratto diluito, si introducano sempre in ciascun baco le quantità ottimali. Infine, anche nelle poche ore necessarie alla preparazione e somministrazione degli estratti, non si può escludere che in essi avvengano parziali decomposizioni, ossidazioni o comunque alterazioni anche minime, di qualcuna delle complesse sostanze; e tali alterazioni possono contrapporre ai fattori utili fattori contrari.

Somministrazione di aminoacidi

(Tabelle VI - VIII)

a) Ricerche precedenti e discussione

Parecchi sono stati gli esperimenti precedenti ai nostri, di alimentazione del baco da seta con aminoacidi aggiunti alla foglia. Fra i più importanti a noi noti sono gli esperimenti di KAZANCEV (38), di PICORINI (51), di DEMIANOWSKY (18) e di DEMIANOWSKY e PLATOWA (19).

KAZANCEV spruzzando foglie di gelso con soluzione di aminoacidi, ha ottenuto una maggior produzione di seta.

ABDERHALDEN (3), invece che sul baco da seta, ha sperimentato sulle larve della *Deilephila euphorbiae*, spruzzando le foglie di cui essa

si alimenta con triptofano, cistina, acido glutammico, arginina, lisina, istidina, ecc. Fece le soluzioni di questi aminoacidi in acqua, ma non accenna se abbia somministrato anche la tirosina. Egli ricondusse le soluzioni alla reazione neutra. Le spruzzature furono eseguite ogni mezz'ora; l'Autore non notò un distinto e determinato influsso di tali sostanze sulla crescita della *Deilephila*.

PICORINI, trattando il problema prevalentemente dal punto di vista chimico, usò nei suoi esperimenti un unico aminoacido, la glicocola, che somministrò al baco da seta, e che risultò tossica quando somministrata in una soluzione al 25% durante tutti i pasti della vita del baco, mentre fu sopportata dal baco se somministrata alla diluizione del 2,5% durante tutti i pasti. La soluzione di glicocola fu spruzzata sulla foglia mediante un comune spruzzatore di liquidi. PICORINI ha ottenuto col trattamento mediante glicocola, bozzoli più pesanti di quelli del controllo, ma essi furono superati nel peso dal lotto i cui bachi erano stati alimentati con foglia di gelso bagnata con acqua sola. La maggior quantità di seta è stata fornita dal lotto di controllo. Il residuo secco dei bozzoli risultò più ricco in azoto nei bozzoli i cui bachi erano stati trattati con glicocola, i quali diedero anche una maggior quantità di fibroina in confronto al controllo. L'Autore, partendo dal presupposto che il baco da seta introduca con la foglia di gelso una quantità di aminoacidi superiore al fabbisogno fisiologico, giunse alla conclusione che il baco da seta, nella sintesi della seta, « immobilizzi in essa quei corpi che, « permanendo liberi nell'organismo, sarebbero fonte d'intossicazione: « i prodotti di scissione delle albumine alimentari ».

Nell'epoea in cui il PICORINI fece le sue esperienze, non era noto il contenuto in aminoacidi della foglia di gelso, cosicchè egli riteneva che la foglia del gelso fornisse al baco una quantità di glicocola superiore al bisogno.

DEMIAOWSKY e PLATOWA nel 1926, fecero esperimenti su 920 bachi di razza *Ascoli*, aggiungendo alla foglia di gelso alcuni aminoacidi: glicocola, alanina, tirosina, triptofano. In quattro lotti gli aminoacidi furono somministrati ad ogni pasto dopo la 1.a muta; per determinare il titolo delle soluzioni da somministrare, gli Autori si basarono, per la glicocola, sulla innocuità della diluizione al 2,5%, dimostrata nelle esperienze di PICORINI, e in tale titolo la somministrarono; per gli altri tre aminoacidi (alanina, tirosina e triptofano) si basarono sulle proporzioni con cui, rispettivamente alla glicocola, essi sono contenuti nella seta. Cosicchè gli Autori poterono calcolare di aver dato complessivamente ad ogni baco gr. 0,500 di glicocola, gr. 0,310 di alanina, gr. 0,125 di tirosina, gr. 0,0125 di triptofano, e cioè quantitativi fortissimi in relazione alle quantità di tali sostanze che il baco accumula nel suo corpo.

Inoltre ai bachi fu data una quantità pesata di foglia, ma non mai in tale abbondanza da soddisfarli nei singoli pasti, per cui essi mangiarono sempre tutta la foglia senza lasciar residuo. Tale fatto probabilmente fu la causa del basso peso medio unitario del bozzolo ottenuto dagli esperimenti (gr. 1,5 circa).

Gli Autori suddetti sperimentarono in altri lotti il triptofano in soluzioni di diverso titolo, e a partire dalla 2.a età; somministrarono altresì, ma soltanto in 5.a età, la tirosina ed anche la caseina, che, come è noto, è ricca in triptofano non libero.

Riportiamo tre tabelle contenute nel lavoro dei citati Autori russi; da essi si rileva che i trattamenti con tirosina e triptofano, dalla 2.a età in poi e a tutti i pasti, sono, sia pure in minima misura, benefici per il baco da seta. L'effetto è rivelato da una piccola eccedenza in peso dei bozzoli freschi e secchi dei lotti trattati con tirosina e triptofano rispetto a quelli del controllo.

DEMIANOWSKY e PLATOWA (1927) — *Dati degli allevamenti sperimentali.*

N. dei lotti	Oggetto degli esperimenti	Durata della alimentazione giorni	Quantità della alimentazione grammi	Quantità delle sostanze aggiunte grammi
1	Glicocolla	35.2	1420	35.5
2	Alanina	38.5	1612	24.99
3	Tirosina	34.0	1361	8.51
4	Triptofano	34.5	1353	0.85
5	Triptofano	35.0	1407	1.76
6	Triptofano	32.0	1187	3.71
7	Controllo	34.5	1400	—
8	Tirosina	33.3	600	3.75
9	Controllo	34.0	625	—
10	Caseina	34.0	625	18.75
11	Controllo	34.2	645	—

DEMIANOWSKY e PLATOWA (1927) — *Risultati dei pesi dei bozzoli vivi.*

N. dei lotti	Trattamento	N. bozzoli	Peso totale dei bozzoli	N. bozzoli per 1 Kg.
1	Glicocolla	78	100.43	777
2	Alanina	71	105.45	673
3	Tirosina	71	105.43	673
4	Triptofano	78	114.14	683
5	Triptofano	60	82.06	731
6	Triptofano	59	71.11	765
7	Controllo	70	100.37	697
8	Tirosina	43	63.14	681
9	Controllo	61	96.81	630
10	Caseina	46	81.46	564
11	Controllo	31	57.48	591

Ma i valori delle eccedenze in peso — come risulta dalla tabella — sono così piccoli che, a nostro avviso, potrebbero rientrare nei limiti delle oscillazioni dovute agli errori probabili. Inoltre, la tirosina, somministrata nell'ultima età, non pare abbia dato buoni risultati nel riguardo dei pesi dei bozzoli, ma in tutti e due i trattamenti con tirosina in diverse età l'influsso benefico di questa sostanza è rivelato dalla minor percentuale di perdite (Vedi tabella qui annessa). Invece, analizzando bene i risultati ottenuti negli anni 1927-29 da Demianowsky, si giunge alla conclusione che, nel modo con cui furono condotti gli esperimenti, la tirosina non ha portato alcun giovamento (18).

DEMIANOWSKY e PLATOWA — *Tabella delle perdite negli allevamenti.*

N. dei lotti	Trattamento	N. dei bachi	N. bozzoli completi	Perdite	% Perdite
1	Glicocolla	86	78	8	9.3
2	Alanina	83	71	12	14.5
3	Tirosina	78	71	7	9.0
4	Triptofano	93	78	15	16.1
5	Triptofano	82	60	22	26.8
6	Triptofano	67	59	8	11.9
7	Controllo	85	70	15	17.6
8	Tirosina	47	43	4	8.5
9	Controllo	70	61	9	13.0
10	Caseina	48	46	2	4.2
11	Controllo	42	34	8	20.0

I due Autori russi giunsero alle seguenti conclusioni:

1°) che il migliore aspetto, comparando bachi e bozzoli dei lotti fra loro e col controllo, era quello dei lotti trattati con tirosina, e con forte dose di triptofano;

2°) che il trattamento con forte dose di triptofano ha abbreviato il periodo larvale di 2 giorni e mezzo;

3°) che la partita nutrita con tirosina ebbe per risultato di raggiungere il peso massimo dei bozzoli, sia freschi che secchi.

Nel 1930, DEMIANOWSKY (18) rendeva conto di ulteriori esperienze da lui condotte negli anni successivi alla prima pubblicazione. Egli usò di nuovo triptofano e tirosina, e sperimentò anche la cistina, giungendo alle seguenti conclusioni:

« I°) L'alimentazione del baco da seta con aminoacidi, anche « nei casi in cui essi vengono aggiunti al nutrimento normale, non rimane senza influsso sui fenomeni vitali del baco;

« II^o) Ciò risulta specialmente evidente con l'uso del triptofano
 « e cistina, esercitando il primo un influsso senza dubbio favorevole.
 « L'azione della tirosina è press'a poco uguale a quella del triptofano;
 « l'azione della cistina è nettamente negativa. L'effetto della glicocolle
 « e dell'alanina è in parte negativo. Resta insoluta la questione se questi
 « fenomeni non siano dovuti alla quantità notevole di azoto introdotto
 « contemporaneamente con gli aminoacidi.

« III^o) Esercitino gli aminoacidi un effetto positivo o negativo
 « sui fenomeni biologici del baco, il filo serico presenta a questo ri-
 « guardo una stabilità piuttosto grande; non si riesce a determinare in
 « esso sensibili differenze nelle proprietà fisiche e chimiche. Questo
 « asserto vale non solo per la generazione trattata, ma anche per la di-
 « scendenza. Perciò si può concludere che nessuna possibilità esiste di
 « produrre rilevanti cambiamenti nelle proprietà del filo nel corso di
 « un breve tempo, per esempio di due o tre anni.

« IV^o) La quantità di azoto e tirosina nella fibroina di bachi
 « nutriti con aminoacidi, differisce di poco dalla quantità di quelle del
 « controllo, ciò che non corrisponde al nostro concetto sull'escreto. Di
 « conseguenza l'idea che la seta è non l'escreto ma il secreto delle ghian-
 « dole della seta, si può considerare rafforzata anche dal punto di vista
 « chimico.

V^o) Una certa diminuzione della quantità di azoto nella fibroi-
 « na di lotti trattati con triptofano, contemporaneamente all'ingrossa-
 « mento della fibroina stessa, rafforza l'ipotesi già da noi espressa sulla
 « funzione di questo aminoacido negli organismi animali ».

Ma anche gli sperimentatori russi non hanno tenuto conto del con-
 tenuto in aminoacidi della foglia di gelso.

Il lavoro del KATAYAMA (37) sui composti azotati presenti nella
 foglia di gelso, ci fornisce invece una solida base per la comprensione
 di tutti gli esperimenti fatti sull'alimentazione del baco da seta con
 aminoacidi aggiunti alla foglia.

Il KATAYAMA preparò la foglia asciutta, facendola asciugare per
 6 ore al sole fino al punto in cui il suo contenuto in acqua si ridusse
 al 12.32%.

Dallo studio del lavoro di questo Autore riportiamo i seguenti dati
 sul contenuto in aminoacidi della foglia di gelso:

	Da un Kg. di foglia asciutta		Da 100 gr. di sostanze proteiche gr.
	Allo stato libero gr.	Per mezzo di idrolisi totale gr.	
Glicocolle	0,06	1,50	0,90
Alanina	1,00	19,00	11,00
Valina	0,47	10,50	5,60
Leucina	0,60	21,00	8,00
Prolina	0,05	2,50	1,40
Serina	—	2,00	0,80
Acido aspartico	5,10	6,00	2,40
Fenilalanina	0,60	2,50	2,30
Tirosina	presente	—	0,90
Guanina	0,10	—	—
Adenina	0,52	—	—
Ipoxantina	0,12	—	—
Istidina	0,20	1,30	0,96
Arginina	1,30	8,80	1,20
Lisina	0,93	6,60	1,70
Colina	1,90	2,30	—
Trigonellina	0,20	—	—

Non è segnalato in questa analisi il triptofano, che invece si trova, sia pure in piccola quantità, nella sericina (ABDERHALDEN).

In quanto alla tirosina, essa, mentre si trova in piccola quantità nella proteina pura della foglia (0,90%) non è stata riscontrata in quantità misurabili come tirosina libera e manca nei prodotti dell'idrolisi totale della foglia.

Dalla comparazione fra la quantità di aminoacidi contenuti nella seta e quelli contenuti nella foglia, risulta che mentre glicocolle, alanina e tirosina sono contenute nella foglia di gelso in piccola quantità, esse formano invece la parte più importante dell'involucro serico.

Per converso valina, leucina e acido aspartico, di cui è abbastanza ricca la foglia, sono contenuti nel bozzolo in piccola quantità. Inoltre, i diamminoacidi, ad eccezione dell'arginina, sono più abbondanti nella foglia di gelso che nel bozzolo.

Da ciò l'Autore conclude che « le relazioni quantitative dei composti azotati presenti nella foglia sono diverse da quelle dei composti chimici del bozzolo. Il fatto che il baco da seta riesce ad accumulare nel suo corpo composti azotati che nella foglia si trovano in piccola quantità, si può spiegare, secondo l'Autore, col fatto che il baco introduce una quantità di foglia che gli permette di sopperire ai suoi bisogni, e che nel baco da seta avvengono reazioni per le quali, dagli omologhi più elevati degli aminoacidi alifatici, si producono i termini

« più bassi degli aminoacidi, e dagli aminoacidi aromatici presenti in « maggior quantità nella foglia si producono nel baco quelli presenti « in essa in minor quantità ».

Come deduzione logica delle conclusioni del KATAYAMA, si deve ammettere che nei scritteri si svolge un'intensa concentrazione di alcuni aminoacidi non d'origine diretta alimentare ma derivati da altri d'origine alimentare. Questa deduzione tuttavia è passibile di considerazioni critiche basate sui dati che la chimica analitica ci fornisce.

* * *

Tutti i dati fornitici dall'analisi chimica della foglia di gelso, dei bachi, dell'involucro serico, delle farfalle, e i risultati degli esperimenti precedenti ai nostri e dei nostri sulla fisiologia della nutrizione del baco da seta, permettono oggi di orientarci con una certa sicurezza davanti al problema del valore generale e specifico, per il baco da seta, di alcuni aminoacidi d'origine alimentare, nonchè sul potere che ha il baco di produrre, per attività dei suoi tessuti, aminoacidi che non riceve con l'alimento in quantità sufficiente, e che gli sono indispensabili per determinate funzioni.

Dal lavoro di ABDERHALDEN e DEAN (4) sul contenuto in aminoacidi del baco da seta maturo risulta che: « Zur Hydrolyse wurden 685 « g. bei 100° bis zur Gewichtskontanz getrocknete Seidenraupen ver- « wendet. Sie enthielten 4% Aschenbestandteile. Die Seidenraupen wur- « den mit der fünffachen Mengen 25% iger Schwefelsäure 16 Stunden « am Rückflusskühler gekocht. Es blieben 133,6 g. Melaninsubstanz un- « gelöst zurück. Die filtrierte Gesamtflüssigkeit wurde dann auf 8600 « ccm. aufgefüllt und in 100 ccm. den Stickstoffgehalt nach Kjeldah fest- « gestellt. Er betrug 10% der trockenen, asche-und melaninfreien Sub- « stanz ».

Questo 10% della sostanza secca è quindi rappresentato da gr. 52,4 di azoto. Calcolando da questo il contenuto in proteine greggie, si ottengono gr. 327,5 di proteine greggie su 685 gr. di bachi secchi. In effetto dei 327,5 gr. ottenuti in seguito a calcolo, sono stati assegnati, in seguito ad analisi chimica, ai vari aminoacidi i seguenti quantitativi:

Glicocolla	Gr. 33,5 = 10,2%	della sostanza proteica del baco
Alanina	» 28,5 = 8,7%	idem
Valina	» 5,5 = 1,7%	idem
Leucina	» 16,0 = 4,8%	idem
Acido aspartico	» 5,2 = 1,6%	idem
Acido glutammico	» 11,5 = 3,5%	idem
Fenilalanina	» 8,0 = 2,4%	idem
Tirosina	» 14,0 = 4,3%	idem
Prolina	» 5,0 = 1,5%	idem

b) Considerazioni e calcoli

Noi abbiamo riportato il peso secco dei bachi al peso vivo, mediante il calcolo del contenuto in acqua del baco maturo (circa 76% del peso totale), desumendo che 685 gr. di bachi secchi equivalgono a gr. 2854 di bachi freschi, e quindi la percentuale di aminoacidi contenuti nei bachi vivi è approssimativamente:

Glicocolla	1,103%
Alanina	0,99 %
Valina	0,19 %
Leucina	0,56 %
Acido aspartico	0,18 %
Acido glutammico	0,40 %
Fenilalanina	0,28 %
Tirosina	0,49 %
Prolina	0,17 %

Queste percentuali da noi calcolate, riportate ai bachi vivi, sono quelle che normalmente ci danno conto del contenuto degli aminoacidi del baco maturo. Al contrario, in parecchie pubblicazioni sull'argomento vengono riportate le percentuali date da ABDERHALDEN per il contenuto degli aminoacidi nelle proteine del baco, ma anzichè riportarle come percentuale del peso delle proteine greggie della sostanza secca, vengono riferite come percentuali del peso totale della larva viva (67).

Prendendo ora come peso medio di un baco maturo il peso di 4 grammi, troviamo — in base ai dati analitici sopra riportati — che 1000 bachi contengono le seguenti quantità di aminoacidi:

Glicocolla	gr. 46,9
Alanina	» 39,9
Valina	» 7,7
Leucina	» 22,4
Acido aspartico	» 7,6
Acido glutammico	» 16,1
Fenilalanina	» 11,2
Tirosina	» 19,6
Prolina	» 7,0

Dall'analisi della foglia di gelso fresca che ci fornisce il lavoro di PICORINI (azoto proteico = 1,005%), abbiamo calcolato il contenuto in percentuale delle proteine pure della foglia stessa, moltiplicando il valore percentuale dell'azoto proteico per il coefficiente 6,25, ottenendo una percentuale di 6,28%. Abbiamo scelto i dati del PICORINI, perchè essi corrispondono ad una media degli stessi forniti da parecchi altri Autori.

In base a tale calcolo, e basandoci sulle percentuali del contenuto in aminoacidi della foglia tratte dal lavoro del KATAYAMA, attenendoci infine per il consumo della foglia, al massimo di 1000 Kg. di foglia per oncia, intendendo non foglia somministrata, ma effettivamente introdotta, 1000 bachi introdurrebbero durante tutta la loro vita:

Glicocolla	gr. 11,29
Alanina	» 137,50
Valina	» 70,00
Leucina	» 100,00
Acido aspartico	» 30,00
Fenilalanina	» 27,75
Tirosina	» 11,25
Prolina	» 17,00

Facciamo osservare che mentre per il peso del baco maturo ci siamo attenuti ad una media, per la quantità di foglia *effettivamente* introdotta da un baco abbiamo scelto un valore massimo, per non essere indotti in errori d'interpretazione.

Dalla comparazione del quantitativo totale dei singoli aminoacidi contenuti nel baco maturo con quello corrispondente contenuto nella foglia ingerita da ciascun baco nella sua vita, risulta che: la valina, l'alanina, la leucina, l'acido aspartico, la prolina, la fenilalanina, vengono introdotte in quantità più che sufficiente a coprire il fabbisogno trofico di questi aminoacidi, e probabilmente essi danno nel baco la loro quota energetica; mentre la tirosina e la glicocolla vengono introdotte in quantità insufficiente.

Trattamenti con tirosina

Fra gli aminoacidi, la nostra attenzione è stata rivolta soprattutto alla tirosina, che in una percentuale abbastanza notevole si trova nel baco maturo e nella seta, e che varia quantitativamente da una razza all'altra.

La tirosina ha importanza per i Vertebrati in quanto da essa si fanno derivare ormoni importanti come la *tirossina* e l'*adrenalina*.

Una difficoltà forte per la somministrazione della tirosina consiste nella sua trascurabile solubilità in ambiente neutro (mentre è solubile in acidi forti e in ammoniaca), cosicchè nei nostri esperimenti le somministrazioni tanto *per os* come per via *cruenta*, sono state fatte usando la l-tirosina in sospensione acquosa, dopo averla sciolta a caldo. Negli esperimenti *per os* l'ambiente alcalino dell'intestino medio del baco da seta deve aver solubilizzato parecchia tirosina; nelle prove per via *cru-*

enta, la tirosina iniettata anche in forma di sottilissimi aghi nel sangue di baco a pH = 6,7, non possiamo sapere in qual forma e modo abbia potuto essere usufruita.

Quindi i quantitativi di tirosina realmente somministrati al baco in questi esperimenti sono da calcolarsi con molta approssimazione.

Le nostre somministrazioni furono fatte partendo in un primo tempo dall'idea che la tirosina potesse servire come aminoacido specifico per l'accrescimento del baco da seta; idea che, diciamo subito, fu poi dimostrata esatta.

Alla stessa guisa che fra gli aminoacidi sperimentati sui Vertebrati, alcuni di essi sono risultati di certa necessità per l'accrescimento corporeo, noi pensavamo che la stessa funzione potesse esercitare la tirosina per il baco.

In seguito ai risultati delle esperienze, siamo rimasti molto in dubbio se effettivamente l'azione della tirosina sull'accrescimento sia da ritenersi *diretta*. Con una sola iniezione infatti, o con cinque somministrazioni nelle due ultime età del baco, nella sospensione del 5‰, si è giunti a somministrare al baco complessivamente una quantità di tirosina dell'ordine di qualche centomillesimo al massimo, ottenendo un accrescimento del bozzolo dell'ordine del mezzo grammo o poco meno.

Si può pensare ad un'azione ormonica indiretta della tirosina, nel senso che essa, introdotta nell'organismo, darebbe origine ad un ormone d'ignota natura, alla stessa guisa con cui nei Vertebrati dà origine all'ormone tiroideo. Tuttavia su questa interpretazione è meglio andar cauti, essendo nota come la somministrazione ai Vertebrati di tirosina in più di quella contenuta negli alimenti non aumenti la produzione nel loro corpo dell'ormone tiroideo (RONDONI).

Confrontando i risultati nostri con quelli di DEMIANOWSKY e PLATOWA, sull'influenza benefica della tirosina sull'accrescimento del baco, risulta che non è la quantità di tirosina somministrata il fattore che può agire, perchè noi somministrando una minima quantità di tirosina, circa 2000 volte inferiore a quella somministrata dai ricercatori russi, abbiamo ottenuto un incremento corporeo dei bachi della stessa razza *Ascoli* molto superiore a quello ottenuto dagli Autori russi, che segnarono un aumento massimo del 3% del peso medio unitario del bozzolo per effetto della tirosina sulla razza *Ascoli*.

Dal che si deve dedurre che in generale una piccola quantità di tirosina libera è sufficiente al baco da seta per imprimere una maggiore attività nella crescita, ed anche per regolare meglio il suo accrescimento, inquantochè i bozzoli dei lotti trattati sono molto più uniformi di quelli del controllo.



a) *Allevamenti precoci trattati con tirosina*

(Tabella VI)

Nel mese di aprile disponemmo una serie di esperimenti precoci con la tirosina su bachi di razza *Ascoli*. In questo primo gruppo di prove affidate al D. GIORGI ci proponevamo di sperimentare — usando dosi varie e ripetizione di trattamenti — quali fossero le dosi e i tempi di somministrazione ottimali. Siccome l'effetto di supercrescita del 1935 si era ottenuto con un solo pasto di estratto e con una sola iniezione dell'estratto stesso, decidemmo di somministrare la tirosina non a tutti i pasti, ma in pochi pasti.

Così si stabilì di usare la sospensione all'1% e al 5‰ e si decise di somministrare tali trattamenti con foglia bagnata, un pasto per ciascuna età. La sospensione al 5‰ si sperimentò anche con due pasti per ogni età, esclusa la prima.

S'immergeva la foglia nella sospensione di tirosina, la si faceva asciugare quasi completamente mediante leggera ventilazione fino a che sulla foglia si distingueva nettamente una sottilissima patina formata dai cristalli di tirosina. La foglia era appetita dai bachi.

Dopo due pasti di tirosina l'aspetto dei bachi trattati era visibilmente migliore di quello del lotto di controllo. Il risultato rappresentato nella tabella VI, rivela che l'effetto della tirosina è più favorevole quando essa è somministrata in piccolissima quantità per ogni pasto, cioè nella sospensione del 5‰. Il netto risultato di questi esperimenti precoci, confrontato coi risultati degli allevamenti normali di maggio e giugno con tirosina, che non sempre hanno dato risultati così forti e netti come i precoci, si può agevolmente spiegare con le cattive condizioni di alimentazione degli allevamenti precoci, non tanto come quantità di foglia, bensì come qualità.

Infatti, in un primo tempo ci servimmo della foglia di gelso ottenuta nella serra annessa al Laboratorio, e che era molto acquosa perchè proveniente da gelsini di 1 anno; in seguito, nella seconda metà di aprile, essa non fu più sufficiente, e fummo allora obbligati ad usare foglia di gelso stentatissima, giallastra, trasparente, racimolata qua e là nelle campagne milanesi; soltanto verso la fine dell'allevamento (fine di aprile) la foglia era un po' migliorata.

Noi pensiamo che per le suddette cause il baco di questi allevamenti precoci avesse a disposizione nella foglia una quantità assolutamente insufficiente di principi attivi agenti sull'accrescimento, cosicchè l'aggiunta di tirosina veniva a correggere un'effettiva insufficienza di origine alimentare, e quindi giovava in proporzione assai maggiore che negli allevamenti normali di maggio-giugno.

b) *Allevamenti normali trattati con tirosina*

(Tabella VI)

Dato l'esito degli esperimenti precoci fatti a Milano in aprile, si decise di allargare e di approfondire gli esperimenti con la tirosina, sola o associata alla lattoflavina. Per maggiore sicurezza, e cioè per evitare di essere in parte fuorviati nella valutazione dell'esito dall'influenza di fattori locali imponderabili, si stabilì di fare gli allevamenti dei bachi trattati in più località fra loro lontane, con quantitativi diversi di tirosina, somministrandola in diverse età o diverse combinazioni di età, per via orale e per via cruenta.

Gli allevamenti di maggio-giugno furono fatti nelle seguenti località:

Bernareggio: Villa del Dr. Guido Gallese (30 Km. da Milano).

Senago: Tenuta del Conte Borromeo (15 Km. da Milano).

Posteghe: Tenuta dell'Ing. Angelo Omodeo (13 Km. da Desenzano).

Le prove per via cruenta furono fatte trasportando dai luoghi di allevamento e di volta in volta a Milano i bachi da iniettare, assieme a quelli del controllo, per ritrasportarli ai luoghi d'allevamento dopo l'operazione. I trasporti si fecero in automobile chiusa.

Si ebbe cura che i bachi trattati e quelli di controllo avessero lo stesso numero di pasti, e fossero allevati in identiche condizioni.

La tirosina fu somministrata alle seguenti razze e nelle seguenti località: *Ascoli* (Bernareggio e Senago); *Majella* (Bernareggio e Senago); *Chinese Bianco* (Bernareggio); *Bianco Novi* (Bernareggio); *Varo* (Posteghe). Le razze più sensibili alle somministrazioni di tirosina fra tutte queste da noi sperimentate furono le razze *Ascoli* e *Varo*, come risulta dal grafico di fig. 3.

Dalla tabella dei risultati si rileva che non sempre i risultati sono positivi; e precisamente: su 19 esperimenti, 9 hanno dato risultati che rientrano nei limiti di oscillazione delle medie dei controlli, 4 hanno dato risultati di molto superiori ai massimi scarti delle medie dei controlli, 6 hanno dato uno scarto rispetto alla media di tutti i bachi di controllo sensibilmente superiore allo scarto massimo delle medie unitarie dei singoli controlli. Cioè, in più della metà dei casi i risultati sono positivi, qualunque sia la quantità somministrata.

In nessun caso il peso unitario medio dei singoli lotti trattati è stato inferiore allo scarto minimo offerto dai controlli. Tenendo conto dei fattori numerosi, agenti in modo differente a seconda della località e della razza, che si sono intrecciati, il risultato appare complessivamente positivo; il fatto però che nella metà dei casi il valore dei pesi medi uni-

tari dei lotti trattati rientra nelle oscillazioni dei controlli, fa pensare che la tirosina da sola non è un fattore di supercrescita in senso assoluto, ma che la sua azione è subordinata alla presenza di un attivatore, che non sempre è presente in quantità sufficiente nel corpo dell'insetto.

Confrontando tra loro i diversi trattamenti si deve poi concludere che i trattamenti più efficaci sono quelli effettuati nelle ultime due età, o nell'ultima età.

Gli esperimenti per via cruenta in V^a età diedero risultati nettamente positivi per la razza *Ascoli*, non decisivi per la razza *Majella* e *Bianco Novi*. Quest'ultima razza, come risulterà più innanzi trattando degli altri esperimenti, si dimostra poco sensibile, agli effetti della supercrescita, a somministrazioni di sostanze varie con qualsiasi metodo (via cruenta e orale).

I risultati in buona parte positivi degli esperimenti per via cruenta, tolgono di mezzo l'obbiezione che in queste prove possa essersi verificata un'azione di batteri intestinali sulla tirosina, con produzione di sostanze che verrebbero in un secondo tempo utilizzate dal baco.

c) *Discussione*

Si è veduto che il baco maturo ha accumulato nel suo corpo una quantità di tirosina superiore a quella d'origine alimentare, anche nella ipotesi estrema che il baco utilizzi attraverso il suo epitelio intestinale tutta la tirosina contenuta nel suo alimento e non ne consumi o ne trasformi una parte nel suo corpo.

Questo fatto induce già a supporre che il baco da seta sia capace di produrre tirosina o per derivazione da altri composti ciclici o per vera e propria sintesi. D'altra parte le nostre esperienze dimostrano che l'aggiunta di una piccola quantità di tirosina alla foglia di gelso determina fenomeni di supercrescita nel baco. Questo fatto sembrerebbe in contrasto con l'ipotesi che il baco possa produrre tirosina, almeno se si vuol giudicare in armonia col criterio generalmente adottato dai fisiologi: che un animale, se è capace di fabbricare una data sostanza, non mostra di usufruire — agli effetti della crescita — della stessa sostanza quando gli venga somministrata.

Però, se si tien conto che buona parte della tirosina viene immagazzinata nei seritteri, ben piccola appare la porzione di tirosina pertinente, nel baco maturo, a tutto il resto del corpo dell'insetto.

Le analisi dell'ABDERHALDEN d'altra parte ci permettono di comparare i dati analitici che riguardano il contenuto in aminoacidi del baco maturo, dell'involucro serico e della farfalla. L'ABDERHALDEN prese le

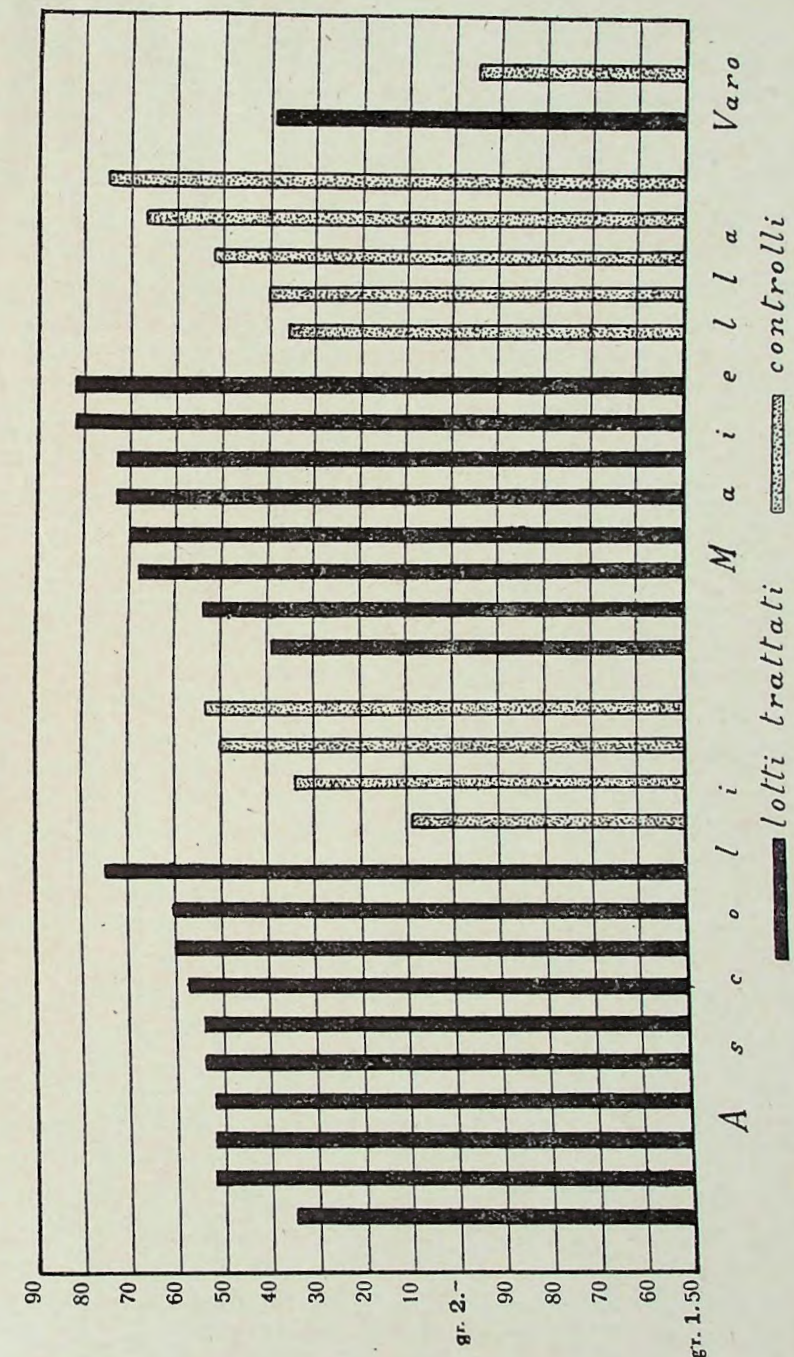


Fig. 3. — Risultati dei trattamenti con tirosina su 3 diverse razze gialle indigene. Sulle ordinate sono indicati i pesi unitari dei bozzoli; ogni striscia nera o punteggiata rappresenta un lotto.

farfalle appena uscite dal bozzolo, le uccise in alcool, le essiccò, e sottopose gr. 507,6 di tale sostanza secca all'analisi, e in base all'azoto che essa conteneva calcolò il contenuto in proteine greggie in 300 grammi.

L'idrolisi della sostanza secca diede le seguenti quantità di aminoacidi che l'Autore riportò a quantità percentuali:

Glicocolla	gr. 10,5 = 3,5%	delle proteine
Alanina	» 9,5 = 3,2%	» »
Valina	» 5,2 = 1,7%	» »
Leucina	» 25,5 = 8,5%	» »
Asparagina	» 8,2 = 2,7%	» »
Acido glutammico	» 17,2 = 5,7%	» »
Fenilalanina	» 8,0 = 2,7%	» »
Tirosina	» 4,8 = 1,6%	» »
Prolina	» 12,0 = 4,0%	» »

L'Autore conclude che « la farfalla si deve considerare, dal punto di vista chimico, come la larva diminuita del bozzolo ».

Il che non corrisponde alla realtà, almeno dal punto di vista biologico.

Per dare una base concreta ai nostri calcoli, usufruiamo dei dati del lotto di controllo 4P (razza *Varo*), allevato in condizioni agrarie ordinarie, che ha pesi medi unitari dei bozzoli e degli involucri serici corrispondenti a quelli delle grandi medie agrarie.

Di questo lotto, 1000 bozzoli vivi all'11° giorno pesavano gr. 2040; essiccati pesavano gr. 705; gli involucri corrispondenti pesavano all'11° giorno gr. 294, e a completa essiccazione gr. 291. D'altra parte SILBERMAN e LEWIS (59) hanno fatto nel 1932 la ricerca della tirosina nell'involucro serico di 13 specie diverse di Lepidotteri. Essi usarono per tale determinazione il metodo gravimetrico, e trovarono per il *Bombyx mori* i seguenti dati (medie di determinazioni duplicate):

Contenuto in H ₂ O	5,35%	} dell'involucro serico
Ceneri	2,37%	
Azoto totale	18,24%	} della sostanza secca
Tirosina	9,75%	

Riportando il contenuto in tirosina a 100 parti di involucri serici (comprese cioè le ceneri e l'acqua) il contenuto in tirosina scende al 9%.

Per i nostri calcoli sul lotto 4P in questione ci siamo quindi attenuti ad un contenuto in tirosina del 9%, nell'involucro serico; perciò il contenuto in tirosina dei 1000 bozzoli sarebbe di gr. 26,4, mentre i 1000 bachi maturi, attenendoci alle analisi dell'ABDERHALDEN, contenevano gr. 19,9 di tirosina. Le mille farfalle uscite dal bozzolo pesavano gr. 1545,06 e contenevano gr. 4,87 di tirosina. Cosicché la somma della tirosina presente negli involucri serici più quella presente nelle farfalle è di

gr. 31,27, cioè circa il triplo della quantità di tale sostanza introdotta con l'alimento durante la vita larvale, che è di gr. 11,25.

A partire dallo stadio di baco maturo adunque, attraverso la completa filatura del bozzolo e fino all'uscita della farfalla, la quantità di tirosina è diventata 1,5 volte maggiore; quindi la quantità di tirosina che il baco ha immagazzinato nei seritteri fino a che ha preso cibo, non è sufficiente alla formazione di tutto il filo. Se ne conclude con certezza che il baco produce tirosina in quantità notevole durante la filatura del bozzolo.

Se la quantità di tirosina che l'analisi segnala nei bachi maturi e nel bozzolo fosse d'origine alimentare, i bachi derivanti da un'oncia di seme dovrebbero consumare 2780 Kg. di foglia.

La pratica secolare dimostra che ciò non si verifica mai, e che la quantità di foglia realmente ingerita da un'oncia di bachi oscilla intorno ad 1/3 di questa cifra.

Ciò s'accorda perfettamente col risultato delle ricerche del CALUGAREANU (12), che, basandosi su pesature dei seritteri fatte su 300 individui di *Bombyx mori*, trovò che il peso dei seritteri nelle prime 20-25 ore di filatura del bozzolo rimane invariato, segno evidente che mentre il baco tesse il bozzolo ed espelle seta, nei suoi seritteri continua attivissima la secrezione di nuova seta, con formazione *ex novo* della tirosina che essa contiene.

Si spiega quindi benissimo il risultato sperimentale ottenuto da JUCCI (35) sul contenuto in acido urico dell'emolinfa del baco: secondo JUCCI il baco, quando ha raggiunto l'accrescimento massimo, contiene nell'emolinfa minor quantità di acido urico di quando esso è maturo (circa la metà). Egli, nello spiegare il fenomeno, si basava sulla convinzione, allora generale, che le ghiandole della seta nel baco maturo, avessero raggiunto il massimo sviluppo e contenessero tutta la seta occorrente alla filatura del bozzolo. Logicamente quindi egli doveva pensare che l'abbondanza dell'acido urico nel baco maturo fosse dovuta in gran parte ad accumulo di prodotti urici nel corso della V^a età. Invece la seta viene fabbricata anche durante la filatura, e viene prodotta dal baco, a spese di proteine protoplasmatiche diverse, la proteina specifica della seta.

Quindi il raddoppiamento della quantità di acido urico circolante che coincide con la maturazione del baco, è indice d'un metabolismo azotato non d'origine esogena, inquantochè il baco più non si alimenta, ma di elaborazione delle proteine di riserva o protoplasmatiche che devono servire soprattutto per la costruzione del bozzolo. Di questa elaborazione si avrebbero indizi anche anatomici, secondo le ricerche del Berlese (10).

Quali che siano le sostanze dalle quali il baco deriva o sintetizza la tirosina, tre sono le ipotesi sul luogo ove la tirosina può formarsi:

a) nei tessuti che immagazzinano durante lo stadio larvale so-

stanze che vengono poi usufruite durante la trasformazione del baco in crisalide;

b) durante la filatura del bozzolo, nella stessa bava serica quando questa esce all'esterno;

c) nei seritteri per l'attività specifica di queste ghiandole.

La prima ipotesi cozza contro il nostro risultato sperimentale: che il baco da seta in V^a età, quando già è attiva la formazione della seta e quindi quando dovrebbe essere abbondante nell'emolinfa la tirosina proveniente dai tessuti di riserva, è molto sensibile a piccole somministrazioni di tirosina libera.

La seconda ipotesi renderebbe inesplicabile il fatto che, prima ancora di tessere il bozzolo, il baco contiene nei suoi seritteri una parte di tirosina preformata.

La terza ipotesi risulta la più razionale; ammettendola, verrebbe spiegata l'apparente contraddizione fra il potere di produrre tirosina da parte del baco e la sua sensibilità ad essa nei fenomeni d'accrescimento. Resta però sempre l'obiezione come mai un animale che è capace di fabbricare così grande quantità di tirosina nei seritteri, non cede tale sostanza agli altri organi del corpo che — come l'esperimento dimostra — sono capaci in alto grado di usufruirla per la crescita. Al che si può rispondere anzitutto con la considerazione generale che la produzione della tirosina rientra nell'attività specifica ghiandolare dei seritteri, ed anche con la considerazione che la tirosina forma nella seta dei dipeptidi, tripeptidi, tetrapeptidi, che alla loro volta servono alla costruzione della molecola proteica che forma la seta; non si tratta quindi di produzione da parte dei seritteri di *tirosina libera*, come quella che deriva dalla digestione delle proteine della foglia, ma di *tirosina che nasce già come costituente di una specialissima molecola proteica*.

Accettando questa ipotesi razionale di una localizzazione nei seritteri del potere di produzione della tirosina, e negando questo potere a tutti gli altri organi del corpo, la tirosina sarebbe probabilmente uno degli aminoacidi che, secondo la legge del minimo, regolano la quantità di proteine che il baco introduce. Siccome essa è molto scarsa nella foglia, e certamente non si trova in proporzione costante in tutte le foglie di gelso, avviene che non sempre il baco ne introduce in quella quantità che è proporzionata alla sua massima capacità di crescita, almeno per alcune razze; cosicchè l'aggiunta di tirosina all'alimento deve agire in senso favorevole alla crescita del baco. Naturalmente si tratta sempre di quantità piccolissime dell'ordine di centomillesimi, cioè dell'ordine delle quantità piccolissime fornite al baco dalla foglia. E tutto questo si è infatti verificato nei nostri esperimenti.

Resta da approfondire la funzione della tirosina libera introdotta

con gli alimenti in rapporto alla crescita, e cioè se tale funzione sia di natura strettamente plastica o di altra natura.

Il confronto fra le piccole quantità di tirosina introdotte con le nostre somministrazioni e il forte aumento di peso corporeo ottenuto induce già a primo colpo d'occhio a sospettare che si tratti di azione eccitatrice e non già plastica. Tale azione eccitatrice si può mettere in evidenza con calcoli molto semplici.

Negli allevamenti di Posteghe, 5 trattamenti di tirosina operati in IV^a e V^a età diedero un aumento del peso dei bozzoli del 22% rispetto al controllo: la differenza fra i pesi medi dell'involucro serico del lotto trattato e quello del controllo è di gr. 0,075, di cui gr. 0,006 sono di tirosina. Calcolando molto largamente di aver somministrato complessivamente a ciascun baco gr. 0,0001 di tirosina in più di quella contenuta nei 20 grammi di foglia ingerita per tutta la vita, e facendo il rapporto fra la quantità di tirosina prodotta in più nel bozzolo per effetto della supercrescita e la tirosina introdotta sperimentalmente, si conclude che il baco ha prodotto una quantità in più di tirosina rispetto al controllo che è 60 volte circa la quantità di tirosina introdotta sperimentalmente. Ma la differenza risulta ancor più evidente nei trattamenti per via cruenta.

Ad esempio, nel lotto 156 B un involucro serico pesa gr. 0,400, e cioè gr. 0,077 in più di un involucro del controllo. Quindi, un baco del lotto trattato con tirosina ha prodotto nel solo involucro serico gr. 0,0069 di tirosina in più di quella prodotta da un baco del controllo. Invece un baco trattato ebbe con una sola iniezione una quantità di tirosina che si può considerare, esagerando al massimo, compresa fra gr. 0,0001 e gr. 0,00005. Il che significa che con tale quantità di tirosina somministrata, il baco ne ha prodotto una quantità da 70 a 140 volte maggiore.

È superfluo insistere nell'evidente conclusione che la tirosina somministrata in dosi tenuissime agisce da eccitatrice del ricambio e non come materiale plastico.

Trattamenti con gli altri aminoacidi

(Tabelle VII e VIII)

Abbiamo somministrato separatamente tutti gli aminoacidi elencati più sopra, ed inoltre abbiamo somministrato soluzioni di due o più aminoacidi associati fra loro secondo criteri di funzione chimica. Precisamente furono usate le associazioni seguenti:

- a) glicocollo + alanina
- b) valina + leucina
- c) acido aspartico + acido glutammico

- d) glicocollo + valina + leucina + alanina
- e) glicocollo + alanina + acido aspartico + acido glutammico
- f) glicocollo + alanina + serina
- g) glicocollo + alanina + lisina
- h) valina + leucina + acido aspartico + acido glutammico
- i) valina + leucina + serina
- l) valina + leucina + lisina
- m) acido aspartico + acido glutammico + lisina
- n) acido aspartico + acido glutammico + serina

I lotti furono di 100 e di 50 bachi di razza *Majella* od *Ascoli*; tutto questo gruppo di allevamenti fu eseguito nella Villa Borromeo di Senago.

Tutte queste associazioni, come pure gli aminoacidi isolati, furono somministrati in soluzione del 5 ‰, con tre tipi di somministrazione; un pasto ad ogni età, un pasto in prima ed uno in seconda età, un pasto per ognuna delle ultime tre età.

Gli aminoacidi scelti per l'esperimento sono quelli dati dall'analisi del baco maturo e della seta, ad eccezione della cistina, che è segnalata in piccole quantità soltanto nella seta idrolizzata.

Nelle tabelle VII e VIII abbiamo tenute separate le due razze *Ascoli* e *Majella*, sottoposte all'esperimento. I diversi lotti sono stati ordinati nelle tabelle secondo l'ordine decrescente del peso medio unitario del bozzolo.

Gli scarti dei pesi medi unitari dei bozzoli dei lotti trattati, tanto in senso positivo come in senso negativo, rispetto ai controlli, non appaiono molto cospicui; per la razza *Ascoli* un forte numero di lotti diede medie unitarie inferiori a quelle del peggiore dei controlli; pochi lotti diedero medie unitarie comprese fra le medie dei due controlli. Tuttavia, fra i lotti che sensibilmente sorpassarono la media massima del controllo I^o, sta in capo a tutti quello della *lisina*. Ad essa vengono d'appresso tre lotti a cui furono somministrate *valina + leucina + serina* (49 S), *istidina* (61 S), *alanina* (6 S). Dato che gli esperimenti con questi aminoacidi non furono fatti con tutte le modalità seguite per la tirosina, non ci sentiamo di poter trarre una conclusione sicura, pur constatando che alcuni lotti hanno risentito in modo benefico l'azione degli aminoacidi somministrati.

D'altra parte anche per la razza *Majella*, fra i lotti che hanno superato la media massima dei controlli (controllo I^o peso medio unitario gr. 2,758) viene in prima linea quello della *lisina*. Questo duplice risultato non sembra casuale: per quanto le differenze fra controlli e lotti trattati con lisina non siano forti, esse però sono dello stesso ordine di grandezza di quelle segnalate dal DEMIANOWSKY per i trattamenti con triptofano e tirosina. D'altra parte è noto come la lisina si sia dimostrata per i Mammiferi un aminoacido necessario per la crescita. Essa non è stata segna-

lata dall'ABDERHALDEN nell'analisi del baco maturo, mentre è stata trovata in piccolissime quantità nella seta (fibroina e sericina, analisi di ABDERHALDEN).

Il triptofano che a DEMIANOWSKY ha dato sempre buoni risultati agli effetti della supercrescita, somministrato in piccola quantità da noi, non ha dato alcun risultato.

Però i risultati negativi ottenuti con glicocollo da parecchi Autori, oltre che da noi, e i risultati nostri coi trattamenti di leucina, fenilalanina e alanina, ci autorizzano a trarre le seguenti conclusioni:

a) *Glicocollo*. — Anche nei nostri esperimenti la glicocollo non ha dato alcun risultato positivo, e torna qui a proposito rifare per la glicocollo il ragionamento fatto per la tirosina.

I bachi maturi contengono il 0,9% del proprio peso vivo in glicocollo, cioè 1000 bachi ne contengono gr. 36,72.

I 1000 involucri serici contengono gr. 83,14 di glicocollo, quantità che è più del doppio di quella contenuta nel baco maturo.

Le 1000 farfalle infine contengono gr. 10,5 di glicocollo.

Se la glicocollo che l'analisi segnala per il baco maturo, il bozzolo e la farfalla fosse d'origine alimentare, i bachi derivanti da un'oncia di seme dovrebbero consumare 8294 chilogrammi di foglia.

Anche la glicocollo dunque trovasi nel baco maturo e nel bozzolo in quantità superiore a quella introdotta con la foglia; e dall'esame dei calcoli si deve concludere che anche la glicocollo deve essere prodotta in abbondanza dal filugello durante la filatura del bozzolo.

Siccome gli esperimenti di PIGORINI, DEMIANOWSKY e PLATOWA, DEMIANOWSKY, e nostri, dimostrano chiaramente che la somministrazione di glicocollo, in qualsiasi dose al disotto di quella che risulta tossica e in più di quella contenuta nella foglia, non porta alcun giovamento al baco ai fini della crescita, si deve concludere che la glicocollo d'origine alimentare non è necessaria al baco perchè esso è capace di produrla in grande quantità nei suoi organi; il potere di produzione della glicocollo non è probabilmente localizzato in determinati organi del baco, come per il caso della tirosina, ma è verosimilmente comune a tutti gli organi. Il che del resto è ammesso già per gli altri animali (55).

b) *Leucina*. — Per la leucina si possono fare le stesse considerazioni che abbiamo fatto per la tirosina con conclusioni alquanto diverse.

I 1000 bachi di cui sopra introducono circa gr. 100 di leucina con la foglia, e quando sono maturi ne troviamo in essi soltanto gr. 22,87; quindi la leucina d'origine alimentare è largamente sufficiente al bisogno del baco allo stato larvale. La quantità di leucina che i bachi espellono con la seta è di gr. 6,61, quantità che può essere largamente fornita dalla leu-

cina alimentare, e cioè durante la filatura molto probabilmente non si ha produzione di leucina nei seritteri, perchè già vi si era accumulata.

Se durante la ninfosi non vi fosse ulteriore formazione di leucina, dovremmo trovare nella farfalla una quantità di leucina che al massimo può corrispondere alla differenza fra la quantità espulsa con la seta e quella rimasta nel corpo del baco maturo. Il che invece non risulta, perchè 1000 farfalle contengono gr. 25,8 di leucina, e cioè una quantità maggiore di quella che contiene il baco dopo l'espulsione della seta. *Segno evidente che dopo la formazione del bozzolo, i bachi hanno continuato a produrre leucina.*

Bisogna tener presente che le uova deposte dalla farfalla hanno il guscio ricchissimo in leucina, come afferma in Verson (68). Quindi la leucina potrebbe essere prodotta, almeno in parte, dalla parete dei tubi ovarici per la formazione del guscio delle uova.

Cosicchè un'aggiunta di leucina alla foglia durante il periodo larvale, non dovrebbe giovare all'animale, in quanto esso, anche se non è in grado di produrla da sè, ne trova abbondanza nell'alimento naturale.

Dai nostri esperimenti risulta infatti che aggiungendo leucina sola e in piccola quantità alla foglia di gelso, il baco non ne trae alcun giovamento agli effetti della supercrescita.

Invece per la produzione delle uova e per altri fini che per ora non conosciamo, la farfalla evidentemente non trova sufficiente leucina nel corpo e ne deve produrre probabilmente mediante l'attività delle pareti dei tubi ovarici. Per la produzione di leucina quindi non è necessario ammettere, come per la tirosina, che essa sia prodotta dalla attività secretrice speciale dei seritteri, ma è probabile invece che quest'attività si svolga negli organi della riproduzione della femmina.

c) *Fenilalanina.* — La fenilalanina è introdotta in quantità più che sufficiente con la foglia. Con gr. 20.000 di foglia 1000 bachi introducono nella loro vita circa gr. 27 di fenilalanina, e quando sono maturi, prima dell'espulsione della seta, i 1000 bachi ne contengono circa gr. 11,45. L'involucro serico dei 1000 bozzoli contiene gr. 6,61 di fenilalanina e le farfalle corrispondenti ne contengono gr. 8.

La differenza fra fenilalanina presente nel baco maturo e quella della farfalla sommata a quella del bozzolo, non è tale da autorizzarci a concludere che durante la filatura del bozzolo il baco produce fenilalanina.

d) *Alanina.* — È stata sperimentata prima di noi da DEMIANOWSKY nell'alimentazione del baco da seta, con risultati in parte negativi.

Mille bachi introducono circa gr. 110 di alanina d'origine alimentare, e gli stessi 1000 bachi maturi ne contengono gr. 29,3. Nei 1000 invo-

luceri serici ne troviamo gr. 52,60, cioè molto di più di quanta ne possedevano i bachi maturi. Le 1000 farfalle ne contengono gr. 9 circa, e cioè *dallo stadio di baco maturo a quello di farfalla la quantità di alanina è stata raddoppiata per l'attività dei bachi.*

Si può ripetere per l'alanina il ragionamento fatto per gli altri aminoacidi; arrivando alla conclusione che *durante la filatura del bozzolo si forma una notevole quantità di nuova alanina.*

Dai nostri esperimenti risulta che sulla razza *Majella* le somministrazioni di alanina sola o associata con altri aminoacidi in III^a, IV^a e V^a età giovano agli effetti di una supercrescita, la quale rientra nell'ordine di grandezza di quelle ottenute dai ricercatori russi in alcuni dei loro lotti. Invece le somministrazioni di alanina alla razza *Ascoli* hanno dato qualche volta effetti positivi, qualche volta effetti negativi, sempre però staccandosi dal controllo in modo così tenue da doverli ritenere molto dubbi anche se positivi. Cosicchè, in complesso, non è per ora possibile stabilire se effettivamente l'alanina somministrata libera produce cambiamenti nel metabolismo del baco di razza *Ascoli*.

* * *

Il baco durante il periodo in cui si nutre ha un bilancio azotato incomparabilmente più positivo di quello degli animali superiori durante la crescita. Esso introduce in media gr. 20 di foglia, cioè soltanto cinque volte più del proprio peso finale di gr. 4. Tale quantità di foglia contiene gr. 1,27 all'incirca di proteine e di queste il baco ne usufruisce per l'accrescimento all'incirca gr. 0,4. È quindi un animale che usufruisce al massimo le proteine alimentari a scopo sintetico. Non è ammissibile però che gli aminoacidi introdotti vengano usati interamente per le sintesi. Ora tutti i calcoli e le deduzioni suesposte intorno all'utilizzazione degli aminoacidi alimentari e alla loro parziale produzione per attività di organi del baco si basano sul presupposto che queste sostanze siano tutte impiegate nelle sintesi senza essere neppur parzialmente consumate come energetici. Ma se poi si ammette che una parte di esse, come realmente deve essere, sia pur piccola, venga consumata dal baco, ancor più rafforzate ne sarebbero le nostre deduzioni e calcoli, perchè si dovrebbe ammettere che il baco è capace di produrre non solo le quantità di quegli aminoacidi di cui l'analisi dimostra l'incremento, ma anche le quantità destinate a sostituire quelle consumate.

Somministrazione di vitamine

(Tabelle IX e X)

L'effetto delle vitamine sulla supercrescita degli insetti, a prescindere dagli studi sulle colture sterili degli insetti che possono essere condotte per mettere in luce l'indispensabilità di date vitamine sulla crescita e sullo sviluppo, può essere studiato con una certa probabilità di successo con quegli insetti che si adattano ad assumere un alimento sintetico.

Esperimenti di tal genere furono fatti da SWEETMANN M. D. e PALMER L. S. (62) con *Tribolium ferruginem*, usando una razione di base priva di vitamina B, alla quale venivano aggiunte quantità diverse della stessa vitamina.

Mc. CAY C. M. (11) sperimentò invece sulla *Blattella germanica*, arrivando alla conclusione che questo animale è sensibile all'azione della vitamina B (estratto alcoolico) mentre non lo è a quello delle vitamine A e D.

ABDERHALDEN (1) alimentò la *Deilephila euphorbiae* con piante spruzzate con estratto di lievito (vitamina A e B) e ottenne farfalle molto più grandi di quelle del controllo.

KOPEC (42) sperimentò su *Lymantria dispar* che fu nutrita con piante spruzzate di vitamina A e estratto acquoso di germogli di grano. Ottenne pupe più piccole del normale.

Sulla presenza di vitamine nel corpo del Filugello furono compiute recentissime ricerche da L. DE CARO (16), dietro suggerimento del Prof. GUIDO COLOMBO, che accertarono l'esistenza di vitamina A e D nel grasso di farfalle del baco da seta in quantità piccole, ma dosabili.

Per altri insetti (*Dytiscus marginalis*) le ricerche di GROUD e RAKOTO-RATSIMANANYA (27) hanno messo in evidenza la presenza di notevoli quantità di vitamina C negli organi sessuali e nell'intestino.

Negli esperimenti sul baco da seta non è possibile partire da una razione base, cosicchè le vitamine da sperimentare devono essere aggiunte in più di quelle che già naturalmente la foglia contiene, e di cui non si conosce la quantità e la natura. Il che del resto non pregiudica affatto il piano dei nostri esperimenti, che non hanno lo scopo di dimostrare la necessità della presenza di una determinata vitamina nell'alimento, ma di ricercare le sostanze che possono aver determinato nei nostri allevamenti del 1935 la supercrescita dei bachi.

Le vitamine usate sono state la vitamina A e B (complesso), C e D;

inoltre fu sperimentata largamente la lattoflavina o vitamina B₂ della crescita, da sola o associata ad altre sostanze.

Vitamina A. — Ci venne fornita dall'Istituto Biochimico Italiano in fiale di 10 cmc. contenenti 150 u. i. per cmc. sciolte in olio di sesamo.

Venne somministrata per sola via boccale a 100 bachi di razza *Majella*, un pasto per età a partire dalla III^a età, spennellando la foglia con l'olio vitaminato. Oltre al consueto controllo se ne tenne un altro in cui le foglie erano spalmate con l'olio di sesamo senza vitamina, e detto olio veniva somministrato a 100 bachi *Majella* un pasto per età a partire dalla III^a. Il peso medio unitario dei bozzoli del lotto trattato rientra nei limiti segnati dal peso medio unitario dei controlli, così come quello del lotto trattato col solo olio.

Vitamina B (complesso). — Ci fu fornita dall'Istituto Biochimico Italiano in fiale di 1 cmc. contenente ciascuna 6 u. i. di Vitamina B. Venne somministrata per sola via cruenta a 10 bachi di razza *Majella*, avendo i bachi rifiutato di cibarsi della foglia spruzzata con tale vitamina. Si fece una sola iniezione in 5.ª età a 10 bachi e si ottenne un peso unitario medio dei bozzoli che rientra nei limiti segnati dal massimo e minimo dei 6 controlli di *Majella*.

Vitamina C. — Ci fu fornita in soluzione acquosa dall'Istituto Biochimico Italiano in fiale da 1 cmc. contenenti ciascuna 25 u. i. di vitamina C. Venne somministrata per sola via orale, un pasto per età a partire dalla 3^a, a 100 bachi di razza *Majella*. Il peso medio unitario dei bozzoli del lotto trattato ha raggiunto il valore di gr. 2,646, contro 2,368, peso medio unitario del controllo, avendosi così un guadagno di circa il 10% sul peso medio. Il valore di gr. 2,646 supera notevolmente il massimo peso medio unitario presentato da tutti i controlli di *Majella*.

Vitamina D. — Ci venne fornita in soluzione oleosa (olio di arachide) dall'Istituto Biochimico Italiano, in fiale contenenti 30 u. i. per cm.³ di vitamina D. Venne usata per sola via boccale, spalmando la soluzione oleosa sulla foglia, e somministrandola a 100 bachi di razza *Majella*, un pasto per età, a partire dalla 3.ª. Il peso medio unitario dei bozzoli del lotto trattato (gr. 2,406) si scosta pochissimo dal peso medio unitario del controllo (gr. 2,368). Anche per questa vitamina, oltre al solito controllo, si allevò un altro lotto in cui le foglie venivano spalmate dell'olio d'arachide che serviva da solvente della vitamina D. Anche questo lotto diede un peso medio unitario che rientra nei limiti massimo e minimo dei 6 lotti di controllo della razza *Majella* (gr. 2,456).

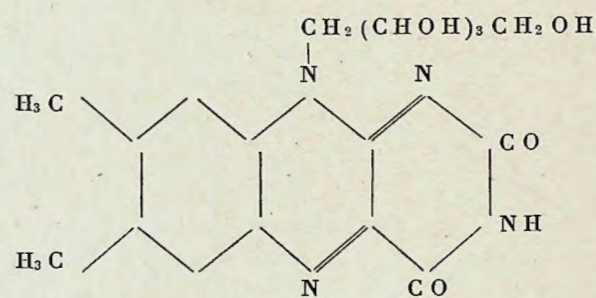
Estratto di lievito. — Venne preparato con lievito di birra compresso che si pose in un piccolo cristallizzatore alto 5 cm. Lo strato del lievito arrivava ad 1/3 dell'altezza delle sponde del cristallizzatore, che venne

posto in un altro grande cristallizzatore a bordo smerigliato, sul cui fondo si versò dell'etere. Si coprì il grande cristallizzatore con una lastra di vetro, mettendo del grasso lungo l'orlo smerigliato. Durante le prime 4-5 ore i lieviti si gonfiarono fortemente; dopo 12 ore erano discesi quasi al livello originario, e si vedeva sul fondo un liquido paglierino. Tolti i piccoli cristallizzatori dal grande, si lasciò evaporare l'etere, poi si travasò l'etere in provette da centrifuga, sottoponendole a centrifugazione a 4500 per 20 minuti. Risultò un liquido giallo chiaro che venne filtrato in candela L 1 e L. 5 sterilmente, ripartendo poi il liquido filtrato sterilmente in tubi sterili. pH. = 6 - 6,1. Questo liquido fu somministrato senza alcuna diluizione a 15 bachi di razza *Majella* per via cruenta, essendosi i bachi rifiutati di mangiare la foglia spruzzata di tale estratto.

Il peso medio unitario del lotto trattato è risultato di gr. 2,458, e cioè rientra nei limiti delle oscillazioni dei 6 controlli di razza *Majella*.

Lattoflavina (Tabella X). — Nell'intento di lavorare con sostanze il più possibile chimicamente pure, dovendo scegliere una vitamina pura, pensammo d'usare la *lattoflavina* o vitamina B₂ d'accrescimento, ottenuta per sintesi del Prof. KARRER, il quale, molto cortesemente, ci fornì un primo quantitativo di tale sostanza, che usammo per gli esperimenti precoci e per alcuni di quelli di maggio; per gli altri si usò la *lattoflavina* fornitaci dalla Ditta ROCHE.

La *lattoflavina* è un 6 - 7 - dimetil - 9 (tetraoxipentil) - isoalloxazina, dalla formula:



La sua efficacia come vitamina sembra dovuta alla sua azione ossido riduttrice. Quando è libera la *lattoflavina* sembra funzionare come accettrice d'idrogeno accanto alle deidrasi; invece, coniugandosi con una proteina, costituirebbe il 2° fermento respiratorio giallo di WARBURG - CHRISTIAN (65).

Allevamenti precoci. — Negli allevamenti precoci il calcolo della quantità di *lattoflavina* da dare ai bachi fu fatto con molta approssimazione, basandoci sui quantitativi di vitamine d'accrescimento che si somministrano ordinariamente negli esperimenti coi Mammiferi. Trattandosi

però, nel nostro caso, d'invertebrati, decidemmo di sperimentare la *lattoflavina* a diverse concentrazioni, e precisamente al 2^o/_{100.000} e al 4^o/_{100.000}. Ciascuna delle due soluzioni venne somministrata con un pasto per ogni età a diversi lotti di bachi di razza *Ascoli*, immergendo nella soluzione di *lattoflavina* le foglie e facendole asciugare poi rapidamente al ventilatore. La soluzione al 2^o/_{100.000} venne anche somministrata ad un altro lotto di razza *Ascoli* tutti i giorni, un pasto al giorno, soltanto per la durata della 4.a e 5.a età.

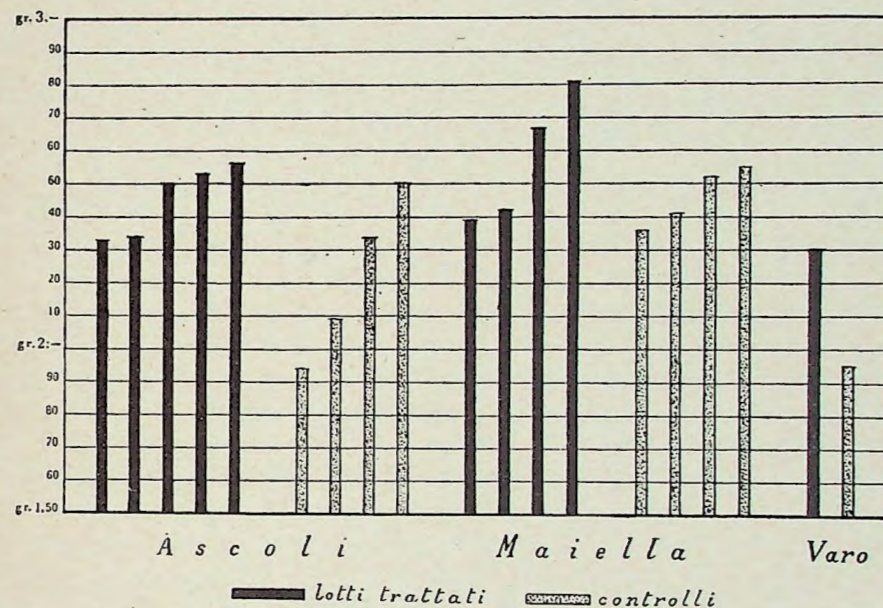


Fig. 4. — Risultati di trattamenti con *lattoflavina* su tre razze gialle indigene.

Da questi primi esperimenti precoci risultava evidente l'azione della *lattoflavina* essendosi ottenuto il massimo aumento del 30% sul peso dei bozzoli del controllo; l'effetto risultava più evidente quando si agiva con somministrazione giornaliera, nelle 2 ultime età del baco.

L'azione favorevole risultò press'a poco uguale o leggermente superiore a quella della tirosina.

Allevamenti di maggio-giugno. — Anche in questo gruppo di esperimenti la *lattoflavina* diede risultati interessanti, e precisamente essa produceva notevoli incrementi nel peso medio unitario dei bozzoli dei lotti trattati per la razza *Varo*, e in un lotto di razza *Majella* trattato per via cruenta in 5.a età; in quest'ultima la media del peso dei bozzoli è

notevolmente superiore alla miglior media del controllo della razza *Majella* (V. Tabella X).

L'esperimento per via cruenta sulla razza *Chinese Bianco*, che ha dato un risultato notevolmente positivo, cioè un peso medio unitario del bozzolo di gr. 1,75 contro gr. 1,45 del suo controllo (lotto 151 B), non è però per noi probativo, perchè un altro controllo della stessa razza, allevato nelle stesse condizioni, dava peso medio unitario di gr. 1,73 (lotto 4 B). È molto probabile che il basso peso del controllo 151 B sia dovuto all'effetto sfavorevole di uno di quei fattori imponderabili, dei quali tuttavia bisogna tener severo conto.

In complesso, la lattoflavina ha dato, per alcuni lotti della razza *Majella*, risultati fortemente superiori alle medie dei migliori controlli; per altri lotti della stessa razza non ha dato differenze apprezzabili rispetto ai controlli (V. diagramma a fig. 4). Per la razza *Varo* ha dato risultato fortemente superiore alla media del controllo. Nella razza *Ascoli* benchè il peso medio unitario dei bozzoli dei lotti trattati non superi notevolmente quello dei migliori controlli, si è verificato però, come si rileva dal diagramma (fig. 4), un'uniformità delle medie dei pesi molto maggiore che nei lotti di controllo.

L'effetto della lattoflavina è innegabile nel suo complesso; esso però non è costante neppure per la stessa razza; e cioè, per la lattoflavina si deve fare la stessa osservazione che si è fatta per i trattamenti con tirosina: la lattoflavina sola non sempre è efficace, il che lascia supporre che essa deve essere accompagnata da qualche altro fattore complementare, che ne rende più efficace l'azione.

Somministrazione di peptone di seta

L'uso del peptone di seta ci fu suggerito dal dubbio che la supercrescita dei bachi di razza *Ascoli* ottenuta nei nostri esperimenti del 1935, fosse dovuta all'alto contenuto della seta in aminoacidi, quando essa è già accumulata in notevole quantità nei seritteri alla 4.a età; si poteva pensare cioè ad un'azione trofica di queste sostanze, ossia ad un semplice fenomeno di supernutrizione azotata.

Il peptone di seta usato è stato fornito dalla Ditta ROCHE, secondo la quale esso ha la seguente composizione:

Acqua	1,94%
Ceneri	1,80%
Azoto totale	17,18%
Azoto formolo	3,15%

L'azoto formolo rappresenterebbe l'azoto aminico.

Usammo il peptone di seta per via orale e per via cruenta. Per via orale fu sperimentato negli allevamenti di Senago sulle razze *Ascoli* e *Majella* ma di questi esperimenti non possiamo tener conto inquantochè i bachi hanno rifiutato la foglia cosparsa della soluzione di peptone.

I risultati dell'iniezione di peptone di seta, in 5.a età, su razza *Majella* sono:

Trattamento	N. bachi inizio esperimento	N. bozzoli ottenuti	Peso unitario di 1 bozzolo gr.	Peso di 1 involucro serico gr.	% ricchezza in seta	% variazione rispetto al controllo
iniettato peptone di seta al 2 ^o / ₁₀₀	12	10	2.222	0.372	16.74	— 7%
Controllo	50	38	2.394	0.343	14.53	—

Per gli esperimenti per via cruenta si usarono bachi in 5.a età di razza *Majella*, allevati a Bernareggio e che si trasportarono al momento dell'iniezione a Milano. Il peptone venne usato in soluzione al 2^o/₁₀₀, e iniettato con micropipette a bachi appena usciti dalla 4.a muta in quantità che era impossibile misurare esattamente, ma che era certamente dell'ordine di qualche centomillesimo (a un dipresso 3-5 m.m.³ di soluzione).

Non si sterilizzò la soluzione, che però fu usata subito dopo la sua preparazione, che si faceva in palloni di vetro neutro sterilizzati.

Come risulta dalla tabella suesposta, l'esito dell'esperimento è stato negativo. Tuttavia bisogna tener conto del fatto che la soluzione di peptone di seta introdotta nell'emolinfa del baco aveva un pH di 4,9. Benchè, per considerazioni generali che esporremo più innanzi, noi si sia giunti alla conclusione che il sangue di baco da seta, alla stessa guisa di quello dei Vertebrati, abbia un potere tampone notevole, non possiamo escludere che il basso valore del pH della soluzione del peptone di seta abbia potuto influire sul risultato dell'esperimento.

Abbinamenti di lattoflavina con un'altra sostanza

(Tabelle XI e XII)

Veniva naturale di pensare che se il baco era sensibile all'azione di una speciale sostanza trofica o eccitatrice d'accrescimento, questa sostanza alla sua volta potesse subire l'influenza di una vitamina d'accre-

scimento, in modo che l'abbinamento della prima sostanza con la vitamina avrebbe dovuto dare esito positivo agli effetti della supercrescita. Quest'idea ci guidò nel disporre le esperienze seguenti:

Lattoflavina + tirosina

a) *Allevamenti precoci.* — Si usò lattoflavina al 2 ‰, e tirosina al 5 ‰, somministrando le sostanze ad un pasto per ogni età. Si usò anche lattoflavina al 4 ‰ e tirosina all'1 ‰.

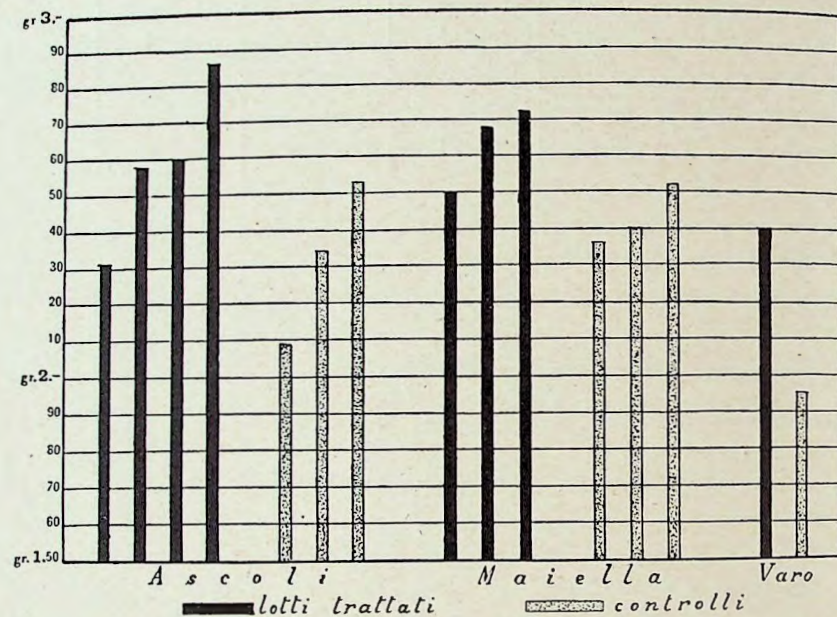


Fig. 5. — Confronto dei risultati dei trattamenti con lattoflavina + tirosina su 3 razze gialle indigene con quelle dei rispettivi controlli.

Si bagnava la foglia entro la miscela di lattoflavina + tirosina, che si preparava al momento, e si faceva rapidamente asciugare la foglia al ventilatore, somministrandola subito ai bachi. Il peso medio unitario massimo è stato raggiunto dal lotto 6 M trattato con lattoflavina al 2 ‰ e tirosina al 5 ‰, con gr. 2,58, peso che supera del 23% il peso medio unitario del controllo.

A un dipresso, i risultati ottenuti, sono gli stessi di quelli ottenuti col trattamento mediante sola tirosina o con sola lattoflavina, ed erano tali da incoraggiarci a sperimentare le due sostanze abbinate su più vasta scala.

b) *Allevamenti di maggio-giugno.* — Non bisogna dimenticare che nell'alimento normale del baco da seta sono presenti tanto la tirosina, sia pure in piccolissima quantità, come le vitamine d'accrescimento.

Tuttavia, mentre l'analisi del KATAYAMA segnala per la foglia di gelso presenza in essa di una quantità di tirosina che è molto inferiore alla quantità di questa sostanza che l'analisi chimica segnala presente nel baco maturo, nulla è possibile dire sulla quantità di vitamine d'accrescimento presenti nella foglia di gelso e nel baco stesso. Cosicché i nostri esperimenti dovevano per forza di cose prescindere dalla quantità di vitamine d'accrescimento che il baco introduce con la foglia o che contiene nel suo corpo.

Esaminando la tabella che riporta i risultati dei trattamenti per os e per via cruenta con lattoflavina + tirosina, si vede che tanto i lotti trattati per via orale che per via cruenta danno pesi unitari medi dei bozzoli che superano sempre i pesi unitari medi dati dai rispettivi controlli.

Nella tabella XII si confrontano fra di loro i risultati dei trattamenti fatti parallelamente con tirosina, lattoflavina + tirosina, lattoflavina, e tali risultati si confrontano altresì coi massimi e minimi pesi ottenuti da tutti i controlli disponibili per ogni razza e allevati a un dipresso nelle stesse condizioni.

Da questa tabella risulta che col solo trattamento con tirosina si hanno quattro casi in cui i risultati rientrano fra i limiti dei controlli; due casi sono superiori al migliore dei controlli, tre casi sono notevolmente superiori al migliore dei controlli. Per la lattoflavina invece un caso è inferiore al minimo dei controlli, due casi sono compresi fra i limiti segnati dal peggiore e dal migliore dei controlli, tre casi sono di poco inferiori alla media del controllo migliore, tre casi sono notevolmente superiori a tale media.

Invece col trattamento lattoflavina + tirosina, si hanno 6 casi in cui le medie dei lotti trattati superano notevolmente la media del controllo migliore, un caso alquanto superiore alla media del controllo migliore, due casi compresi fra le medie (massima e minima) dei controlli, come appare anche dal diagramma di fig. 5. In tale diagramma, sotto la denominazione di razza Ascoli sono riportati lotti di tre diverse stirpi di bachi: una di queste stirpi era la medesima che con somministrazioni di estratti larvali per via cruenta non aveva dato nessun risultato, mentre lo ha dato positivo con lattoflavina + tirosina.

Dalla tabella XI e dal diagramma di fig. 6 si rileva che le razze *Chinese Bianco* e *Bianco Novi* sono sensibili all'azione delle due sostanze abbinate, mentre di fronte all'azione delle sostanze isolate o sono insensibili o addirittura danno esito negativo con pesi inferiori ai controlli (lattoflavina).

È pertanto evidente che anche le razze o le stirpi che non reagiscono ai trattamenti con altre sostanze, reagiscono invece — sia pur moderatamente — al trattamento con le due sostanze abbinate.

Anche per i trattamenti con lattoflavina + tirosina le somministrazioni nelle ultime due età o all'ultima età risultano più efficaci di quelle fatte nelle età giovanili.

Lattoflavina + peptone di seta

Sempre attenendoci alla nostra ipotesi di partenza, che all'azione di sostanze trofiche si sia aggiunta nei nostri allevamenti del 1935 l'azione di fattori di accrescimento di natura vitaminica od ormonica, abbiamo pensato di abbinare la lattoflavina col peptone di seta. La preparazione delle due sostanze è stata fatta sciogliendo in acqua bidistillata la lattoflavina delle fialette al 4^o/_{100.000} e il peptone di seta al 2^o/₁₀₀, alcalinizzando la soluzione fino a pH = 7,8.

L'effetto dell'iniezione, operata su bachi di razza *Majella* di 5.a età, è rivelato dal peso medio unitario del bozzolo del lotto trattato che ha raggiunto gr. 2,96, massimo peso medio unitario che si sia ottenuto quest'anno coi diversi trattamenti per detta razza.

Tuttavia i bozzoli non si presentano affatto belli, e in verità la loro ricchezza in seta è notevolmente inferiore a quella del lotto trattato con solo peptone di seta. Quindi, se per l'accrescimento totale del baco si è avuto un vantaggio notevole, si è perduto nella produzione della seta.

Ma mentre il guadagno nel peso totale è così forte da non lasciar dubbio sull'effetto delle sostanze usate, tale dubbio si affaccia però per la bassa percentuale in seta e ci costringe a non considerare definitivi i risultati ottenuti.

In complesso però sta di fatto che somministrando per via cruenta la lattoflavina col peptone di seta all'ultima età a bachi di razza *Majella*, si produce un cambiamento notevole nel metabolismo dell'animale, che si manifesta con un forte aumento in peso.

I risultati di detto trattamento sono i seguenti:

Trattamento	N. bachi inizio allevamento	N. bozzoli ottenuti	Peso unitario di 1 bozzolo gr.	Peso di 1 involucro/serico gr.	% ricchezza in seta	N. bozzoli per 1 Kg.	% aumento rispetto al controllo
1 iniezione lattoflavina 4 ^o / _{100.000} + peptone di seta 2 ^o / ₁₀₀	12	10	2.96	0.38	12.83	338	+ 23 %
Controllo	50	36	2.394	0.343	14.53	417	—

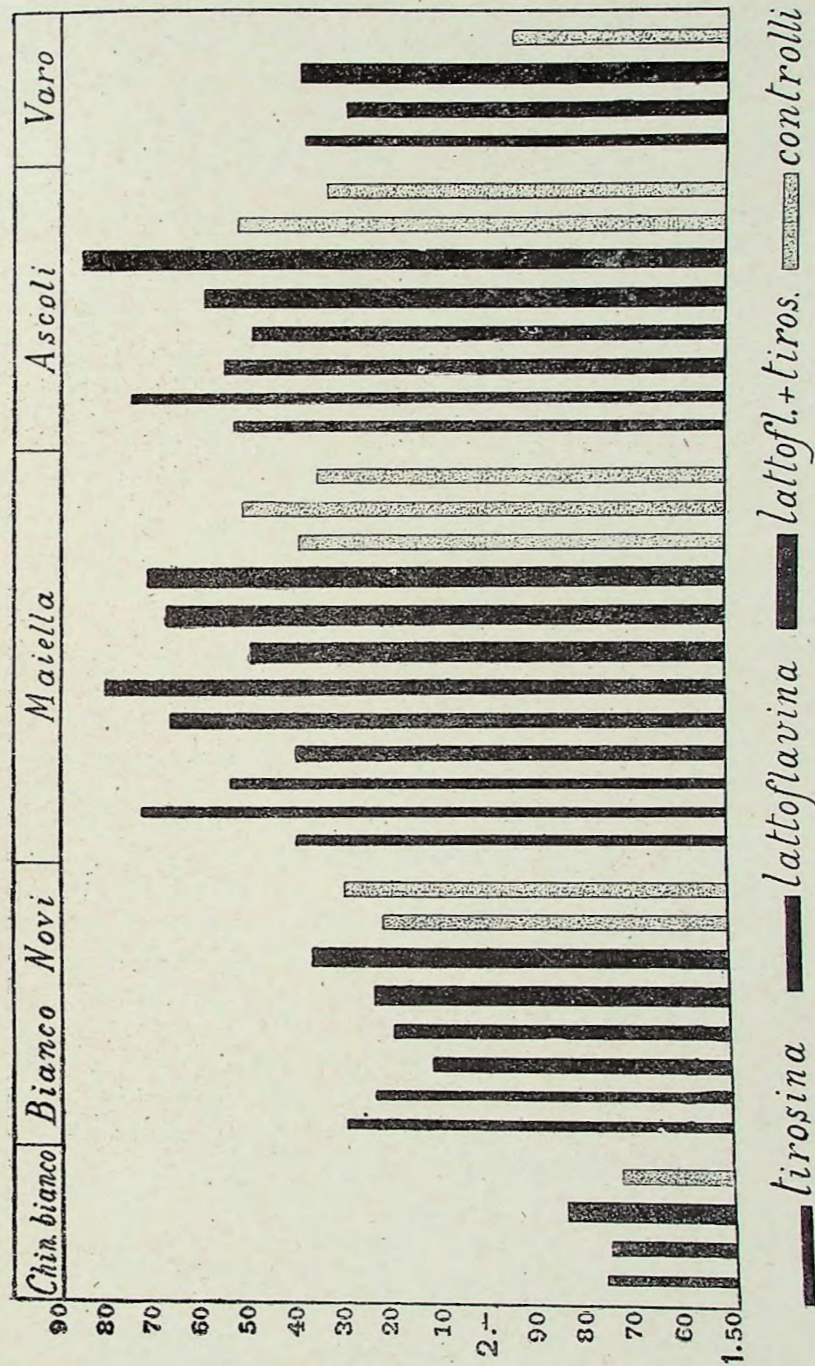


Fig. 6. — Confronto dei risultati ottenuti su 5 diverse razze con trattamenti con Lattoflavina + Tirosina e con le due sostanze separate. Ogni striscia verticale simboleggia un lotto ed esprime, sull'asse delle ordinate, il peso medio dei bozzoli in esso ottenuti.

Somministrazione di ormoni

(Tabelle XIII e XIV)

Sull'attività endocrina degli invertebrati le ricerche sono ancora all'inizio e i risultati sono finora quanto mai incerti e discutibili. Che un'attività endocrina debba esistere negli Insetti è facilmente ammissibile, data la presenza in essa di ghiandole a secrezione interna (*enociti*, *corpora allata*, *corpi faringei*, ecc). Per converso non è facile dimostrare l'esistenza negli Insetti di principi attivi specifici, paragonabili agli ormoni dei Vertebrati.

In quanto all'effetto che gli ormoni dei Vertebrati possono avere sugli Invertebrati, le opinioni sono controverse; tuttavia predomina quella che nega agli ormoni dei Vertebrati un'azione specifica sugli Invertebrati.

Noi abbiamo voluto, se non altro per controllo dei nostri esperimenti, sperimentare alcuni ormoni dei Vertebrati sul baco da seta, agguinandoli alla foglia o iniettandoli nell'emolinfa, alla stessa guisa delle altre sostanze.

L'ormone che più ha attirato la nostra attenzione, è stata la tirossina; il suo interesse era aumentato per noi per la sua derivazione dalla tirosina, ormai ammessa dalla maggior parte dei biochimici.

Tirossina (Tabella XIII) — È oggi ammesso da alcuni studiosi (65) che la tirossina, ormone tipico dei Vertebrati, manifesti la sua influenza anche su Invertebrati. Però parecchi Autori ebbero risultati negativi.

La tirossina pura fu usata dal ROMEIS (54) per sperimentare se essa avesse qualche azione sul metabolismo ninfale. Egli iniettò sterilmente la tirossina nelle pupe di *Papilio podalirius*, e giunse alla conclusione che tale sostanza non influisce sulla metamorfosi, pur avendo notato che qualche pupa in seguito al trattamento dimostrava un'intensificazione del metabolismo.

KÖLLER (40) ha studiato l'influenza della tirossina pura somministrata alla *Drosophila melanogaster*, ed è giunto alla conclusione che essa non ha azione sulla metamorfosi, sulla fecondità, sulla proporzione dei sessi, sulle dimensioni dell'animale nè sul *crossing over*. L'Autore ha notato un piccolo ritardo nella deposizione delle uova, che egli ha attribuito all'azione secondaria di un pH più elevato.

È noto come la tirossina pura abbia ancora azione all'enorme diluizione di 2.10.⁻¹⁰.

La *tirossina sintetica* è ottenuta, secondo il procedimento di HARRINGTON e BARGER, dal cloridrato di anilina, e fu sintetizzata per la pri-

ma volta ad uso industriale nel 1927; quella da noi usata ci fu fornita dalla Ditta ROCHE.

L'azione più nota della tirossina sperimentata sui Vertebrati, quando sia usata in una certa quantità, è quella di accelerare lo sviluppo e i processi catabolici; però, con un cambiamento nell'intensità del trattamento, essa può, anzichè favorire i processi catabolici, eccitare ed aumentare il potere delle sintesi proteiche, cioè i processi anabolici, con conseguente aumento nel peso degli animali trattati rispetto al controllo (58).

È noto anche come la 3-5 *dijodotirossina*, che fornisce il nucleo benzenico portante lo jodio nella molecola della tirossina, sia stata trovata in invertebrati marini (*Gorgonia*, *Spugne*, *Antozoi*), e tale fatto è da alcuni considerato come la prova dell'esistenza di un primo accenno di regolazione ormonica negli Invertebrati (64).

La tirossina sintetica da noi usata era contenuta in fialette di 1 cm.³ e in soluzione sterile. Essa venne usata alla fortissima concentrazione delle fialette, ed anche alle diluizioni di 4⁰/_{100.000}, 2⁰/_{100.000}, 5⁰/_{100.000}. Alla forte concentrazione della fialetta, somministrata per via orale e per via cruenta, il baco ha resistito non soltanto senza manifestare di soffrirne, ma dando per via orale un sensibile aumento del peso corporeo.

Nella tabella XIII rilevasi che il trattamento con tirossina concentrata per via cruenta alla V^a età ha dato un peso medio unitario del bozzolo che rientra nei limiti tra il massimo e il minimo dei controlli della razza *Majella*.

Invece, con tirossina diluita *per os*, l'effetto fu costantemente favorevole tanto colla razza *Ascoli* che colla razza *Majella*. Usando la massima diluizione del 2⁰/_{100.000} si è avuto nei bozzoli un guadagno del 23% sul peso medio unitario del controllo.

Si deve concludere che la tirossina esercita un'azione sulla crescita del baco da seta, ma non avendo sperimentato a forte diluizione per via cruenta, dobbiamo rimandare all'anno venturo le esperienze decisive che stabiliranno a quale diluizione essa agisce con la maggior efficacia.

Timocrescina (Tabella XIV^a). — La timocrescina da noi usata ci venne fornita dalla Ditta CIBA in fialette contenenti una soluzione di timocrescina, della quale 1 cm.³ corrisponde a 10 gr. di ghiandola di timo fresca. Ci venne anche fornita, dalla stessa Ditta, la timocrescina sostanza secca, della quale 1 gr. corrisponde a 405 gr. di ghiandola fresca. Sciogliemmo gr. 0,1 di tale sostanza in 4.05 cm.³ di acqua bidistillata per ottenere una soluzione uguale a quella delle fiale.

Il peso medio unitario dei lotti trattati per via orale oscilla intorno a quello dei controlli, tanto da dover concludere che, nel modo con cui abbiamo sperimentato, la timocrescina non agisce sulla crescita del baco

da seta. L'esperimento per via cruenta ha dato un peso medio unitario inferiore a quello del controllo. Fu anche somministrata timocrescina + lattoflavina per via boccale, ma senza alcun risultato.

Deidrofollicolina (Tabella XIV). — Ci venne fornita dall'Istituto Sieroterapico Milanese. Due milligrammi di tale sostanza furono sciolti in circa 5 cm.³ d'etere. Alla soluzione si sono aggiunti 50 cm.³ di olio d'oliva e il tutto fu posto in una bevuta in stufetta per eliminare tutto l'etere. Si prelevarono 10 cm.³ della soluzione diluendoli con 95 cm.³ di olio d'oliva. Il liquido fu somministrato con un pasto per ciascuna età, per via orale, a 100 bachi di razza *Majella*, spennellandone la foglia.

Il peso medio unitario del bozzolo risultò di gr. 2,45 contro gr. 2,36 del controllo. La piccola differenza rientra nei limiti di oscillazione dei controlli di questa razza. La ricchezza in seta rimase uguale a quella del controllo.

Deidroandrosterone (Tabella XIV). — Fornito esso pure dall'Istituto Sieroterapico Milanese, si preparò in soluzione oleosa con le stesse modalità con cui si preparò la deidrofollicolina. Fu somministrato, per via orale, a 100 bachi di razza *Majella*, un pasto per età.

Il peso medio unitario dei bozzoli del lotto trattato fu di gr. 2,30, cioè inferiore a quello del controllo (gr. 2,36). Ricchezza in seta quasi uguale a quello del controllo.

Androstendiolo (Tabella XIV). — Fornito dall'Istituto Sieroterapico Milanese e preparato in soluzione oleosa come i due precedenti ormoni. Somministrato, per via orale, a 100 bachi di razza *Majella*, un pasto per età. Peso medio unitario del lotto trattato inferiore a quello del controllo.

Quindi degli ormoni usati ha dato sicuri risultati, nelle condizioni in cui abbiamo sperimentato, soltanto la tirossina. Sfortunatamente essa non è stata usata da noi per via cruenta in quella diluizione in cui essa è probabilmente efficace anche per questa via.

Trasfusioni di sangue

(Tabelle XV e XVII)

Abbiamo operato trasfusioni di sangue da razza a razza, usando razze gialle e bianche e predisponendo per le seguenti trasfusioni:

- 1°) da razza a sangue bianco a razza a sangue giallo;
- 2°) da razza a sangue giallo a razza a sangue bianco;
- 3°) da razza a sangue bianco a razza a sangue bianco;
- 4°) da razza a sangue giallo a razza a sangue giallo.

L'ultimo tipo di trasfusione non si potè effettuare perchè al momento adatto ci mancò il materiale necessario.

La trasfusione di sangue da razza *Awoijku* a razza *Ascoli*, pur essendo stata effettuata ed avendo dato anche un buon risultato, non può essere tenuta in considerazione, perchè il controllo ha sofferto evidentemente qualche fattore sfavorevole dando un peso medio unitario eccessivamente basso in confronto a quello degli altri controlli.

Trasfusioni da razza a sangue bianco a razza a sangue giallo. — Come fonte di sangue bianco si sono scelte le razze *Awoijku* e *Bianco Novi* e la razza gialla sottoposta all'esperimento è stata la *Chinese Oro*. Le trasfusioni furono eseguite in IV^a età con micropipette in vetro neutro sterili. Il sangue veniva aspirato dalla razza fornitrice di sangue e immediatamente inoculato nella razza soggetto. Gli individui fonte di sangue, che in seguito all'operazione rimanevano flosci e dissanguati, vennero allevati ulteriormente per studiare gli eventuali effetti che il dissanguamento poteva loro portare.

Da questo primo gruppo di esperimenti è risultato che la razza *Chinese Oro* non ha tratto alcun vantaggio, agli effetti della supercrescita, dalle trasfusioni di razza *Awoijku* e *Bianco Novi*. Ricordiamo che anche negli esperimenti del 1935 la razza *Chinese Oro* non aveva in alcun modo risentito effetto utile per la crescita dalle iniezioni di estratti di bachi.

Trasfusioni da razza a sangue giallo a razza a sangue bianco. — Come fonte di sangue abbiamo usato bachi di razza *Ascoli* e *Chinese Oro* in IV^a età, e il sangue venne trasfuso a bachi di razza *Awoijku* e *Bianco Novi* in IV^a età. (V. Tabella XV).

Mentre la razza *Bianco Novi* si dimostrò insensibile al trattamento con sangue di *Chinese Oro*, la razza *Awoijku* con sangue di *Ascoli* dava un peso medio unitario del bozzolo di poco inferiore al controllo, mentre con sangue di *Chinese Oro* oltrepassava in modo sensibile il controllo, con un aumento del 15%. Ricchezza in seta normale, ma un po' inferiore al controllo.

Trasfusioni da razza a sangue bianco a razza a sangue bianco. — Eseguimmo trasfusioni di sangue da razza *Awoijku* a razza *Bianco Novi* e viceversa. Mentre la razza *Bianco Novi* diede un peso medio unitario dei bozzoli del lotto trattato quasi uguale a quello del controllo, la razza *Awoijku*, che aveva subito la trasfusione di sangue di razza *Bianco Novi*, diede un peso unitario medio del lotto trattato di gr. 1,65, superiore del 25% al peso medio unitario del controllo (gr. 1,31). La ricchezza in seta rimase normale, ma un po' inferiore al controllo.

In complesso, delle tre razze che hanno subito la trasfusione del sangue, due si sono dimostrate insensibili ad essa, e precisamente la *Bian-*

co Novi e la *Chinese Oro*, mentre la razza *Awoijku* si è dimostrata sensibile alle trasfusioni di sangue di *Chinese Oro* e di *Bianco Novi* e insensibile alla trasfusione del sangue di razza *Ascoli*. I risultati raggruppati per razza soggetto dell'esperimento, sono riuniti nelle tabelle XVI e XVII.

È da notare il fatto che le razze meno sensibili agli effetti della supercrescita, come il *Chinese Oro* e il *Bianco Novi*, siano proprio quelle che, con la loro emolinfa, hanno indotto effetti notevoli nell'aumento in peso di un'altra razza.

Dissanguamento

(Tabella XVIII)

Come si è accennato, i bachi dissanguati perchè fornirono sangue, vennero raccolti e mantenuti distinti in lotti per razza e allevati in modo uguale ai controlli e ai lotti trattati.

I dissanguati della razza *Bianco Novi* diedero un peso unitario del bozzolo di gr. 2,28, di fronte a gr. 2,29 del controllo, quindi, nonostante il dissanguamento, non si verificò alcun effetto nè dannoso nè utile in questa razza.

I dissanguati della razza *Chinese Oro* diedero un peso medio unitario dei bozzoli di gr. 1,99, contro gr. 1,80 del controllo; sembrerebbe quindi che il dissanguamento abbia portato a questa razza un effetto benefico per l'aumento globale del peso. La ricchezza in seta corrisponde press'a poco a quella del controllo.

I dissanguati della razza *Awoijku* infine raggiunsero un peso medio unitario dei bozzoli di gr. 1,515, superante del 15% il peso unitario medio del controllo (gr. 1,310), denotando d'aver reagito più energicamente delle altre due razze al dissanguamento. Però se in questo caso il peso globale del bozzolo ha guadagnato col dissanguamento, la ricchezza in seta ne ha sofferto; gli involucri serici della razza *Awoijku*, i cui bachi furono dissanguati, appaiono leggeri e miseri, e il loro contenuto in seta scende al 10% di fronte al 13,5% del controllo, e cioè segnano la più bassa ricchezza in seta di tutti i lotti sperimentati.

Da ciò si dovrebbe dedurre che l'aumento in peso col dissanguamento nella razza *Awoijku* è stato accompagnato da un notevole squilibrio nelle funzioni del baco, squilibrio che non è così forte nei lotti della stessa razza *Awoijku* trattata con emolinfa di *Bianco Novi* e *Chinese Oro*.

Somministrazione di estratti vari

(Tabella XXII)

Nell'eventualità che l'effetto di supercrescita avuto nel 1935 potesse essere dovuto a sostanze proteiche inoculate nel sangue, sperimentammo estratti e sieri ricchi di sostanze proteiche.

Estratto di fegato di vitello. — Si sono usati gr. 250 di fegato di vitello finemente tritato, a cui si sono aggiunti gr. 250 d'acqua distillata. Si è fatto bollire a bagnomaria per un'ora. Si è poi filtrato su carta da filtro, mescolando il tutto con terra d'infusori. Il filtrato è stato passato in candela sterile di Chamberlain L. 1, e subito dopo, pure sterilmente, in una candela L. 5; il liquido ottenuto venne ripartito in tubi da saggio sterili in vetro neutro, e poi passati in ghiacciaia fino al momento dell'uso. pH = 6,4 - 6,5.

L'estratto fu somministrato a bachi di razza *Majella* per sola via cruenta, senza diluizione. Non è stato possibile somministrarlo per os, avendo i bachi rifiutato di mangiare la foglia bagnata con questo estratto.

Il peso unitario del lotto trattato (gr. 2,425) sorpassa di poco il peso medio unitario del controllo, ed è di molto inferiore al peso medio del controllo migliore della razza *Majella*.

Siero di cavallo. — Ci venne fornito sterile dall'Istituto Sieroterapico Milanese. pH = 7,3. È stato somministrato, senza alcuna diluizione, a bachi di razza *Majella*, per via cruenta, e i bozzoli segnarono un peso medio unitario di gr. 2,18, alquanto inferiore a quello del controllo (gr. 2,36).

Globuli rossi di cavallo. — I globuli rossi vennero posti in soluzione fisiologica e centrifugati; si eliminò per decantazione la soluzione fisiologica, e si aggiunsero 5 cm.³ d'acqua bidistillata sterile.

Si somministrò questo liquido a bachi di razza *Majella*, per via cruenta; il lotto trattato diede un peso medio unitario del bozzolo di gr. 2,18, alquanto inferiore a quello del controllo (gr. 2,36).

Estratto di foglia di gelso

Si è tritata finemente la foglia di gelso, si è messo il trito in due sacchetti di tela e poi si è spremuto alla pressione di Kg. 250 per cm.² Ne è uscito un liquido nerastro che è stato centrifugato a 4500 giri e poi posto in ghiacciaia fino al momento dell'uso. pH = 6,3. Venne somministrato soltanto per via cruenta a 12 bachi di razza *Majella*; undici di

essi morirono; ne sopravvisse soltanto uno, che tessè un bozzolo del peso di gr. 3,160. La ricchezza in seta è risultata però piuttosto bassa. Per quanto il peso dell'unico bozzolo sia ragguardevole, non crediamo possibile trarre qualche conclusione da questo risultato.

Iniezione di acqua bidistillata

(Tabella XXII)

Le considerazioni che PICORINI trasse dai risultati dei suoi esperimenti del 1915 (51) potevano far pensare che l'eventuale effetto di supercrescita del baco da seta in seguito alle iniezioni di sostanze varie, potesse essere dovuta non tanto alla natura delle sostanze introdotte, quanto all'acqua di soluzione o sospensione con cui le sostanze venivano iniettate.

Per eliminare questo dubbio istituimmo una prova su 16 bachi di razza *Majella*, ai quali si iniettò acqua bidistillata in IV^a età, nella quantità che si usava per l'iniezione delle varie sostanze. Il peso medio unitario del bozzolo di questo lotto risultò di gr. 2,38 mentre il controllo dava un peso medio unitario di gr. 2,394. Il pH dell'acqua bidistillata era = 6,6.

Se ne conclude che l'acqua, somministrata per via cruenta, da sola e una sola volta, non produce alcun effetto nè benefico nè malefico al baco da seta, avendo noi sperimentato su una razza che si dimostra sensibile ad altri trattamenti.

Il comportamento delle varie razze di fronte ai diversi trattamenti

(Tabelle XIX - XXII)

D'importanza fondamentale per la comprensione dei risultati ottenuti, è il considerare tali risultati raggruppati per razza, tanto più che negli esperimenti del 1935 si era notata una forte differenza nel comportamento delle due razze sottoposte a trattamento con gli stessi estratti larvali.

Cinque sono le razze che possiamo comparare fra loro perchè hanno avuto un certo numero di trattamenti simili. Esse sono: *Chinese Bianco*, *Bianco Novi*, *Ascoli*, *Majella*, *Varo*.

Nella tabella XIX si vede che il *Chinese Bianco*, ad eccezione del lotto 133 B, che ha dato un peso medio unitario del bozzolo di gr. 1,45,

negli altri lotti trattati dà pesi che superano tutti quello del lotto di controllo, ma di piccoli valori. Invece il lotto 3 B, trattato con lattoflavina + tirosina, supera il peso medio unitario del controllo in misura tale da far ritenere con sicurezza efficace il trattamento.

È questo il lotto che già dopo la IV^a muta presentava bachi visibilmente molto più sviluppati di quelli del controllo, e che in realtà si dimostrarono — pesati appena usciti dalla 4^a muta — più pesanti di quelli del controllo del 25%. In parte questo guadagno venne poi perduto dai bachi durante la V^a età, ma non va dimenticato che i bachi di questo lotto salirono al bosco con oltre 24 ore di precedenza sul controllo.

Cosicchè la razza *Chinese Bianco* non può considerarsi insensibile ai trattamenti con le varie sostanze agli effetti della supercrescita, ma lo è in misura modesta.

Il *Bianco Novi* dimostra essere anch'essa una razza poco sensibile a qualsiasi trattamento, per ciò che riguarda la supercrescita, avendo dato solo nel lotto 163B, trattato con lattoflavina + tirosina, e nel lotto 6B, trattato con tirosina, un peso medio unitario del bozzolo superiore a quello dei rispettivi controlli.

In qualche caso, per la razza *Bianco Novi*, i trattamenti danno pesi medi unitari inferiori a quello del controllo peggiore (gr. 2,231); tali trattamenti sono quelli con lattoflavina per via cruenta (lotto 160B), con lattoflavina *per os* (lotto 5 B) e trasfusione di sangue di *Chinese Oro* (135 B).

Dal punto di vista biologico la razza *Bianco Novi* sembra possedere un forte potere autoregolatore d'accrescimento, sul quale non incidono in modo sensibile sostanze estranee di qualsiasi natura.

La razza *Ascoli* invece (tabella XXIII) riconferma anche negli esperimenti del 1936 d'essere una razza sensibile ai trattamenti, oltre che con estratti larvali, anche con sostanze varie.

Anche nei trattamenti con vari aminoacidi operato a Senago, la razza *Ascoli* si è dimostrata più sensibile della razza *Majella* (tabelle VII e VIII).

Risulta dalla tabella XXIII che le sostanze più attive nei riguardi di un aumento di peso sono: *tirosina*, *tirossina*, *tirosina + lattoflavina*, *lattoflavina*.

La razza *Majella* è stata sperimentata con un gran numero di sostanze, come risulta dalla tabella XXII. Essa si è dimostrata sensibile ad alcuni trattamenti, raggiungendo in 8 lotti trattati pesi medi unitari del bozzolo notevolmente superiori a quello del controllo migliore. In questi casi si sono dimostrate particolarmente attive le seguenti sostanze, o associazioni di sostanze: *lattoflavina + peptone di seta*, *lattoflavina*, *tirosina*, *lattoflavina + tirosina*, *tirossina*, *Vitamina C*.

La razza *Varo* venne solo sperimentata con *lattoflavina*, *tirosina*, *latoflavina* + *tirosina*. Essa si è dimostrata sensibile a tutti e tre i trattamenti. Però il lotto migliore appare sempre quello trattato con *lattoflavina* + *tirosina* (vedi tabella XX e diagramma di fig. 6).

Da quanto è sopra esposto risulta che non basta la somministrazione di una o più sostanze attive per determinare un effetto di supercrescita, ma che questa è anche legata a fattori e predisposizioni inerenti alla razza.

È noto del resto che vitamine ed ormoni non producono lo stesso effetto perfino su individui diversi della stessa razza; nei bachi da seta tale sensibilità a fattori vitaminici od ormonici sembrerebbe legata a fattori generali di razza, anziché a fattori individuali.

Si potrebbe muovere l'obiezione che tali differenze nel comportamento delle razze possano essere spiegate non con una sensibilità speciale della razza verso sostanze attive, ma con una tendenza alla variazione in volume e peso per minimi cambiamenti di qualsiasi natura, legati all'ambiente. Questa spiegazione però non è soddisfacente perchè la razza *Ascoli*, che indubbiamente si è dimostrata molto sensibile ai trattamenti, è ritenuta una razza poco variabile; con un accurato studio statistico fatto sulla base dei coefficienti di variabilità su sei razze del baco da seta (*Ascoli*, *Francese Bianca*, *Buchan*, *Bagdad*, *Turchèstan*, e una *Chinese*) M. F. SSEREBRENMIKOFF (60), ha stabilito che la razza *Ascoli* è la meno variabile delle sei. Ed anche dagli allevamenti di riproduzione in Italia è noto che la razza *Ascoli* ha fra i suoi pregi quello di una grande uniformità.

La supercrescita ottenuta deve quindi essere attribuita ad una speciale sensibilità verso fattori di crescita di quelle razze che l'hanno presentata.

In conclusione, le razze gialle indigene *Ascoli*, *Majella* e *Varo* sono molto sensibili alle sostanze dimostrate attive agli effetti della supercrescita. Invece la razza indigena *Bianco Novi* si dimostra poco sensibile alle suddette sostanze.

Effetti delle sostanze sperimentate sull'irrobustimento del baco da seta

(Tabella XIV)

Uno dei risultati ottenuti negli esperimenti del 1935, mediante somministrazioni di estratti larvali, e che accompagnava la supercrescita, era quello di un irrobustimento dei bachi contro le cause di morbidità generale, irrobustimento che si era rivelato con minori perdite dei lotti irrobustiti rispetto a quelle dei controlli.

Essendo grande il numero di lotti a cui dovevamo attendere nel 1936, non è stato sempre possibile seguire la sorte individuale dei bachi che non hanno dato bozzolo e stabilire la causa della loro morte o della loro scomparsa.

Non è neppure possibile confrontare le perdite avute negli esperimenti per via cruenta con quelle avute nei controlli, che non hanno subito alcun trauma, perchè già dall'anno scorso si era visto che qualche perdita, nei lotti per via cruenta, è dovuta al trauma della stessa iniezione. Soprattutto durante la muta che segue l'iniezione (4^a muta) la piccola ferita che va rimarginandosi può ostacolare la muta stessa in modo tale da impedire al baco di compierla.

In generale però dobbiamo notare che le perdite per trauma da iniezione, se impediscono un confronto sicuro fra lotti trattati per via cruenta e controlli normali, non sono state mai rilevanti, anzi in parecchi casi non ve ne furono affatto.

Infine un confronto sicuro sulla percentuale delle perdite dei lotti trattati per via boccale, si può fare soltanto per le sostanze che si sono più ampiamente sperimentate e che si sono rivelate attive agli effetti della supercrescita. Ci limiteremo pertanto ai risultati dati dalla *tirosina*, *lattoflavina*, *lattoflavina* + *tirosina*.

Nello specchio qui annesso abbiamo riportato le grandi medie di tutti i lotti trattati con *tirosina*, *lattoflavina*, *lattoflavina* + *tirosina*, senza distinzione fra razze e località di allevamento.

Trattamento	% dei morti	
	lotti trattati	Controlli
Tirosina	10,44	20,21
Lattoflavina	18,3	23,6
Lattoflavina + Tirosina	10,5	23,6

Dalle cifre di tale specchio il fattore *tirosina* sembra essere quello dominante come fattore di irrobustimento generale. Ma limitando il paragone dei tre diversi trattamenti ai soli casi in cui essi furono usati con le stesse modalità (tabella XXIV), si vede che effettivamente abbinando la *lattoflavina* alla *tirosina*, si ha una diminuzione nelle perdite per morbidità generale in confronto ai trattamenti con *tirosina* sola e *lattoflavina* sola.

Come si vede dalla tabella XXIV, mentre i lotti trattati con sola *lattoflavina* subiscono il 19,64% di perdite, quelli trattati con sola *tirosina* presentano il 15%, e quelli trattati con le due sostanze abbinare presentano una perdita del 10,53%.

Confrontando i risultati si nota che in nessun caso i lotti trattati con *tirosina + lattoflavina* danno un numero di perdite superiore a quello dei controlli, e che anche la razza *Bianco Novi*, che agli effetti della supercrescita non pare molto sensibile neppure all'azione delle due sostanze abbinate, lo è invece in modo notevole agli effetti dell'irrobustimento.

Invece nei trattamenti con sola *tirosina*, se nella grande media essi appaiono in complesso favorevoli, si hanno però tre casi (lotti 2 B, 10 B e 14 B), in cui le perdite dei lotti sono maggiori che nei controlli.

Nei trattamenti con sola *lattoflavina* si hanno quattro casi (lotti 1B, 5B, 9B, 13B) in cui le perdite sono sensibilmente superiori a quelle dei controlli.

È evidente dunque che l'azione esercitata dalle due sostanze abbinate non è soltanto un'esaltazione dei processi anabolici, ma anche, nelle razze in cui la supercrescita è minima, essa è accompagnata da un notevole irrobustimento del baco. Potrà anche verificarsi, in ulteriori esperimenti, che le sostanze risultate sicuramente attive, come *lattoflavina + tirosina*, eccitando il ricambio, spingano il baco a nutrirsi di più; ma potrebbe anche darsi, che, a parità di foglia introdotta, il baco che ha subito l'azione delle sostanze attive, elabori ed utilizzi più intensamente e più profondamente gli alimenti introdotti.

In ogni modo, questi confronti ci permettono di asserire che *lattoflavina + tirosina*, complemento l'una dell'altra, agiscono assieme come regolatori del ricambio nel baco da seta durante il suo rapido accrescimento.

Mentre la supercrescita, per effetto di tali sostanze attive, è evidente solo per alcune razze, l'effetto dell'irrobustimento appare comune a tutte le razze sperimentate, sia pure in grado diverso.

La ricchezza in seta dei lotti trattati

La percentuale in seta dei bozzoli dei lotti trattati fu da noi calcolata per il maggior numero di lotti possibile. Siccome però essi, complessivamente, passavano il numero di 400, non sempre ci fu possibile calcolarla, per mancanza di tempo materiale nei pochissimi giorni della raccolta dei bozzoli.

Nelle tabelle che rendono conto di tutti i trattamenti sono rappresentate le percentuali in seta che abbiamo potuto determinare.

Esse non furono calcolate per i lotti trattati con aminoacidi, eccettuati quelli trattati con *tirosina*.

Le vitamine B, C, D diedero una ricchezza in seta di poco superiore o inferiore al controllo. La vitamina A diede una ricchezza in seta note-

volmente superiore al controllo (16,6% in confronto al 14,53% del controllo).

Degli ormoni la deidrofollicolina, il deidroandrosterone, l'androstendioio hanno dato una ricchezza in seta di poco superiore a quella del controllo.

La *tirosina* somministrata per via orale ha dato una ricchezza in seta superiore o molto vicina a quella del controllo, mentre quando somministrata per via cruenta (in fortissima concentrazione) ha dato una percentuale in seta sensibilmente più bassa di quella del controllo (13,83 per cento contro 14,50 del controllo).

L'iniezione di *timocrescina* in V^a età ha dato una percentuale in seta molto inferiore a quella del controllo (12,72% contro 14,32 del controllo).

Se si considerano i tre trattamenti che hanno dato maggior risultato: *lattoflavina*, *tirosina*, *lattoflavina + tirosina*, agli effetti della supercrescita e dell'irrobustimento, si nota che la ricchezza in seta dei lotti trattati con *lattoflavina* sola oscilla intorno alla ricchezza dei controlli, con una punta massima del 17,84% del *Bianco Novi* e una punta minima dell'11% della razza *Majella* (controllo corrispondente 13,22%).

Anche la *tirosina* sola presenta oscillazioni della ricchezza in seta di circa l'1% al disopra e al disotto di quella del controllo.

Nei trattamenti con *tirosina* sola nessuno dei lotti segna una punta così bassa come quella toccata dalla razza *Majella* trattata con *lattoflavina* sola.

Nei trattamenti con *lattoflavina* e *tirosina* si ha in generale una ricchezza in seta superiore o di poco diversa da quella del controllo, tranne il caso del lotto 161 B, per via cruenta, in cui il guadagno nel peso totale del bozzolo rispetto al controllo non è accompagnato da una corrispondente ricchezza in seta.

Si ha per tale lotto di razza *Majella* una punta minima dell'11% della ricchezza in seta; poichè un consimile risultato si è avuto con l'iniezione di *lattoflavina* sola alla stessa razza *Majella* in V^a età, vi è da pensare che l'effetto sfavorevole sulla produzione della sostanza serica sia in questo caso dovuto alla *lattoflavina*; ma questa azione sfavorevole non viene esercitata quando la somministrazione avvenga *per os*.

Anche negli esperimenti con *lattoflavina + peptone* di seta, eseguiti per via cruenta su razza *Majella*, l'unione delle due sostanze ha dato una supercrescita fortissima complessivamente, ma con una ricchezza in seta del 12,83%, che è alquanto inferiore a quella di 14,53% del controllo.

In complesso, tranne le tre punte minime nella ricchezza in seta raggiunte dai lotti che hanno subito trattamento per via cruenta con *lat-*

toflavina sola o associata a tirosina o a peptone, i lotti trattati con lattoflavina e lattoflavina + tirosina segnano anche le punte massime della ricchezza in seta, raggiunte dalla razza *Bianco Novi* con trattamento giornaliero di lattoflavina + tirosina (17,14% in seta) e con iniezione di lattoflavina sola in V^a età (17,84% in seta).

Non esiste una relazione inversa fra incremento totale in peso del bozzolo per effetto dei trattamenti e diminuzione di percentuale di seta, e cioè in qualche caso l'incremento totale del peso del bozzolo è accompagnato da una percentuale in seta uguale a quella del controllo, talvolta superiore, talvolta inferiore.

Il pH delle sostanze iniettate e il potere tampone dell'emolinfa del baco

Misurammo il pH delle seguenti sostanze somministrate per via cruenta:

Estratto di <i>Kokusan G. 7</i>	pH = 7,4 - 7,7
Tirosina in acqua	pH
Lattoflavina al 4 ‰	pH
Acqua bidistillata	pH
Lattoflavina + tirosina	pH
Lattoflavina + peptone	pH = 7,8
Peptone di seta	pH = 4,8
Estratto di fegato	pH = 6,4 - 6,5
Siero di cavallo	pH = 7,3
Estratto di foglia	pH = 6,3
Estratto di lievito	pH = 6 - 6,1
Vitamina B	pH = 6,2 - 6,3

L'emolinfa dei bachi iniettati aveva un pH intorno a 6,6 - 6,7. Di queste sostanze ha dato esito negativo per la supercrescita il siero di cavallo e il peptone di seta; ha dato effetti tossici l'estratto di foglia di gelso; hanno dato risultati compresi entro i limiti dei controlli l'estratto di lievito puro, l'estratto di fegato di vitello, la vitamina B; hanno dato esiti positivi la lattoflavina + peptone, l'estratto *Kokusan*, la lattoflavina, la tirosina, la lattoflavina + tirosina. *È evidente che supercrescita e pH non hanno, almeno in apparenza, nessuna relazione fra loro. D'altra parte i bachi non hanno denotato di essere danneggiati dalla differenza del pH del liquido introdotto.*

Si conclude che anche l'emolinfa del baco, similmente al sangue dei mammiferi, deve avere un potere tamponante che riporta rapidamente al pH normale l'emolinfa che riceve sostanze a pH anche molto diverso.

I risultati considerati in rapporto alle oscillazioni dei controlli

(Tabelle XXV - XXVII)

Per ogni lotto di bachi sottoposto ad esperimento abbiamo tenuto un lotto di controllo, e precisamente al momento del trattamento si prendeva dallo stesso letto un gruppo di bachi; si divideva di solito a metà; una metà era sottoposta al trattamento, e costituiva un lotto, l'altra serviva da controllo, e si teneva vicino al lotto sperimentato, di cui seguiva le sorti.

Preoccupandoci anche del problema dell'eguaglianza dei pesi di partenza fra i bachi da sottoporre al trattamento e i bachi del controllo, si sono fatte delle pesature, appena usciti i bachi dalla muta precedente il trattamento (di solito la 3^a) e si è visto che la differenza fra i pesi medi di partenza di due lotti ottenuti da uno stesso letto, è sempre molto piccola e si può trascurare.

In pratica poi, nei nostri esperimenti, non si poteva tener conto dei pesi di partenza, perchè durante l'ulteriore allevamento alcuni bachi soccombono; inoltre, nelle somministrazioni per via cruenta qualche volta, riuscendo male l'operazione, si scartava l'individuo operato, sostituendolo con un altro in cui l'operazione era riuscita bene. In quanto a pesature individuali, baco per baco, è inutile pensarci, per evidenti impossibilità materiali ed anche perchè nel grande numero d'individui, il risultato, se c'è e se è ben evidente, acquista molto maggior valore che con la comparazione dei singoli pesi di bachi. Tuttavia il paragone dei controlli di bachi della stessa razza, nati da seme della stessa provenienza, allevati negli stessi locali, curati dalle stesse mani, mostrano negli allevamenti di Bernareggio e di Milano, pur essendo abbastanza alto il numero degli individui formanti un controllo, un'oscillazione assai forte che denota che le condizioni dell'allevamento, per quanto si sia cercato di renderle al massimo grado uniformi, hanno risentito di quei fattori imponderabili, a cui si attribuiscono le notevoli differenze di rendimento di bachi di diversi allevamenti, anche in identico ambiente e appartenenti alla stessa razza.

Era quindi necessario tener conto di queste oscillazioni dei controlli, facendo la media unitaria ponderata di tutti gli individui dei controlli, provenienti dallo stesso letto, e stabilire successivamente, rispetto ad essa, gli scarti dei pesi medi unitari dei singoli controlli e dei lotti trattati. Soltanto in questo modo ci è sembrato possibile giungere a deduzioni sicure, in base alle buone regole in uso nei calcoli statistici. Con tale

criterio rimangono dubbi i risultati che corrispondono a quei trattamenti che hanno dato pesi medi unitari che rientrano esclusivamente nelle oscillazioni dei controlli, mentre si devono ritenere positivi gli effetti di quei trattamenti che spostano l'oscillazione del peso al di là del limite massimo presentato dai controlli e presentanti un minimo che è vicino alla media ponderata dei controlli o superiore ad essa.

Un vero studio statistico non si può fare, poichè, per evidenti ragioni, è impossibile registrare pesi individuali in una popolazione di animali di parecchie migliaia d'individui.

Le tabelle XXV, XXVI e XXVII, che qui seguono, sono state compilate in base alle suesposte considerazioni.

Durata del periodo larvale

Nulla di particolarmente notevole e di spiccato si è osservato nella durata del periodo larvale dei lotti trattati in confronto a quella dei controlli.

L'unica osservazione sicura è che tanto negli allevamenti precoci come in quelli di maggio-giugno, in alcuni lotti i bachi trattati con tirosina + lattoflavina (Senago, Bernareggio) hanno anticipato di un giorno la salita al bosco.

Però il risultato non è stato generale per tutti i lotti trattati.

Conclusioni

Sperimentando complessivamente su circa 28.000 bachi allevati in diverse località di Lombardia e suddivisi in parecchie centinaia di lotti, e operando oltre 800 iniezioni di estratti larvali e sostanze varie ad altrettante larve di razze diverse, siamo giunti alle seguenti conclusioni:

I°) Il baco da seta è sensibile, a parità di tutte le condizioni di allevamento, alla somministrazione di sostanze varie e soprattutto all'azione di estratti larvali di razze diverse, alla trasfusione di emolinfa di bachi di razza diversa, alla lattoflavina somministrata sola o abbinata con altre sostanze, alla tirosina da sola o abbinata con lattoflavina. Tale sensibilità si manifesta di solito con un aumento di peso del baco e del bozzolo.

II°) L'aumento massimo in peso si è avuto nel 1935, trattando razza pura *Ascoli* con estratto di *Kokusai Giappone 7*, appena importato dal Giappone.

III°) Abbinando lattoflavina con tirosina, qualunque sia la razza

trattata, il modo di somministrazione (*per os* o *per via cruenta*) e la località dell'allevamento, si ha sempre un aumento nel peso medio unitario del lotto trattato rispetto al controllo, aumento che è minimo in alcune razze (3%) e va fino ad un massimo del 28% in altre.

IV°) Le razze più sensibili alle due sostanze abbinata sono le gialle indigene *Ascoli*, *Majella*, *Varo*, la più sorda appare la razza *Bianco Novi*.

V°) Anche la somministrazione di sola tirosina e di sola lattoflavina dà buoni risultati, ma non costanti anche per la stessa razza.

VI°) Gli esperimenti con tirosina e con lattoflavina + tirosina dimostrano che la tirosina agisce somministrata in piccolissima quantità. La quantità di tirosina che il baco riceve dalla foglia e dai trattamenti è inferiore di molto alla tirosina che il baco produce, cosicchè, tenendo conto dell'incremento del peso corporeo — nel quale la tirosina appare sempre in forte percentuale — e dell'incremento del bozzolo, si conclude che, somministrando una piccola quantità di tirosina libera al baco, lo stimoliamo a fabbricarne una quantità enormemente superiore a quella che gli viene somministrata, approssimativamente almeno 70 volte di più.

VII°) Comparando la quantità di tirosina introdotta dal baco per mezzo della foglia con quella presente nel baco maturo prima della filatura del bozzolo e con quella che espelle dal seritiero durante la filatura, si giunge alla conclusione che il baco continua a produrre tirosina durante la tessitura del bozzolo, per l'attività dei seritieri. Da quale sostanza i seritieri ricavano la tirosina non è per ora possibile dire. Non si può escludere una sintesi della tirosina da parte del baco, anzichè una semplice derivazione da altri aminoacidi.

VIII°) Le somministrazioni di tirosina in piccola quantità hanno certamente funzione eccitatrice. Si deve quindi ammettere che la tirosina d'origine alimentare (essendo state positive le prove anche per via orale) agisca direttamente o indirettamente su tutti gli organi e su tutte le cellule, delle quali probabilmente essa regola il metabolismo. La produzione di abbondante tirosina da parte dei seritieri in quantità che è circa due volte e mezzo quella introdotta per via alimentare, si deve considerare come una delle funzioni specifiche ghiandolari di questi organi che fabbricano tirosina per la sintesi di una proteina specifica (fibroina) destinata ad una particolare funzione.

IX°) Se si ammette che la tirosina agisca come sostanza ormonica o produttrice di ormoni, e se si considera che essa è contenuta in piccolissima quantità nella foglia, si può pensare che essa sia probabilmente per il baco da seta *uno degli aminoacidi* che regola la quantità di foglia che il baco deve ingerire per il suo fabbisogno proteico durante l'accre-

scimento. I nostri esperimenti infatti dimostrano che aggiungendo piccole quantità di tirosina alla foglia, si ha di solito un incremento corporeo supernormale, e cioè la piccolissima quantità di tirosina presente nella foglia ci pone nelle stesse condizioni di sperimentazione seguite da quegli Autori che, somministrando a vertebrati alimentazione povera di lisina con aggiunta di piccole quantità di lisina libera, hanno potuto stabilire essere la *lisina* un aminoacido d'accrescimento per i Vertebrati.

X^o) La glicocola, introdotta in minima quantità nel baco da seta con foglia di gelso, e con le somministrazioni da noi effettuate, non modifica in nulla il metabolismo del baco da seta. Dai calcoli da noi fatti si deduce invece che il baco ne produce in grande quantità, (8-10 volte la quantità di glicocola introdotta con la foglia) sia prima della filatura del bozzolo come durante la filatura stessa. Accordando l'esito di tutti gli esperimenti e le analisi, si giunge alla conclusione che tutti gli organi del baco devono essere in grado di produrre glicocola; vale a dire che questa produzione non è specifica dei seritteri.

XI^o) Durante la filatura del bozzolo il baco produce grandi quantità di glicocola e notevole quantità di alanina in confronto della quantità di tali aminoacidi che il baco maturo contiene. La leucina invece viene prodotta *ex novo* dopo la filatura del bozzolo. Le nostre somministrazioni di glicocola e leucina non hanno dato effetti di supercrescita; per l'alanina l'effetto è discutibile. La lisina somministrata si è dimostrata efficace rispetto ad una moderata supercrescita in entrambe le razze *Ascoli* e *Majella*, sperimentate.

XII^o) Come deduzione dal fin qui detto bisogna concludere che la fabbricazione della seta rientra nelle funzioni ghiandolari specifiche e rivela nei seritteri un alto potere di trasformazione.

XIII^o) Essendo la lattoflavina una vitamina d'accrescimento, si poteva già *a priori* prevedere che il suo abbinamento con la tirosina (aminoacido d'accrescimento per il baco da seta) avrebbe dovuto dare il massimo dei risultati. L'ipotesi fu infatti verificata. Ora mentre per la tirosina sappiamo che essa è fornita in piccolissima quantità dalla foglia, per la lattoflavina invece non sappiamo in qual misura essa sia fornita dalla foglia. Quindi i nostri risultati non ci permettono di concludere intorno alle relazioni di quantità entro le quali le sostanze abbinate agiscono al massimo grado.

XIV^o) Il trattamento con estratti larvali conferisce a quasi tutti i lotti trattati di razza gialla indigena un irrobustimento che si risolve in una resistenza notevole contro le cause di morbilità generale, compresa la pebrina; non si tratta — almeno per quanto ci risulta finora — di un vero e proprio processo di immunizzazione, sia pure parziale, ma di una elevazione di resistenza dimostrata dal fatto che i lotti trattati con

estratti e poi infettati di pebrina, in generale, danno una percentuale di perdite minore dei loro controlli. Ci proponiamo negli anni venturi di approfondire l'argomento.

XV^o) Tale effetto di aumento di resistenza alla morbilità generale si estende anche a tutti i lotti trattati *per os* con lattoflavina + tirosina, che senza alcuna eccezione, hanno presentato perdite minori dei controlli.

XVI^o) La ricchezza in seta, nei trattamenti con estratti larvali e con tirosina + lattoflavina, rimane pressochè inalterata rispetto ai controlli, e oscilla di ben poco intorno alla media dei valori normali (14%-15%).

XVII^o) Anche la tirosina sintetica agisce sul ricambio del Bombice producendo moderata, ma sensibile crescita supernormale; resta da approfondire quale sia la diluizione ottima, e se anche sia efficace per via *cruenta*.

XVIII^o) Nelle trasfusioni di emolinfa ha dato migliori risultati per la crescita del soggetto l'emolinfa estratta da bachi di razze che sono poco sensibili alle somministrazioni di sostanze utili alla crescita per altre razze.

XIX^o) Il fatto che con il dissanguamento il baco da seta riceva verosimilmente una notevole attivazione del ricambio, la quale si traduce in moderata ma sensibile supercrescita, si può pensare debba determinarsi come una vivace reazione dell'organismo del baco, la quale lo spingerebbe a mangiare di più rendendolo capace di elaborare più intensamente le sostanze alimentari.

XX^o) Benchè non si siano fatte pesature della foglia, somministrata ai nostri lotti trattati, si può però fin d'ora asserire che se anche i bachi mangiano un poco di più per effetto delle sostanze attive, si tratta sempre di aumenti di consumo tanto piccoli che rientrano largamente nelle oscillazioni della quantità di foglia che l'allevatore distribuisce normalmente ad ogni unità allevata (oncia di seme), oscillazioni che, come è noto, vanno — a seconda dell'abilità dell'allevatore e di molte condizioni di razza e di ambiente — da 10 a 12 quintali di foglia per oncia.

BIBLIOGRAFIA

1. - ABDERHALDEN E. — *Weitere Studien über die von einzelnen organen hervorgebrachten substanzen mit spezifischen Wirkung* - Arch. ges. Physiol., Bd. 176, 1919.
2. - ABDERHALDEN E. — *Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung des Seidenfibroins und seiner Struktur* - Zeits. für Physiol. Chemie, Berlin, 1922.
3. - ABDERHALDEN E. — *Studien über das Wachstum von Raupen* - Zeits. Phys. Chemie, Berlin, 1923.
4. - ABDERHALDEN E. und BROCKMANN H. — *Studien über die Struktur des Seidenfibroins* - Bioch. Zeitsch., 1929.
5. - ABDERHALDEN E. und DEAN H. K. — *Studien über die Bildung der Seide* - Zeitsch. Phys. Chemie, Strassburg, 1909.
6. - ABDERHALDEN E. und MAHN H. — *Studien über die Struktur der Seidenfibroins* - Zeit. Phys. Chemie, 1928.
7. - ABDERHALDEN E. und WEICHARDT W. — *Die Monoaminosäuren des Körpers des Seidenspinners* - Zeit. Phys. Chemie, Strassburg, 1909.
8. - ABDERHALDEN E. und WORMS — *Die Monoaminosäuren der Leim der Canton Seide* - Zeit. Phys. Chemie, 1909.
9. - ABDERHALDEN E. und ZUMSTEIN O. — *Ueber den Gehalt von Leim aus seide von Bombyx mori* - Zeit. Phys. Chemie, 1932.
10. - BERLESE A. — *Osservazioni su fenomeni che avvengono durante la ninfosi negli insetti metabolici* - Rivista di Patologia Vegetale, P. II, Vol. IX, 1900.
11. - CAY (Mc) C. M. — *An insect test for vitamin B fractions* - Journ. of Biol. Chemistry, Baltimora, 1933.
12. - CALUGAREANU D. — *Eine funktionelle Eigentümlichkeit des Spinndrüse der Seidenspinners (B. mori)* - Zeit. wiss. Biol., Abt. C., 1930.
13. - COLOMBO G. — *Su alcune modificazioni indotte nei caratteri fisici e chimici della seta dall'inanizione della larva* - Boll. R. Staz. Sperim. Seta, Milano, 1932.
14. - COTRONEI G. — *Osservazioni sull'influenza della tiroide sullo sviluppo degli insetti* - Rend. Accademia Lincei, Classe Scienze fisiche e matematiche, Roma, 1918.
15. - COTRONEI G. — *Ulteriori osservazioni sull'influenza della tiroide sullo sviluppo degli insetti* - Rend. Accademia Lincei, Classe Scienze Matematiche e Fisiche, Roma, 1923.
16. - DE CARO L. — *Sul contenuto in vitamine A e D del grasso di farfalle del baco da seta* - Boll. R. Staz. Sper. Seta, Milano, 1936.
17. - DE LERMA B. — *L'attività endocrina degli invertebrati* - Attualità Zoologiche, Archivio Zoologico Italiano, Anno XIV, 1936.
18. - DEMIANOWSKY S. — *Fütterungsversuche von Seidenraupen mit einigen Aminosäuren* - Staz. Centrale per la Sericoltura e la Bachic., Mosca, 1930.

19. - DEMIANOWSKY S. e PLATOWA A. D. — *Der Einfluss der Aminosäuren auf die Entwicklung der Seidenraupen und auf die Qualität des cocons und der Seide* - Staz. Centrale per la Sericoltura e la Bachic., Mosca, 1927.
20. - FILDES P. and RICHARDSON G. M. — *The Amino-Acids necessary for the growth of Cl. sporogenes* - Brit. Journ. of Experim. Pathology, Vol. XVI, 1935.
21. - FISCHER E. — *Ueber Spinnseide* - Zeit. Phys. Chemie, 1907.
22. - FISCHER E. und ABDERHALDEN E. — *Bildung eines dipeptides bei der Hydrolyse der Seidenfibroin* - Ber. der deut. Ch. Gesell., 1906.
23. - FISCHER E. und ABDERHALDEN E. — *Bildung von dipeptiden bei der Hydrolyse der Protein* - Ber. der Deut. Chem. Gesell., 1907.
24. - FISCHER E. e SKITA A. — *Ueber das Fibroin der Seide* - Zeit. Phys. Chemie, 1901.
25. - FISCHER E. e SKITA A. — *Ueber das Fibroin und Leim der Seide* - Zeit. Phys. Chemie, 1902.
26. - GIANFERRARI L. — *Sull'influenza degli ormoni dei Vertebrati sugli Invertebrati* - Atti Soc. It. Sc. Nat., Milano, 1926.
27. - GIROUD A. e RAKOTO - RATSIMAMANGA A. — *Distribution de la Vitamine C chez les Invertébrés* - Bulletin de la Société de Chemie biol., 1936.
28. - GRANDORI R. e L. — *Effetti di estratti larvali sulla crescita dei bachi da seta* - La Ricerca Scientifica, Vol. II, 1936.
29. - GRANDORI R. e L. — *Effetti di estratti larvali sulla crescita delle larve del Filugello e sul loro prodotto in seta* - Laboratorio Zoologia Agraria e Bachicoltura, Milano, 1936.
30. - GRANDORI R. e L., PROVASOLI L., GIORGI D. — *Effetti di estratti larvali e di altre sostanze sulla crescita delle larve del Filugello* - La Ricerca Scientifica, Vol. II, n. 9-10, 1936.
31. - GRANDORI R. — *Esperimenti sulla propagazione della pebrina attraverso il pulviscolo atmosferico* - Questo Bollettino, vol. VII, 1936.
32. - HELLER J. — *Sur la transformation des matières albuminoïdes pendant la métamorphose des Lépidoptères Deilephila euphorbiae* - C. R. Soc. Biol., 1924.
33. - JEZEWSKA — *Des changements de la teneur en tryptophane au cours du développement des chrysalides des Mouches* - C. R. Soc. de Biol., 1926.
34. - JUCCI C. — *Immunità negli Insetti* - Annali d'Igiene, Anno 34, 1923.
35. - JUCCI C. — *L'acido urico nel sangue dei bachi da seta* - Boll. Soc. Ital. di Biologia Sperimentale, Milano, 1930.
36. - KARRER P. — *Nouveaux Progrès dans l'étude des Vitamines* - Quinzième Congrès de Chimie Industrielle - Bruxelles, 1935.
37. - KATAYAMA E. — *Untersuchungen über die Stickstoffverbindungen in Maulbeerblättern* - Bull. of the Imper. Seric. Exper. Station Japan, Tokio, 1916 (in tedesco).
38. - KAZANCEV V. — *Esperienze preliminari sull'alimentazione del baco da seta con foglie addizionate da aminoacidi contenuti nella seta* (in russo) - Izvestia Kavkaz. Sheldkorod Sta., 1912.
39. - KEILIN M. D. — *Le mécanisme de la respiration intracellulaire* - Bull. de la Soc. de chimie biologique, 1936.
40. - KÖLLER P. CH. — *Der Einfluss chemisch reinen Thyroxins auf die Entwicklung von Drosophila melanogaster* - Zeit. Wiss. Biol., Abt. D. Arch. Entwicklung. mech. Organ., 1932.

41. - KOPEC' S. — *Is the insects metamorph. influenc. by thyroid-feeding?* - Biol. Bull. Woods Hole, Bd. 5, 1926.
42. - KOPEC' S. — *Ueber die Entwicklung der Insekten unter dem Einfluss der Vitamin-zugabe* - Biol. Gener., Vol. III, 1927.
43. - KUDO R. — *A biologic and taxonomic study of the Microsporidia* - Illinois Biol. Monogr., 1924.
44. - KUDO R. — *Handbook of protozoology* - Baillière, Tindall & Cox - London, 1931.
45. - MARK H. — *Ueber den Aufbau der Hochpolymeren Substanzen* - Scientia, 1932.
46. - MEYER K. H. e MARK H. — *Der Aufbau der Hochpolymeren organischen Naturstoffe* - Akad. Verlagsb., Lipsia, 1930.
47. - MITCHELL H. H. and HAMILTON T. S. — *The biochemistry of the aminoacids* - Chem. Cat. Co, New York, 1929.
48. - NEEDHAM D. M. — *The chemical changes during the metamorphosis of Insects* - Biol. Review, Cambridge, 1929.
49. - PAILLOT A. — *L'infection chez les Insectes* - Paris, 1933.
50. - PICORINI L. — *Prime ricerche comparative sulla composizione chimica della foglia di gelso affetta da Diaspis e di gelso sano* - Annuario R. Staz. Bacol. di Padova, 1915.
51. - PICORINI L. - *Gli aminoacidi e la produzione della seta nelle larve di Bombyx mori* - Annuario R. Staz. Bacol. di Padova, 1915.
52. - PICORINI L. — *Sul meccanismo di formazione e sul significato biologico del bozzolo* - Ann. R. Staz. Bacologica di Padova, 1917.
53. - QUAJAT E. — *Dei bozzoli più pregevoli che preparano i lepidotteri setiferi* - Ed. Drucker, Padova, 1904.
54. - ROMEIS B. e DOBKIEWICZ (v) L. — *Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung von Wierbeltierhormonen auf Wierbellose* - Zeit. Wiss. Biol., Abt. D, 1932.
55. - RONDONI P. — *Biochimica* - U.T.E.T., Torino, 1933.
56. - ROOSE G. — *Vergleichende Untersuchungen über die Zusammensetzung und den Aufbau verschiedenen Seidenarten* - Zeit. Phys. Chemie, 1910.
57. - RUSSO G. — *L'azoto nelle sue varie forme durante lo sviluppo del Bombice del gelso. Contributo alla chimica dello sviluppo.* - Atti Accademia Gioenia, Catania, 1920.
58. - SCOZ G. — *Velocità di accrescimento e infezione TBC nella cavia. - 1°: Azione della tiroxina e della diiodotiroxina* - Fisiologia e Medicina, Roma, 1936.
59. - SILBERMAN A. e HOWARD B. LEWIS — *The thyrosine content of cocoons of various species* - Journ. Biol. Chem., 1932.
60. - SSERREBRENMIKOW M. F. — *Sulla variabilità nel peso dei bruchi del Bombyx mori* - Stazione Sperimentale per la Seric. e la Bachic., Mosca, Vol. II°.
61. - SUWA A. — *Vergleichende Untersuchungen und die Zusammensetzung und die Aufbau verschiedenen Seidenarten. Die Monoamino-säuren aus des cocoons am der japanische Seide « Karuko »* - Zeit. Physiol. Chemie, 1910.
62. - SWEETMAN M. D. e PALMER L. S. — *Insects as test animals in Vitamin research - I - Vitamine requirements of the flour beetle, Tribolium confusum (Duval)* - Journ. Biol. Chem., 1928.

63. - TERAO A. e NAOKI WAKAMORI — *Influence of the feeding of the thyroid gland and the anterior lobe of hypophysis on the second generation of the silk-worm (B. mori)* - Proc. Imp. Acad. Tokio, 1931.
64. - TERROINE F. — *Le métabolisme de l'azote* - Presse Universitaire de France, Paris, 1933.
65. - THOMAS P. — *Manuel de Biochimie* - Masson & C. - Paris, 1936.
66. - TEODORO G. — *Di alcune recenti pubblicazioni di biochimica sul Bombyx mori L.* - Boll. R. Staz. Gelsic. e Bachic. di Ascoli Piceno, Vol. XIV, 1935.
67. - TIRELLI M. — *Le attuali conoscenze fisiologiche sulla olometabolia degli Insetti* - Annuario R. Staz. Sperim. di Padova, Vol. XLVIII, 1936.
68. - VERNON E. — *La composizione chimica dei gusci nelle uova del Filugello* - Boll. mensile di bachicoltura - Padova, 1884.
69. - WADA, SAKISABURO — *Ueber die chemische Zusammensetz. der Puppe des Seiden-spinners* - Acta Scholae Med. Univ. Imp. Kioto, 1931.