

REVUE DU VER A SOIE

(BOMBYX MORI L.)

JOURNAL OF SILKWORM

AVIS

*Toutes les demandes
de renseignements doivent
être adressées :*

à M. SCHENK André,
SECRÉTAIRE GÉNÉRAL-FONDATEUR
DE LA COMMISSION SÉRICICOLE
INTERNATIONALE

STATION I. N. R. A.
28, Quai Boissier de
Sauvages

A L È S - (Gard)

Téléphone : 86.21.94

PARTICIPATION
FINANCIÈRE ANNUELLE
10 Francs Français

NOTICE

*For all information
please apply to :*

Mr. SCHENK André,
GENERAL SECRETARY - FOUNDER OF
THE INTERNATIONAL SERICULTURAL
COMMISSION

I. N. R. A. STATION
28, Quai Boissier de
Sauvages

A L È S - (Gard)

Telephone : 86.21.94

ANNUAL FINANCIAL CONTRIBUTION :
10 French Francs

SOMMAIRE *

- Avant-propos du Secrétariat Général, par M. A. SCHENK (France).
- Introduction
Alimentation Artificielle pour le Ver à Soie, par M. T. YOKOYAMA (Japon).
- Alimentations Artificielles pour l'Élevage des Vers à Soie Domestiques et Sauvages, par M. T. FUKUDA (Japon).
- Contenu Aqueux de l'Alimentation à base de Gélose pour l'Élevage du Ver à Soie Eri, par M. T. FUKUDA (Japon).
- Mécanisme de Nutrition et Alimentation préparée du Ver à Soie Bombyx mori L. par M. Y. HAMAMURA (Japon).
- Rapport complémentaire sur les dérivés de la choline en tant que facteurs de croissance au début du développement du Ver à Soie, par MM. K. HAYASHIYA et J. NISHIDA (Japon).
- Besoins nutritifs et Alimentations Artificielles du Ver à Soie Bombyx mori L., par M. T. ITO (Japon).
- L'acide chlorogénique, facteur de croissance du Ver à Soie, par MM. M. KATO et H. YAMADA (Japon).
- Essais préliminaires à la mise au point d'une alimentation préparée à partir de feuilles de mûrier cuites pour le Ver à Soie Bombyx mori L., par MM. J. M. LEGAY et M. PASCAL (France).
- Premier essai sur le jeûne des Vers à Soie aspergés avec des solutions nutritives au cours du 5^{me} âge ; comparaison entre une race bivoltine (Awojiku) et monovoltine (Hacu), par Mme C. MANUNTA (Italie).

CONTENT *

- Foreword of the General Secretariat by Mr. A. SCHENK (France).
- Introduction
Artificial Diet for Silkworm, by Mr. T. YOKOYAMA (Japan).
- Artificial Diets for Domestic and Wild Silkworm Raising, by Mr. T. FUKUDA (Japan).
- Water Content of Agar-Based Diet for Eri - Silkworm Raising, by Mr. T. FUKUDA (Japan).
- On the Feeding Mechanism and Prepared Food of Silkworm Bombyx mori L., by Mr. Y. HAMAMURA (Japan).
- Supplementary report on choline derivatives as a growth factor in early development of the Silkworm, by Messrs K. HAYASHIYA and J. NISHIDA (Japan).
- Nutritional requirements and artificial diets for the Silkworm Bombyx mori L., by Mr. T. ITO (Japan).
- Chlorogenic Acid as a growth factor of Silkworm, by Messrs M. KATO and H. YAMADA (Japan).
- Preliminary attempts to formulate a prepared food from boiled mulberry leaves for the Silkworm Bombyx mori L., by Messrs J. M. LEGAY and M. PASCAL (France).
- First test on the fasting of Silkworms sprinkled with nutritional solutions during the 5th instar ; Comparison between a bivoltine breed (Awojiku) and a monovoltine breed (Hacu), by Mrs C. MANUNTA (Italy).

* Les articles scientifiques de ce « numéro spécial » sont présentés dans l'ordre alphabétique des noms d'auteurs.

* The scientific papers of this « special issue » are presented in the alphabetical order of the authors' names.

AVANT-PROPOS DU SECRETARIAT GENERAL

(Original)

Au nom de la Commission Séricicole Internationale, nous sommes particulièrement heureux de présenter ce numéro spécial de la Revue du Ver à Soie - Journal of Silkworm consacré à l'alimentation du Ver à Soie sous une forme entièrement nouvelle.

Il s'agit, en effet, d'une véritable révolution dans la préparation de la nourriture des Vers à Soie (qu'ils soient du mûrier ou sauvages) et elle constitue le fondement de perspectives prometteuses pour leur élevage et, par voie de conséquence, l'avenir de la production de la Soie.

En ce qui concerne Bombyx mori L., par la grâce de la substance attractive des feuilles de mûrier le mariage du Ver à Soie et du Mûrier se perdait dans la nuit des millénaires et constituait l'un des étonnements admiratifs de l'Homme devant ces trois merveilles de la Nature: le Mûrier, le Ver à Soie et la Soie ; depuis toujours, on a été frappé par cette union qui était indissoluble malgré les philtres nombreux présentés par les autres feuilles du règne végétal.

Au point de vue scientifique ce mystère passionnait les chercheurs et pour des raisons pratiques ils voulaient aussi connaître les constituants actifs de la feuille du mûrier et le mécanisme nutritionnel du Ver à Soie afin de disposer de la chenille comme type biologique pour en tirer toutes sortes d'enseignements grâce à l'élevage permanent qui serait alors réalisé.

En bref, le mur de la feuille, le mur des diverses feuilles a été largement percé comme en font état les travaux présentés dans cette Revue.

Grâce aux progrès dans les connaissances physiologiques il a été enfin possible de concevoir la préparation de l'alimentation afin que

les divers Vers à Soie puissent être nourris dans des conditions comparables pour aboutir à des résultats également comparables. En effet, on sait maintenant que ces petites usines vivantes que sont les chenilles transforment toutes les nourritures données en vraie Soie, identique à elle-même. Cette idée de fabriquer, de préparer leur nourriture qui était "dans l'air" est entrée dans la voie des réalisations voici maintenant une dizaine d'années et cela par divers moyens et dans plusieurs pays ; plus particulièrement au Japon et en France. Les trois groupes de travail les plus connus, qui visaient au même but depuis l'origine, sont ceux d'ALES, de KYOTO et de TOKYO.

Aujourd'hui, le présent volume offre un premier panorama de la question avec une introduction générale de notre éminent collègue et ami, M. le Professeur Tadao YOKOYAMA de TOKYO.

Se trouvent ici réunis quelques écrits de divers auteurs engagés dans cette oeuvre intéressant l'avenir.

Ce numéro spécial ne constitue pas le résumé de tout ce qui a été fait, de tout ce qui est connu. Il vise surtout à concrétiser le grand effort en cours, à le mettre en lumière afin d'ouvrir la discussion sur ce sujet important pour que tous ceux qui, de près ou de loin, pensent et travaillent sur la question soient persuadés que nous sommes pleinement conscients de son intérêt. Nous souhaitons que leurs travaux et recherches soient connus ; tout d'abord, au cours du Congrès Mondial qui se tient à Beyrouth, et, ensuite dans les Bulletins et Compte-Rendus des Sociétés Savantes et en particulier dans notre Revue qui est exclusivement au service du Ver à Soie et de la Soie.

Nous espérons la plus grande compréhension de la part des professionnels et en particulier qu'ils aient la certitude des nombreuses difficultés qui restent encore à résoudre. Mais un jour viendra, où sera pratiquée la nouvelle alimentation des Vers à Soie, assurant ainsi grâce à leur élevage permanent des résultats économiques certains et la naissance d'une sériciculture industrialisée permettant de satisfaire plus facilement la "faim" de Soie qui existe de par le Monde.

Nous rendons hommage au nom de la Commission Séricicole Internationale à tous les chercheurs de tous les pays qui par leur sagacité et leur inépuisable persévérance ont contribué à ce premier succès, à cette connaissance de nouveaux secrets de la Nature qui doit permettre à tous d'apprécier, plus souvent, les nobles qualités de la Reine des Fibres.

ALES, Mars 1965. - A. SCHENK.

FOREWORD OF THE GENERAL SECRETARIAT

(Translation)

On behalf of the International Sericultural Commission, we are particularly pleased to present this special issue of the Journal of Silkworm dealing with a completely new form of food for Silkworm.

It is effectively a real revolution in the preparation of the food for Silkworms (either mulberry silkworms or wild silkworms), and it constitutes the foundation of promising prospects for Silkworm rearing and consequently for the future of Silk production.

As regards the Bombyx mori L. silkworm, thanks to the attractive substance contained in mulberry leaves, the marriage of Silkworm with Mulberry tree was lost in the mists of millenaries and formed one of the admiring astonishments of Man before these three wonders of Nature : Mulberry tree, Silkworm and Silk. Man has always been struck by this union which was indissoluble inspite of the many philtres offered by the other leaves of the vegetable kingdom.

From a scientific standpoint, this mystery impassioned the scientists, and for practical grounds they wanted to know the active components of the mulberry leaf as well as the nutritional mechanism of silkworm in order to dispose of the larva as a biological type and derive knowledge of every kind from the permanent rearing which could be then carried out.

In a few words, a large hole has been made in the wall of the leaf and in the wall of the different leaves, as it is shown in the works which are presented in this special issue.

Owing to the advancement of the physiological knowledge, it has been finally possible to conceive the preparation of diets so as to feed the different silkworms under comparable conditions and to obtain comparable results. As a matter of fact, we know now that the larvae, small living factories, transform all the foods they are given into real

silk, always identical with itself. The idea to make, to prepare their food, which was "in the air", fell within the field of realization some ten years ago, with different means and in several countries : more particularly in Japan and France. The three research groups which from the very beginning had the same goal in view, were those of ALES , KYOTO and TOKYO.

To-day, this volume presents a first panorama of the subject-matter, with a general introduction by Professor Tadao YOKOYAMA (TOKYO), our eminent colleague and friend.

We present in this special issue a few papers by different authors engaged in this task concerning the future.

This special issue is not the summary of all that has been done, of all that is known. It means essentially to put in a concrete form the great effort which is being made, to bring it to light and open a debate on such an important question so that all the people who, closely or distantly, ponder or work on this question should be persuaded of all the interest we take in it. We want their work and research to be known, first at the World Congress which will be held in Beirut, then in the Bulletins and Proceedings of the Sociétés Savantes, and particularly in our Journal which is exclusively at the service of Silkworm and Silk.

We hope to meet the greatest comprehension from the professionals and particularly that they should be conscious of the numerous difficulties which have still to be overcome. But some day will come when an absolutely new food for the silkworms is achieved, ensuring thus, thanks to an uninterrupted rearing, unquestionable economic results and the birth of an industrialized sericulture permitting to meet more easily the "craving" for Silk which exists throughout the World.

On behalf of the International Sericultural Commission, we render homage to all the scientists in all the countries who, by their shrewdness and inexhaustible perseverance, have contributed to this first success, to this knowledge of new secrets of Nature which must allow everybody to value, more often, the noble qualities of the Queen of Fibres.

ALES, March, 1965. - A. SCHENK.

INTRODUCTION

ARTIFICIAL DIET FOR SILKWORM

(Original)

by

Tadao YOKOYAMA (Japan) (1)

1 - Significance of the study on artificial diet.

The higher the living standard of mankind progresses, the better quality of textiles is demanded. The silk has the best quality of all kinds of textile materials and the demand for silk in the world is gradually increasing. However, the production of silk meets with many difficulties in supplying necessary amount. A. Schenk (1961) pointed out the importance of the psychological factors in the production of cocoon. The psychological aspect in the structure of production of cocoon is undoubtedly important, but it is strongly felt that the techniques themselves of sericulture must be renewed to attract the young generations introducing new sciences and techniques into sericulture so as to give the old industry new aspects. From the standpoint mentioned above the studies on artificial diet and the mechanization in sericulture are the most important two items in modern sericulture.

The studies on artificial diet for silkworm has been accomplished to a good success in a laboratory scale, and the results may be used for many purposes in future such as a method for basic researches or some practical application, suggesting much wider development in the practical field.

(1) Tadao YOKOYAMA, Silk Science Research Institute, Kodaira-shi, Tokyo. Former director of the Sericultural Experiment Station, Ministry of Agriculture and Forestry.

The study on the mechanization is to find a counter-measure for the shortage of rural labor brought about by the development of industry. The mechanization has also some relation to the study on the artificial diet, e. g., an apparatus for automatic rearing of eri-silkworm with artificial diet was constructed by the Sericultural Experiment Station, M.A.F.

2 - History of the study on the artificial diet for silkworm in Japan.

Watanabe (1944) proved that the quality of mulberry leaves is the heaviest factor in stabilization of cocoon crops in summer season. However, he could not know the nature of the quality of mulberry leaf which influenced the physiology of silkworm. It is impossible to know the quality of leaf in detail, so far as the natural leaves are used as silkworm food. A research group was organized under the late Professor S. Sasaki (1954) in 1953 supported by the aid of research fund of the Ministry of Education for studying artificial diet for silkworm including T. Kaneko, T. Yoshida and S. Nakajima as members. Each member proposed its own preparation of artificial diet which put a foundation to the study thereafter.

Starting from, and improving, the prescription of Yoshida, T. Fukuda (1960) first succeeded to raise the silkworm exclusively with artificial diet from hatching to the cocoon spinning stage, which after emergence laid normal eggs. The constituents were mulberry leaf powder, soybean meal, sucrose, starch, vitamins, antiseptics and water.

The studies on attractants by Hamamura and his co-workers, those on nutritional requirements by Ito and his co-workers, and those on the artificial diet of wild silkworms by Fukuda and his colleagues contributed much to the development of this field of study.

The summaries of these studies are as follows :

Attractants :

i) Substances which attracts silkworms at a distance are hexenol, hexenal, citral, linalol, linalyl acetate and terpinyl acetate.

ii) Substances which stimulate biting function of the silkworm are β -sitosterol, iso-quercitrin and morin.

iii) Substances which stimulate swallowing function are potassium phosphate and cellulose.

Nutritional requirements :

i) as for carbohydrates, glucose and fructose among hexoses, all kinds of disaccharides, dextrin among polysaccharides are good.

ii) As for lipids, sterols especially β -sitosterol or stigmasterol are necessary.

iii) As for proteins, soybean casein is good and its nutritional value is increased when it is mixed with other kind of proteins e.g. milk casein. The indispensable amino acids for silkworm are arginine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, proline, threonine, tryptophane and valine. Besides them aspartic acid is desirable to heighten the nutritional value.

iv) As for minerals, Wesson's salt mixture is available with good results, but the ashes of mulberry leaf showed better result.

v) As for vitamins, vitamin B complex (nicotinic acid, pyridoxine, pantothenic acid, etc.), vitamin C, and choline are necessary.

§ - Present and future status in the study of artificial diet.

It may be said that the study on the artificial diet for domesticated silkworm has been accomplished in the laboratory level, and that on the wild silkworms especially on eri-silkworm has been developed further.

The artificial diets for silkworm at the present level of development are utilized as follows :

i) Studies on the nutritional requirements. If we use the natural mulberry leaves which include very complex constituents, it is impossible to know the requirement in the nutrition of silkworm distinctly. Artificial diets of appropriate constitution open the way to know it in detail.

ii) Studies on pathology of silkworm in aseptic condition. The study on pathology must be carried out strictly avoiding contamination by other pathogenic organisms than the objective one. Artificial diet is used in various studies in this field with interesting results.

iii) Studies in genetics, physiology and breeding in cases where it is difficult to get natural leaves. As the silkworm fed with artificial diet in younger stage and with natural food leaves in older stage produces as good cocoon as those produced by worms fed with natural food throughout the feeding period, artificial diet is practically available

when there has been frost damage and the natural leaves can not be obtained.

iv) Judgement and improvement of the nutritional quality of mulberry leaves. Nutritional value of the artificial diet is different according to the quality of leaf powder. We can distinguish the quality of leaf, using the powder there of as one of the constituents of the artificial diet. On the other hand, when we know what is the main factor which decreases the nutritional value of the food leaf, we can improve the quality by adding appropriate substance. Ito showed that the mulberry leaf in the late autumn season which is inferior to spring or summer leaf can be improved by adding protein to it.

As for the problems to be studied in future in relation to the artificial diet for silkworm, the followings are considered.

i) Researches for finding out characteristic constituents of mulberry leaf. Many nutritional and attracting substances for silkworm have been elucidated. However, the good natural leaf is superior to the artificial diet for silkworm at present. It is necessary to find out the difference between the two and to develop an artificial diet as good as the best natural leaf so as to assure constant superior results in the rearing under any condition. To accomplish such objective more intensive as well as extensive fundamental studies must be carried out.

ii) Preparation of artificial diets for specialized uses. It is known to sericultural technicians from their experience that the quality of food leaf influences the duration of larval life, amount of silk production, number of molting, number of egg production and in special case even voltinism. They know also the difference of mulberry leaf which is the fittest to the different stages of silkworm in different season. If we came to know every detail in relation to the above mentioned problems, we might be able to get specialized prescription of artificial diet fittest for each different purpose.

iii) Studies for practical application of artificial diet. When the fundamental studies enumerated above are accomplished, it becomes necessary to carry out various studies for practical application, i. e., to enlarge the experiment to practical size from laboratory scale, including preparation of diet, method of application as well as aftercares, tools, machines, apparatus, rearing room, simplification of procedures, and lowering the cost of production. In addition, it will become desirable to breed silkworm races specially fitted for rearing with

artificial diet, and also to study the most economical production of materials for the preparation of artificial diets.

CONCLUSION

Studies on artificial diet are very interesting problem from both scientific and practical points of view. The results of it are already applicable to various fields of study at the present level of development, and promising far wider and higher development in future, contributing to the construction of renewed sericulture.

LITERATURE

- 1 - FUKUDA T., 1963. A semi-synthetic diet for eri-silkworm raising. *Agr. Biol. Chem.* 27, 601-609.
- 2 - FUKUDA T., HIGUCHI Y. and MATSUDA M., 1961. Artificial food for eri-silkworm raising. *Agr. Biol. Chemistry.* 25, 417-420.
- 3 - FUKUDA T. and HIGUCHI Y., 1963. Artificial food for oak-silkworm raising. *Agr. Biol. Chem.* 27, 99-102.
- 4 - FUKUDA T., SUTO M. and HIGUCHI Y., 1960. Silkworm raising on the artificial food. *Journ. Sericult. Sci. Japan*, 29, 1-4.
- 5 - FUKUDA T., SUTO M., KAMEYAMA T. and KAWASUGI S., 1962. Synthetic diet for silkworm raising. *Journ. Agr. Chem. Soc. Japan*, 36, 819-825.
- 6 - HAMAMURA Y., 1959. Food selection by silkworm larvae. *Nature*, 183, 1746-1747.
- 7 - HAMAMURA Y., HAYASHIYA K. and NAITO K., 1961. β -sitosterol as one of the biting factors. *Nature* 190, 880-881.
- 8 - HAMAMURA Y., HAYASHIYA K., NAITO K., MATSUURA K. and NISHIDA J., 1962. Food selection of silkworm larvae. *Nature* 194, 754-755.

- 9 - HAMAMURA Y. and NAITO K., 1961. Citral, linalyl acetate, linalol and terpinyl acetate as attractants of larvae. *Nature*, 190, 879-880.
- 10 - HORIE Y., 1959. Physiological studies on the alimentary canal of the silkworm II. Carbohydrate in the digestive fluid and in the midgut tissue. *Bull. Sericult. Exp. Sta.* 15, 365-382.
- 11 - HORIE Y., 1961. Physiological studies on the alimentary canal of the silkworm, Bombyx mori. III. Absorption and utilization of carbohydrates. *Bull. Sericult. Exp. Sta.* 16, 287-309.
- 12 - HORIE Y., 1962. Effect of various fractions of mulberry leaves on feeding of the silkworm, Bombyx mori L. *Journ. Sericult. Sci. Japan* 31, 258-264.
- 13 - HORIE Y. and ITO T., 1963. Vitamin requirements of the silkworm. *Nature*, 197, 98-99.
- 14 - ITO T., 1960. Effect of sugars on feeding of larvae of the silkworm, Bombyx mori. *Journ. Insect Physiol.* 5, 95-107.
- 15 - ITO T., 1960. Nutritive values of carbohydrates for the silkworm, Bombyx mori. *Nature* 187, 527.
- 16 - ITO T., 1961. Nutrition of silkworm, Bombyx mori. III. Requirements for sterols and their effects on the feeding. *Bull. Sericult. Exp. Sta.* 17, 91-117.
- 17 - ITO T., 1961. Nutrition of silkworm, Bombyx mori. IV. Effects of ascorbic acid. *Bull. Sericult. Exp. Sta.* 17, 119-136.
- 18 - ITO T., HORIE Y. and TANAKA M., 1961. Nutrition of silkworm, Bombyx mori. II. Some effects of artificial diets on feeding and nutrition. *Bull. Sericult. Exp. Sta.* 16, 349-373.
- 19 - ITO T. and HORIE Y., 1962. Nutrition of silkworm, Bombyx mori. VII. an aseptic culture of larvae on semi-synthetic diets. *Journ. Insect Physiol.* 8, 569-578.
- 20 - ITO T., KAWASHIMA K., NAKAHARA M., NAKANISHI K. and TERAHARA A., 1963. Effects of sterols on feeding and nutrition of silkworm, Bombyx mori L. *Journ. Insect Physiol.* 10, 225-238.
- 21 - ITO T. and TANAKA M., 1959. Beta-glucosidase of the midgut of the silkworm, Bombyx mori. *Biol. Bull.* 116, 95-105.

- 22 - ITO T. and TANAKA M., 1960. Rearing of the silkworm on an artificial diet and the segregation of pentamolters. Journ. Sericult. Sci. Japan 29, 191-196.
- 23 - SASAKI S., 1954. Improvement of feeding habit, and the practical application of artificial diet, in the silkworm, Bombyx mori L. Reports of the Studies Supported by the Research Aid of the Ministry of Education. Agriculture. (17) 349-358.
- 24 - SCHENK A., 1961. Intervention du Secrétariat Général à la 11ème session FAO, Rome. Revue du Ver à Soie, T.II, Vol. XIII. 1-25.
- 25 - WATANABE K., 1944. Experiments on the rearing of silkworms in August. Tech. Bull. Sericult. Exp. Sta. (62), 1-18.
- 26 - YOSHIDA T., MATSUOKA M. and KIMURA K., 1960. On the rearing of silkworm larvae with an artificial diet containing dried mulberry leaf powder as its basic material. Bull. Sericult. Exp. Sta. 15, 543-586.

INTRODUCTION

"ALIMENTATION ARTIFICIELLE" POUR LE VER A SOIE

(Traduction)

par

Tadao YOKOYAMA (Japon) (1)

1 - Importance des Recherches sur l'Alimentation Artificielle.

Plus le niveau de vie des gens s'élève, plus ceux-ci demandent des textiles de qualité supérieure. La Soie possède les meilleures qualités parmi tous les tissus textiles et la demande de Soie dans le monde augmente progressivement. Toutefois, la production Soie éprouve de nombreuses difficultés à faire face à cette demande croissante. A. Schenk (1961) a souligné l'importance des facteurs psychologiques dans la production des cocons. L'aspect psychologique est sans aucun doute important dans la structure de la production des cocons, mais nous savons très bien qu'il faut rénover les techniques mêmes de la sériciculture pour inciter les jeunes générations à introduire de nouvelles sciences et de nouvelles techniques dans la sériciculture afin de doter cette industrie ancienne d'aspects nouveaux. Il résulte du point de vue adopté ci-dessus que les recherches sur l'alimentation artificielle et la mécanisation de la sériciculture constituent les deux éléments essentiels de la sériciculture moderne.

Les recherches sur l'alimentation artificielle pour le Ver à Soie ont été effectuées avec succès à l'échelon laboratoire, et les résultats obtenus pourront être utilisés à des fins diverses dans l'avenir en tant que méthode pour des recherches fondamentales ou en vue d'une appli-

(1) Tadao YOKOYAMA, Institut de Recherche Scientifique de la Soie, Kodaira shi, Tokio.
Ancien Directeur de la Station Expérimentale Séricicole, Ministère de l'Agriculture et des Forêts.

cation, ce qui permet d'envisager un développement beaucoup plus important dans le domaine pratique.

Les recherches sur la mécanisation ont pour but de trouver un remède à la pénurie de main d'oeuvre rurale qu'a provoquée le développement industriel. La mécanisation n'est pas sans rapport avec les recherches sur l'alimentation artificielle. C'est ainsi qu'un appareil pour l'élevage automatique du Ver à Soie Eri avec une alimentation artificielle a été construit par la Station de Recherches Séricicoles (Ministère de l'Agriculture et des Forêts).

2 - Historique des recherches faites au Japon sur l'alimentation artificielle pour le Ver à Soie.

Watanabe (1944) démontra que la qualité des feuilles de mûrier constitue le facteur essentiel de la stabilisation des récoltes de cocons en été. Toutefois, il ne réussit pas à découvrir la nature de la qualité de la feuille de mûrier qui exerce une influence sur la physiologie du Ver à Soie. Il est impossible de connaître en détail la qualité de cette feuille tant que les feuilles naturelles sont utilisées pour nourrir le Ver à Soie. En 1953 fut créé un groupe de recherches que dirigeait le Professeur S. Sasari (1954) et qui était subventionné par le fonds de recherches du Ministère de l'Education. Ce groupe était chargé de faire des recherches sur l'alimentation artificielle du Ver à Soie, et comprenait T. Kaneko, T. Yoshida et S. Nakajima. Chaque membre de ce groupe proposa sa propre préparation d'alimentation artificielle, et celles-ci servirent de base pour les recherches ultérieures.

Ce fut T. Fukuda (1960) qui, reprenant et améliorant l'alimentation préparée par T. Yoshida, réussit le premier à élever des Vers à Soie uniquement avec une alimentation artificielle depuis l'éclosion jusqu'à la fabrication du cocon. Et les oeufs pondus par les papillons nés de ces vers étaient des oeufs normaux. Cette alimentation était composée de poudre de feuille de mûrier, de poudre de soja, de saccharose, d'amidon, de vitamines, d'antiseptiques et d'eau.

Les recherches de Hamamura et de ses collaborateurs sur les substances attractives, celles de Ito et de ses collaborateurs sur les besoins nutritifs, et celles de Fukuda et de ses collègues sur l'alimentation artificielle des Vers à Soie sauvages ont grandement contribué au développement de ce champ de recherches.

Ces recherches peuvent se résumer de la façon suivante :

Substances attractives :

a) Les substances qui attirent les Vers à Soie de loin sont : l'héxé-

noï, l'héxénal, le citral, le linalol, l'acétate de linalol et l'acétate de terpène.

b) Les substances qui stimulent la prise de nourriture sont : le β -sitostérol, l'iso-quercitrine et la morine.

c) Les substances qui stimulent l'ingestion sont : le phosphate de potassium et la cellulose.

Besoins nutritifs :

a) Les hydrates de carbone : le glucose et le fructose parmi les héroses, toutes sortes de disaccharides, et la dextrine parmi les polysaccharides sont bons.

b) Les lipides : les stérols en particulier le β -sitostérol et le stig-mastérol sont nécessaires.

c) Les problèmes : la caséine de soja est bonne et on augmente sa valeur nutritive en la mélangeant à d'autres sortes de protéines comme la caséine du lait par exemple. Les amino-acides indispensables pour le Ver à Soie sont : l'arginine, l'histidine, l'isoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la proline, la thréonine, le tryptophane et la valine. De plus, il est souhaitable d'ajouter de l'acide aspartique pour accroître la valeur nutritive.

d) Les minéraux : le mélange de sels de Wesson donne de bons résultats, mais les cendres de feuille de mûrier ont fourni de meilleurs résultats.

e) Les vitamines : un mélange de vitamines B (acide nicotinique, pyridoxine, acide pantothénique, etc...), les vitamines C et la choline sont nécessaires.

3 - Etat actuel et perspectives des recherches sur l'alimentation artificielle.

On peut dire que les recherches sur l'alimentation artificielle pour les Vers à Soie domestiques ont été menées à bonne fin en laboratoire, et que pour les Vers à Soie sauvages, en particulier le Ver à Soie Eri, ces recherches ont été poussées encore plus loin.

Au stade auquel nous sommes actuellement parvenus les alimentations artificielles pour Ver à Soie sont utilisées de la façon suivante :

a) Recherches sur les besoins nutritifs. Si nous utilisons les feuilles de mûrier naturelles qui contiennent des composants très complexes, il nous est impossible de connaître distinctement les éléments nécessaires à la nutrition. Les alimentations artificielles d'une composition appropriée nous permettent de les connaître de façon détaillée.

b) Recherches sur la pathologie du Ver à Soie dans des conditions aseptiques. Les recherches pathologiques doivent être faites en évitant rigoureusement toute contamination par des organismes pathogènes autres que les organismes objectifs. L'alimentation artificielle est utilisée pour de nombreuses recherches faites dans ce domaine et permet d'obtenir des résultats intéressants.

c) Recherches de génétique, physiologie et d'élevage dans le cas où il est difficile de se procurer des feuilles naturelles. Etant donné que le Ver à Soie nourri avec une alimentation artificielle au début de sa croissance puis avec des feuilles naturelles par la suite produit des cocons de la même qualité que ceux fournis par des Vers nourris exclusivement avec une alimentation naturelle, on peut pratiquement utiliser l'alimentation préparée lorsque les feuilles naturelles ont été endommagées par le gel et lorsqu'on est dans l'impossibilité de se procurer ces feuilles.

d) Appréciation et amélioration des qualités nutritives des feuilles de mûrier. La valeur nutritive de l'alimentation artificielle diffère selon la qualité de la poudre de feuille. Nous pouvons distinguer la qualité de la feuille dont on utilise la poudre comme étant un des éléments constitutifs de l'alimentation artificielle. D'autre part, une fois que nous connaissons le principal facteur qui diminue la valeur nutritive de la feuille, nous pouvons améliorer sa qualité en y ajoutant la substance appropriée. Ito a montré qu'il est possible d'améliorer la feuille de mûrier récoltée à la fin de l'automne, et qui est inférieure à celle récoltée au printemps ou en été, en y ajoutant de la protéine.

Parmi les problèmes qui seront étudiés à l'avenir en rapport avec l'alimentation artificielle du Ver à Soie, on peut considérer les suivants :

a) Recherches en vue de découvrir les composants caractéristiques de la feuille de mûrier.

De nombreuses substances nutritives et attractives pour le Ver à Soie ont été découvertes. Toutefois, actuellement, la feuille naturelle reste supérieure à l'alimentation artificielle pour le Ver à Soie. Il est

nécessaire de découvrir la différence existant entre ces deux alimentations et de mettre au point une alimentation artificielle qui soit aussi bonne que la meilleure des feuilles naturelles de façon à assurer des résultats supérieurs et constants pour les élevages faits dans l'un et l'autre cas. Pour atteindre un tel objectif il est nécessaire d'effectuer des recherches à la fois plus approfondies et plus vastes.

2 - Préparation d'alimentations artificielles pour des usages spécialisés.

Les techniciens séricicoles savent par expérience que la qualité des feuilles exerce une influence sur la durée de la vie larvaire, sur la quantité de Soie produite, sur le nombre de mues, sur le nombre de graines obtenues et même sur le voltinisme dans des cas spéciaux. Ils connaissent également les différences entre les feuilles de murier, celles qui conviennent le mieux aux différents stades par lesquels passe le Ver à Soie et aux différentes saisons. Si nous réussissions à connaître tous les détails sur les problèmes abordés ci-dessus, nous pourrions obtenir des régimes spécialisés d'alimentation artificielle aussi bien adaptés que possible aux différents buts recherchés.

c) Recherches d'application pratique de l'alimentation artificielle.

Lorsque les recherches fondamentales examinées plus haut auront été effectuées, il sera nécessaire d'étudier leur application pratique, c'est à dire faire passer ces expériences du stade de laboratoire à l'échelon pratique : préparation de l'alimentation, mode d'application et contrôle, outillage, machines, appareils, magnaneries, simplification de fonctionnement, et abaissement des prix à la production. De plus, il sera du plus grand intérêt d'élever des races de Ver à Soie se prêtant tout particulièrement à un élevage par alimentation artificielle et d'étudier un mode de production aussi économique que possible des substances nécessaires à la préparation des alimentations artificielles.

CONCLUSION

Les recherches sur l'alimentation artificielle constituent un problème du plus haut intérêt tant au point de vue scientifique que pratique. Les résultats obtenus peuvent déjà être exploités dans leur état actuel dans différents domaines de la recherche, et ils sont promis à un développement beaucoup plus important dans l'avenir, contribuant ainsi au renouvellement de la sériciculture.

BIBLIOGRAPHIE

(Voir texte anglais : original).

ARTIFICIAL DIETS FOR DOMESTIC
AND WILD SILKWORM RAISING

(Original)

by

Toshifumi FUKUDA (Japan) (1)

Attempts to rear silkworms on an artificial diet had been made for a long time. However, there were no reports until 1959 that silkworm had been reared exclusively on artificial diets from hatching to spinning. One winter day in 1959 the author tried, starting from Dr. Yoshida's study (15), to rear mulberry-silkworms, Bombyx mori, by my co-workers with an artificial diet whose main constituent was the powder of dry mulberry leaves, and succeeded in making larvae produce 36 cocoons, starting from 110 worms immediately after hatching from eggs. The mulberry-silkworms pupated, and the fertilized moths laid their eggs (1). This was a first experimental case that silkworms were reared only with the artificial diet during whole larval stage.

However, results on larval raising of mulberry-silkworms reared on the artificial diet was at that time remarkably inferior to those obtained with fresh mulberry leaves. Improvement (2) of the composition of the diet and of the method of the silkworm raising has led to much better results during these 5 years, but the present results are not yet so good as those obtained with fresh leaves. In comparison with results obtained with fresh mulberry leaves, the amount of the cocoon fibre produced by one larva is about 90 per cent (98 per cent at the maximum value), and numbers of eggs produced by one moth 95 per cent (11).

(1) Toshifumi FUKUDA, The Sericultural Experiment Station, Tokyo.

The author with his co-workers prepared an artificial diet whose main constituent was leaf powder of food plants, such as Ricinus communis or Ailanthus glandulosa for the raising of the eri-silkworm (Philosamia cynthia ricini), one of wild silkworms. The raising of eri-silkworms on this diet was by no means inferior to that of the insect on fresh leaves of Ricinus communis, etc., and was rather better in results on cocoon fibres produced and on eggs laid down (3).

In winter of 1961, the author with his co-workers reared 5,000 eri-silkworms on this diet and obtained satisfactory results (4). From a standpoint of practical raising of eri-silkworms, the production cost of the artificial diet was reduced, and the method of the eri-silkworm raising on it was extremely simplified (11).

To save the working labor for the silkworms (domestic or wild worms) raising on artificial diets, an apparatus consisting of 20 boxes, each of which had accommodation for 250 worms at their maximum size was made. Silkworms in a series of boxes which circulate a settled orbit are fed on slices of diets at a fixed place, and faeces excreted are eliminated automatically at another fixed place. The authors reared, using this apparatus, 3,000 eri-silkworms on the artificial food and obtained satisfactory results (11).

Furthermore, for the raising of oak-silkworms (Antheraea pernyi and Antheraea yamamai), wild silkworms, artificial foods whose main constituent is leaf powder of oak trees (Quercus dentata T. etc.). Their diets enabled Antheraea pernyi to grow adult, and Antheraea yamamai to the 2nd day of the 5th stage (5).

Diets named as a synthetic diet which consisted of chemically refined nutrients were prepared for eri-silkworms as well as for mulberry-silkworms. Assuming that the feeding by silkworms, especially eri-silkworms is remarkably stimulated by the diet which does not contain any repellents than by the diet which contains gustatory stimuli (8), synthetic diets have been prepared. The present synthetic diets enabled the larval raising during the 5th stage in a case of mulberry-silk worms (6) and whole larval raising in eri-silkworms (7). As synthetic diets prepared for eri-silkworm raising support well their larval growth, nutritional requirements by the insect have already been elucidated by my co-workers in amino acids (13), vitamins (12), carbohydrates (14), mineral substances (11), water (9), etc.

Based on the knowledges obtained on nutritional requirements of the silkworms, artificial diets named as a semi-synthetic diet, which does not contain any powder of dry leaves of food plants, and whose production cost is cheap have been prepared for the raising of the silkworms (mulberry-silkworm⁽⁷⁾ and eri-silkworms⁽¹⁰⁾). The present semi-synthetic diet prepared especially for the eri-silkworm raising which consisted of the powder of soy bean, casein, dry brewer yeast etc., enabled 90 out of 100 hatchlings to spin their cocoons (10, 11). This diet may have an intention of making possible to rear eri-silkworms all the seasons without cultivation of food plants such as Ricinus communis, etc.

REFERENCES

- (1) FUKUDA T., SUTO M. and HIGUCHI Y., (1960) - Silkworm raising on artificial food, *Nature*, 187, 669-670, *J. Sericult. Sci. Japan* 29, 1-3 (in Japanese).
- (2) FUKUDA T., HIGUCHI Y. and SUTO M., (1960) - Silkworm raising on artificial food II. The improvement of the food composition. XI Intern. Congr. Entom. (Vienna) Sym. 3 "Insect Chemistry", (in English).
- (3) FUKUDA T., HIGUCHI Y. and MATSUDA M., (1961) - Artificial food for eri-silkworm raising. *Agr. Biol. Chem. (Japan)* 25, 417-420.
- (4) FUKUDA T., (1961) - The mass raising of eri-silkworms on an artificial food. *Agriculture and Horticulture* 36, 1645-1647 (in Japanese).
- (5) FUKUDA T. and HIGUCHI Y., (1963) - Artificial food for oak-silkworm raising. *Agr. Biol. Chem.*, 27, 99-102 (in English).
- (6) FUKUDA T., SUTO M., KAMEYAMA T. and KAWASUGI S. - Synthetic diet for silkworm raising. *Nature* 196, 53-54 (in English). *Nippon Nôgei Kagaku Kaishi* 36, 819-825 (in Japanese).

- (7) FUKUDA T. - Synthetic diets for eri-silkworm raising. Bull. Sericult. Exp. Sta. (Tokyo) (in press, in Japanese with English summary). Agr. Biol. Chem. (Japan) (in press, in English).
- (8) FUKUDA T., (1962) - Nutrition and metabolism of silkworms. "Kagaku no Ryoiki", 16, 18-24 (in Japanese).
- (9) FUKUDA T., (1964) - Water content of agar-based diet for eri-silkworm raising. Revue du Ver à Soie (Bombyx mori L.) (in press, in English).
- (10) FUKUDA T., (1963) - A semi-synthetic diet for eri-silkworm raising. Agr. Biol. Chem., 27, 601-609 (in English).
- (11) FUKUDA T. - Unpublished data.
- (12) KAMEYAMA T., (1964) - Vitamin requirements of eri-silkworm. Bull. Sericult. Exp. Sta. (Tokyo) (in press, in Japanese and in English).
- (13) MATSUDA M., (1964) - Amino acid requirements of eri-silkworm. Bull. Sericult. Exp. Sta. (Tokyo) (in press, in Japanese and in English).
- (14) MATSUOKA M., (1964) - Carbohydrate requirements of eri-silkworm. Bull. Sericult. Exp. Sta. (Tokyo) (in press, in Japanese and in English).
- (15) YOSHIDA T., MATSUOKA M. and KIMURA K., (1960) - On the rearing of silkworm larvae with an artificial diet containing dried mulberry leaf powder as its basic material. Bull. Sericult. Exp. Sta. (Tokyo), 15, 543-586 (in Japanese and English summary).

ALIMENTATIONS ARTIFICIELLES POUR L'ELEVAGE DES
VERS A SOIE DOMESTIQUES ET SAUVAGES

(Traduction)

par

Toshifumi FUKUDA (Japon) (1)

Depuis longtemps on avait tenté d'élever les Vers à Soie à l'aide d'une alimentation artificielle. Et malgré tout, jusqu'en 1959, il n'avait jamais été fait état de Vers à Soie élevés exclusivement avec une alimentation artificielle depuis l'éclosion jusqu'à la confection du cocon. Un jour, au cours de l'hiver 1959, l'auteur de cet article et ses collaborateurs essayèrent, en partant des recherches du Dr. Yoshida (15), d'élever des Vers à Soie Bombyx mori avec une alimentation artificielle dont le principal élément était de la poudre de feuillè de mûrier sèche. Et nous avons réussi à obtenir 36 cocons pour 110 vers prélevés immédiatement après leur éclosion. Ces Vers à Soie du mûrier se métamorphosèrent en chrysalides, et les papillons fécondés pondirent leurs oeufs (1). C'était le premier cas expérimental où des vers à Soie étaient élevés uniquement avec une alimentation artificielle pendant tout le stade larvaire.

Toutefois, les résultats obtenus en élevant les Vers à Soie du mûrier avec cette alimentation artificielle étaient à l'époque très nettement inférieurs à ceux obtenus avec des feuilles de mûrier fraîches. En améliorant (2) la composition de cette alimentation et les méthodes d'élevage nous avons pu obtenir au cours de ces 5 dernières années des résultats très supérieurs, mais les résultats actuels ne sont pas encore aussi bons que ceux obtenus avec des feuilles fraîches. A titre de comparaison avec les résultats obtenus avec des feuilles de mûrier fraîches,

(1) Toshifumi FUKUDA, Station Séricicole Expérimentale, Tokio.

la quantité de fibre de cocon produite par une larve est d'environ 90 %, (98 % étant la valeur maximum), et le nombre d'œufs pondus par un papillon est de 95 % (11).

L'auteur de cet article et ses collaborateurs ont préparé une alimentation artificielle qui était essentiellement composée de poudre de feuilles de plantes telles que le Ricinus communis ou l'Ailanthus glandulosa pour élever un des Vers à Soie sauvages, le Ver à Soie Eri(Philosamia cynthia ricini). L'élevage des Vers à Soie Eri avec cette alimentation ne fut nullement inférieur à l'élevage avec des feuilles fraîches de Ricinus communis, etc... Il donnait même des résultats plutôt supérieurs en ce qui concerne les fibres de cocon produites et les œufs pondus (3).

Au cours de l'hiver 1961, l'auteur de cet article et ses collaborateurs ont élevé 5.000 vers à Soie Eri avec cette alimentation et ont obtenu des résultats satisfaisants (4). Du point de vue de l'élevage pratique des Vers à Soie Eri, le coût de production de l'alimentation artificielle était réduit, et la méthode d'élevage extrêmement simplifiée (11).

Afin de réduire le personnel nécessaire pour l'élevage des Vers à Soie (domestiques ou sauvages) avec les alimentations artificielles, nous avons construit un appareil composé de 20 boîtes, chacune de ces boîtes pouvant recevoir 250 vers ayant atteint leur taille maximum. Les vers, placés dans une série de boîtes se déplaçant sur une orbite fixe, reçoivent leur nourriture à un endroit déterminé, et les matières fécales excrétées sont éliminées automatiquement à un autre endroit déterminé. A l'aide de cet appareil les auteurs de cet article ont élevé 3.000 Vers à Soie Eri avec l'alimentation artificielle et ont obtenu des résultats satisfaisants (11).

Par ailleurs, nous avons élevé des Vers à Soie du chêne (Antheraea pernyi et Antheraea yamamai), qui sont des vers sauvages, avec des alimentations artificielles essentiellement composées de poudre de feuilles de chêne (Quercus dentata T. , etc...). L'alimentation qui leur a été donnée a permis à l'Antheraea pernyi d'atteindre l'âge adulte, et à l'Antheraea yamamai d'atteindre le 2ème jour du 5ème âge (5).

Nous avons également préparé pour les vers à Soie Eri et les vers à Soie du mûrier des alimentations dites synthétiques qui étaient composées de substances nutritives chimiquement raffinées. Supposant que la prise de nourriture des Vers à Soie, en particulier celle des Vers

à Soie Eri est beaucoup plus stimulée par une alimentation qui ne contient aucune substance repoussante que par une alimentation contenant des stimulants gustatifs (8), nous avons préparé des alimentations synthétiques. Ces alimentations synthétiques ont permis un élevage des larves pendant le 5ème âge dans le cas des Vers à Soie du mûrier, et un élevage complet des larves dans le cas des Vers à Soie Eri (7). Comme les alimentations synthétiques préparées pour les Vers à Soie Eri favorisent leur croissance larvaire, les besoins nutritifs de cet insecte ont déjà été distingués par mes collaborateurs en acides aminés (13), vitamines (12), hydrates de carbone (14), substances minérales (11), eau (9), etc...

A partir des connaissances que nous avons obtenues sur les besoins nutritifs des Vers à Soie, nous avons préparé pour leur élevage (Vers à Soie du mûrier (7) et Vers à Soie Eri (10)) une alimentation artificielle dite semi-synthétique, qui ne contient aucune poudre de feuilles sèches de plantes et dont le coût de production est faible. Cette alimentation semi-synthétique préparée spécialement pour l'élevage du Ver à Soie Eri et qui est composée de poudre de soja, de caséine, de levure de bière sèche, etc... a permis d'obtenir 90 cocons pour 100 vers prélevés aussitôt après l'éclosion (10, 11). Cette alimentation peut avoir pour but de rendre l'élevage des Vers à Soie possible en toutes saisons sans que l'on ait besoin de cultiver des plantes telles que le Ricinus communis, etc...

REFERENCES

(Voir texte anglais : original)

WATER CONTENT OF AGAR-BASED DIET FOR
ERI-SILKWORM RAISING

(Original)

by

Toshifumi FUKUDA (Japan) (1)

In a previous paper (1), an agar-based diet whose main constituent is leaf powder of the food plants, such as Ricinus communis or Ailanthus glandulosa was prepared for raising of eri-silkworm (Philosamia cynthia ricini), one of the leaf-feeding insects. In attempting to formulate diets for the eri-silkworm raising, a starch-based diet containing 63 per cent of water was at first prepared, but attempts to rear hatchlings on this diet were unsuccessful, all dying by the 5th instar. By raising the eri-silkworm on the diet containing agar-agar, the water content of which was 74 per cent, hatchlings showed at last normal growth, and underwent the adult stage transformation. This fact will show how the water content in the diet plays an important role for the eri-silkworm growth, and this fact coincide with the practical experience in India (4). The current study was carried out to decide an optimum level of water in the agar-based diet for the eri-silkworm raising.

I - Preparation of Diet and Eri-Silkworm Raising.

1 - Preparation of diets.

The composition of 6 kinds of the diet containing different proportions of water is shown in Table 1. Weighing 5.5 g of powdered leaves of Ailanthus glandulosa and 1 g of the "kinako" (powder of parched soy

(1) Toshifumi FUKUDA, The Sericultural Experiment Station, Tokyo (Japan).

bean) in a mortar, and the mixture was stirred well with a glass rod. On the other hand, 1.5 g of the powdered agar-agar and 1 g of the sugar were dissolved by heating in the appropriate amount of the aseptic solution containing the appropriate amount of the water. As the agar-agar-solution cooled below 65 C the leaf powder- "kinako" mixture was added, thoroughly stirred in, hardened at room temperature, and stored in a refrigerator at 2 C. The amount of the aseptic solution and the water used in preparation of the diets containing different proportions of water is shown in Table 2. The sodium dehydro-acetate solution as an aseptic solution was prepared by dissolving 3 g of the specimen in 1 litre of water. One ml of this solution contains 3 mg of sodium dehydroacetate. The amount of sodium dehydroacetate was maintained constant at 0.15 per cent of each diet prepared.

2 - Determination of water content.

The water content of fresh leaves of Ailanthus glandulosa, the agar-based diets and the faeces excreted by the eri-silkworms reared on both food was respectively measured and dried at 105 C for several hours.

3 - Eri-silkworm raising.

The eri-silkworm raising on agar-based diets was carried out according to the procedure described in a previous paper (1). A piece of paraffin paper was placed at the bottom of a petri-dish ready for raising of the eri-silkworm. Slices of the diet were placed on the paraffin paper, then the worms were placed on it and reared there. The dish, covered with a lid, was placed in a box at a temperature of 25 C and at about 70 per cent humidity. The temperature and the humidity in the dish with a lid containing worms and slices of the diet were respectively 25 C and 80 - 95 per cent. The diet was cut in slices 0.1 - 1 mm thick. Slices were fed to the worms twice daily at 9 AM and 6 PM.

II - Experimental Results and Discussion.

Results on the raising of eri-silkworms reared on agar-based diets containing different proportions of water are given in Table 3. As shown in Table 3, all the hatchlings tested reared on the diets containing lower proportions of water (55 to 65 per cent) died during the larval stage, and none spun their cocoons. Where the water content was 70 per cent, a large number of hatchlings tested produced their cocoons, but some of them became nonmolting pupae. Almost all hatchlings reared

on the diets containing higher proportions of water (75 and 80 per cent) was able to completely develop with good adult survival. Table 4 giving results on larval raising investigated at the 15 days after hatching showed also that the growth of the eri-silkworm larva reared on diets containing lower proportions of water (less than 65 per cent) was remarkably retarded, and that the diets containing higher proportions of water (more than 75 per cent) had the best value on the growth rates of the larvae.

Agar-based diets containing less than 60 per cent (N° 1 and N° 2 diets) seemed to have a tendency to become too hard to be utilizable by the eri-silkworm larvae. Thereupon, in the diets which in the composition of 6 kinds of agar-based diets described in Table 1, 1.5 g of the agar-agar was used to replace 1.0 g of the agar-agar and 0.5 g of the leaf powder of Ailanthus glandulosa were prepared, and the eri-silkworm raising on them was carried out. Results obtained were almost the same as those described in Table 3. This fact may show that the difference of growth rates of the eri-silkworm larva described in Tables 3 and 4 are obtained in relation to water requirement of the eri-silkworm larva, having nothing to do with hardness of the diet prepared.

To obtain knowledges on water requirements of the eri-silkworm larva at each stage, larvae at the first day of each stage were reared on the 6 kinds of agar-based diets described in Table 1, and the mean weight of the larva and number of individuals surviving were investigated at the 10 or 5 days after the commencement of each experiment. Growth data for this series of experiments summarized in Table 5 may lead to the conclusion that the N° 5 diet containing 75 per cent of water gives always the best result in eri-silkworm growth at each larval stage. Furthermore, the evaporation of the water from slices of the diet in a petri-dish with a lid was remarkably little, as to be understood from an experimental result that the evaporation of the water from slices of the N° 5 diet containing 75 per cent of water was always less than 2 per cent for 24 hours.

From these experimental results it can be concluded that the optimum water level of the agar-based diet whose main constituent is leaf powder of the food plants for eri-silkworm raising is about 75 per cent during whole larval stage. This conclusion was also applicable to an agar-based diet named as a semi-synthetic diet (2) which consisted of "kinako", sucrose, dry brewer yeast etc. . . , without containing any extracts from leaves of food plants such as Ricinus communis or Ailanthus glandulosa, not to mention the powder of dry leaves of these plants,

and in an agar-based diet named as a synthetic diet (3) whose main constituents are chemically refined nutrients.

Water is as essential to eri-silkworms as to all other insects. It is naturally expected that water stimulates strongly feeding by the eri-silkworm in addition to its metabolic importance. The quantity of the water required by the eri-silkworm seems to be comparatively higher level, judging from not only experimental results obtained in the current study but also the water concentration in fresh leaves of food plants such as Ricinus communis, Ailanthus glandulosa (50 - 80 per cent).

In order to obtain knowledges on water absorption by the eri-silkworm from the agar-based diets whose main constituent is leaf powder of food plants, the water content of faeces excreted for 24 hours by isolated larvae at the beginning of the 5th stage reared on the N° 2 diet containing 60 per cent of water, on the N° 5 diet containing 75 per cent (Table 1) and on fresh leaves of Ailanthus glandulosa in the dish with a lid was measured. Results obtained are shown in Table 6. The water content of the faeces excreted by the eri-silkworm was regularly less by 3 per cent of the water content of the food, regardless of the kind of food and the quantity of the water contained in the agar-based diet. The evaporation for 24 hours of the water from faeces in the petri-dish with a lid whose inside was kept at a temperature of 25°C and at 90 per cent humidity was extremely little. This fact means how the dietary water plays an important role for the eri-silkworm growth, though the eri-silkworm larva will also, if necessary, utilize the water resulting from the oxidation of food in the body.

SUMMARY

The current study was carried out to decide an optimum level of the water in the agar-based diet whose main constituent is leaf powder of food plants such as Ricinus communis and Ailanthus glandulosa for the eri-silkworm raising.

The optimum level of the water in the agar-based diet for the eri-silkworm raising was about 75 per cent during the whole larval stage. Hatchlings tested reared on the diets containing higher proportions of water (75 and 80 per cent) was able to completely develop with good adult survival, but where the water content was less than 65 per cent all the hatchlings tested died during the larval stage, none surviving matured larvae.

REFERENCES

- (1) FUKUDA T., HIGUCHI Y. and MATSUDA M. (1961) : Artificial food for eri-silkworm raising. - *Agr. Biol. Chem. (Japan)*, 25, 417-420 (in English).
- (2) FUKUDA T. (1963) : A semi-synthetic diet for eri-silkworm raising. *Agr. Biol. Chem. (Japan)*, 27, 601-609 (in English).
- (3) FUKUDA T. (1964) : Synthetic diets for eri-silkworm raising. - *Bull. Sericult. Exp. Station* (in press) (Japanese with English summary).
- (4) MUKERJI N.G. (1912) : *Handbook of Sericulture*. - Bengal Secretariat Book Depot. Calcutta.

Table 1. - Composition of diets containing different proportions of water

Components	Diet						
	1	2	3	4	5	6	
Leaf powder of <u>Ailanthus glandu- losa</u> (g)	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	
"Kinako" (a parched soy bean (g)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
Sugar (g)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
Powdered agar-agar (g)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	
Sodium dehydroacetate (mg)	30	34	39	45	54	68	
Water (ml)	11	13.5	16.7	21	27	36	
Water per cent	Calculated	55	60	65	70	75	80
	Measured	56.5	61.3	66.2	71.5	74.2	79.1

Table 2. - The amount of the aseptic solution and water used in preparation of the diets containing different proportion of water.

Solution	Diet					
	1	2	3	4	5	6
Aseptic solution (ml)	10	11.3	13	15	18	22.7
Water (ml)	1	2.2	3.7	6	9	13.3

Table 3. - Results on the raising of eri-silkworms reared on agar-based diets containing different proportions of water.

Matters of investigation	Diet					
	1	2	3	4	5	6
	1 (55%)	2 (60%)	3 (65%)	4 (70%)	5 (75%)	6 (80%)
N° of newly hatched larvae tested	20	20	20	20	20	20
N° of newly moulted larvae at each stage						
2nd stage	20	18	19	20	20	20
3rd "	18	18	19	20	20	20
4th "	16	18	19	20	20	20
5th "	0	4	10	20	20	19
N° of matured larvae		0	2	19	20	18
N° of pupae			0	12	20	18
N° of cocoon produced				18	20	18
Weight of the cocoon fibre produced by one male larvae (mg)				214	220	199
Weight of the eri-silkworm						
Matured larva (♂)				3.2	3.3	3.2
Pupa (♂)				1.7	1.6	1.4
Larval period (days)				21-26	20-23	21-25

Figures in brackets () show the water per cent of diets.

Table 4. - Results on larval raising of eri-silkworms investigated at the 15 days after hatching.

Matters of investigation	Diet					
	1 (55%)	2 (60%)	3 (65%)	4 (70%)	5 (75%)	6 (80%)
N ^o of hatchlings tested	20	20	20	20	20	20
N ^o of individuals surviving	16	18	19	20	20	20
Total weight of individuals surviving (g)	0.90	2.70	5.80	13.40	18.40	16.40
Mean weight of individuals (mg)	56	150	305	670	920	840
Age of individuals	3rd stage	15	0	0	0	0
	4th "	1	18	19	20	14
	5th "	0	0	0	0	6

Table 5. - Water requirements of the eri-silkworm at different larval stage.

Matters of investigation (2nd stage)	Diet					
	1 (55%)	2 (60%)	3 (65%)	4 (70%)	5 (75%)	6 (80%)
N ^o of larvae at the 1st day of the 2nd stage tested	20	20	20	20	20	20
Mean weight of the larva at the 1st day of the 2nd stage (mg)	8	9	9	9	8	8
Results at 10 days after commencement of the experiment.						
No of individuals surviving	19	20	20	20	20	20
Mean weight of the larva (mg)	54	140	330	420	550	490
Age	3rd stage	19	1	0	1	0
	4th "	0	19	20	19	20

Matters of investigation (3rd stage)		Diet					
		1 (55%)	2 (60%)	3 (65%)	4 (70%)	5 (75%)	6 (80%)
N° of larva at the 1st day of the 3rd stage tested		20	20	20	20	20	20
Mean weight of the larva at the 1st day of the 3rd stage (mg)		40	40	40	40	40	40
Results at 10 days after commencement of the experiment N° of indivi- duals surviving		18	20	20	20	19	18
Mean weight of the larva (g)		0.25	0.41	0.53	0.91	0.99	0.82
Age	4th stage	18	18	11	1	3	12
	5th "	0	2	9	19	16	6

Matters of investigation (4th stage)		Diet					
		1 (55%)	2 (60%)	3 (65%)	4 (70%)	5 (75%)	6 (80%)
N° of larvae at the 1st day of the 4th stage tested		20	20	20	20	20	20
Mean weight of the larva at the 1st day of the 4th stage (g)		0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16
Results at 10 days after commencement of the experiment N° of indivi- duals surviving		17	20	10	13	19	18
Mean weight of the larva (g)		0.49	0.93	1.60	1.96	2.10	1.74
Age	4th stage	2	0	0	0	0	0
	5th stage	15	20	10	13	19	18

Matters of investigation (5th stage)	Diet					
	1 (55%)	2 (60%)	3 (65%)	4 (70%)	5 (75%)	6 (80%)
N° of larvae at the 1st day of the 5th stage tested	10	10	10	10	10	10
Mean weight of the larva at the 1st day of the 5th stage (g)	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59
Results at 5 days after commencement of the experiment N° of indivi- duals surviving	10	10	10	10	10	10
Mean weight of the larva (g)	1.32	1.68	2.46	2.67	3.08	3.27
N° of matured larvae	4	9	10	10	10	10
N° of pupae	0	3	6	4	7	7

Table 6. - Water content of faeces excreted by the eri-silkworms at the 1st day of the 5th stage that ate diets containing different proportions of water.

Matters of investigation	Kind of diets		
	N° 2 diet	N° 5 diet	Fresh leaves of <u>Ailanthus glandulosa</u>
Water per cent of faeces excreted by 5th instar (%)	58.5	72.5	64.3
Water per cent of diets (%)			
Calculated	60	75	
Measured	61.3	75.0	67.3

CONTENU AQUEUX DE L'ALIMENTATION A BASE DE
 GELOSE POUR L'ELEVAGE DU VER A SOIE ERI

(Traduction)

par

Toshifumi FUKUDA (Japon) (1)

Dans un article antérieur (1) nous avons parlé d'une alimentation à base de gélose préparée pour l'élevage du Ver à Soie Eri (Philosamia cynthia ricini), qui était essentiellement composée de poudre de feuilles de plantes telles que le Ricinus communis ou l'Ailanthus glandulosa. Lors de nos essais de mise au point d'une alimentation permettant d'élever le Ver à Soie Eri, nous avons tout d'abord préparé une alimentation à base d'amidon contenant 63 % d'eau, mais les expériences faites pour élever des vers nouvellement éclos n'ont pas été fructueuses : tous les vers moururent vers le 5ème âge. En élevant le Ver à Soie Eri avec une alimentation contenant de la gélose et dont la fraction aqueuse était de 74 %, les vers nouvellement éclos eurent finalement une croissance normale et subirent la transformation du stade adulte. Ce fait montre à quel point est important le rôle joué par la fraction aqueuse de l'alimentation dans la croissance du Ver à Soie Eri, et il corrobore les expériences pratiques réalisées en Inde (4).

Les recherches décrites dans cet article ont été entreprises afin de déterminer la fraction aqueuse optimum de l'alimentation à base de gélose pour l'élevage du Ver à Soie Eri.

I - Préparation de l'Alimentation et Elevage du Ver à Soie Eri.

1 - Préparation des alimentations

Le Tableau 1 présente la composition de 6 préparations d'alimentations contenant des fractions aqueuses différentes. Nous avons pesé

 (1) Toshifumi FUKUDA, Station Expérimentale Séricicole, Tokio (Japon).

5,5 g de poudre de feuilles d'Ailanthus glandulosa et 1 g de "Kinako" (poudre de soja desséché) que nous avons versés dans un mortier et bien remués avec une baguette de verre. Par ailleurs, nous avons fait fondre 1,5 g de gélose en poudre et 1 g de sucre dans une quantité appropriée de solution aseptique contenant une fraction aqueuse appropriée. Lorsque la solution de gélose était retombée à une température inférieure à 65°C, on y ajoutait le mélange poudre de feuilles-"Kinako", on agitait jusqu'à ce que le tout soit bien mélangé, on le laissait durcir à la température de la pièce, et on le déposait dans un réfrigérateur ou régnait une température de 2°C. Le Tableau 2 présente les quantités de solution aseptique et d'eau utilisées pour préparer ces alimentations qui contenaient des fractions aqueuses différentes. On prépara la solution de déhydroacétate utilisée comme solution aseptique en dissolvant 3 g de ce corps dans 1 litre d'eau. Un ml de cette solution contient 3 mg de déhydroacétate de sodium. Pour chacune des alimentations préparées, le taux de déhydroacétate de sodium était maintenu de façon constante à 0,15 %.

2 - Détermination du contenu aqueux.

Le contenu aqueux des feuilles fraîches d'Ailanthus glandulosa, des alimentations à base de gélose et des matières fécales excrétées par les Vers à Soie Eri élevés avec ces deux catégories d'alimentation fut respectivement mesuré et évaporé à 105°C pendant plusieurs heures.

3 - Elevage du Ver à Soie Eri.

Nous avons procédé à l'élevage du Ver à Soie Eri avec les alimentations à base de gélose selon les méthodes décrites dans un article antérieur (1). Un morceau de papier paraffiné était placé au fond d'une boîte de Pétri préparée pour l'élevage du Ver à Soie Eri. Des tranches de nourriture étaient déposées sur le papier paraffiné, puis les vers étaient placés sur ce papier ou ils étaient élevés. La boîte, sur laquelle on posait un couvercle, était placée dans une caisse où régnaient une température de 25°C et une humidité d'environ 70 %. La température et l'humidité régnaient dans la boîte munie d'un couvercle et contenant les vers et les tranches de nourriture étaient respectivement de 25°C et de 80 à 95 %. La nourriture était découpée en tranches de 0,1 à 1 mm d'épaisseur. Et les vers recevaient ces tranches deux fois par jour, à 9 h et à 18 h.

II - Résultats des Expériences et Discussions.

Les résultats obtenus en élevant des Vers à Soie Eri avec des alimentations à base de gélose et contenant des proportions aqueuses différentes sont présentés dans le Tableau 3. Comme le montre ce Tableau 3, toutes les larves étudiées qui ont été élevées avec les alimentations ayant les plus faibles proportions aqueuses (55 à 65 %) sont mortes au cours de la période larvaire, et aucune n'a filé de cocon. Lorsque la proportion aqueuse atteignait 70 %, un grand nombre des larves étudiées produisaient un cocon, mais certaines devenaient des chrysalides incapables de muer. Presque toutes les larves élevées avec les alimentations ayant les plus fortes proportions aqueuses (75 et 80 %) se développaient de façon complète avec une bonne survivance adulte. Le Tableau 4, qui donne les résultats de l'élevage des larves étudiées 15 jours après l'éclosion montre également que la croissance des larves du Ver à Soie Eri élevées avec les alimentations contenant les plus faibles proportions aqueuses (moins de 65 %) était considérablement retardée, et que les alimentations contenant des proportions aqueuses plus importantes (plus de 75 %) étaient meilleures pour le rythme de croissance des larves.

Les alimentations à base de gélose contenant moins de 60 % d'eau (alimentation N° 1 et N° 2) semblaient avoir tendance à devenir trop dures pour être utilisables par les larves du Ver à Soie Eri. Sur ce, nous avons préparé les alimentations qui composent les 6 catégories d'alimentation à base de gélose décrites dans le Tableau 1 et où 1,5 g. de gélose a été utilisé pour remplacer 1,0 g de gélose et 0,5 g de poudre de feuille d'Ailanthus glandulosa, et nous avons élevé des Vers à Soie Eri avec ces alimentations. Les résultats obtenus furent pratiquement les mêmes que ceux décrits dans le Tableau 3. Ce fait peut montrer que les différences de rythme de croissance des larves du Ver à Soie Eri décrites dans les Tableaux 3 et 4 sont obtenues en fonction des besoins en eau des larves du Ver à Soie Eri, et n'ont rien à voir avec la dureté de l'alimentation préparée.

En vue d'obtenir des données sur les besoins en eau des larves du Ver à Soie Eri à chaque âge, nous avons élevé des larves au premier jour de chaque âge avec les 6 catégories d'alimentation à base de gélose décrites dans le Tableau 1, et nous avons étudié le poids moyen des larves et le nombre de larves encore vivantes soit 10 jours, soit 5 jours après le début de chaque expérience. Les données de croissance obtenues pour cette série d'expériences sont résumées dans le Tableau 5 et

elles nous incitent à conclure que l'alimentation N° 5 contenant 75 % d'eau donne toujours les meilleurs résultats à chaque stade larvaire de la croissance du Ver à Soie Eri. De plus, l'évaporation de l'eau contenue dans les tranches de nourriture placées dans une boîte de Pétri munie d'un couvercle était très faible, comme le montre le résultat expérimental suivant : pour les tranches d'alimentation N° 5 contenant 75 % d'eau, l'évaporation restait constamment inférieure à 2 % pour une période de 24 heures.

De ces résultats expérimentaux on peut tirer la conclusion que la proportion aqueuse optimum de l'alimentation à base de gélose essentiellement composée de poudre de feuilles de plantes, et destinée à l'élevage du Ver à Soie Eri, est d'environ 75 % pour toute la période larvaire. Cette conclusion est également valable pour l'alimentation à base de gélose dite alimentation semi-synthétique (2) qui est composée de "Kinako", de saccharose, de levure de bière sèche, etc... et qui ne contient pas d'extraits de feuilles de plantes telles que le Ricinus communis ou l'Ailanthus glandulosa sans parler de poudre de feuilles sèches de ces plantes. Conclusion qui est également valable pour l'alimentation à base de gélose dite alimentation synthétique (3) qui est essentiellement composée de substances nutritives chimiquement raffinées.

L'eau a la même importance capitale pour les Vers à Soie Eri que pour tous les autres insectes. On pense naturellement que l'eau stimule fortement la nutrition du Ver à Soie Eri en plus de son importance métabolique. La quantité d'eau nécessaire au Ver à Soie Eri semble être relativement importante si l'on en juge non seulement par les résultats expérimentaux obtenus dans la présente étude, mais aussi par la concentration d'eau existant dans les feuilles fraîches des plantes nourricières telles que le Ricinus communis ou l'Ailanthus glandulosa (50-80 %).

Afin d'obtenir des données sur la quantité d'eau absorbée par le Ver à Soie Eri à partir des alimentations à base de gélose dont la poudre de feuilles de plantes constitue le principal élément, nous avons mesuré la fraction aqueuse des matières fécales excrétées en 24 heures par des larves isolées au début du 5ème âge lorsque celles-ci étaient élevées avec l'alimentation N° 2 contenant 60 % d'eau, avec l'alimentation N° 5 contenant 75 % d'eau (Tableau 1) et avec des feuilles fraîches de Ailanthus glandulosa placées dans la boîte munie d'un couvercle. Les résultats obtenus sont indiqués dans le Tableau 6. La fraction aqueuse des matières fécales excrétées par le Ver à Soie Eri

était régulièrement inférieure de 3 % à la proportion aqueuse contenue dans la nourriture, quelles que fussent la catégorie d'alimentation et la quantité d'eau contenue dans l'alimentation à base de gélose. Pour une période de 24 heures, l'évaporation de l'eau contenue dans les matières fécales recueillies dans la boîte de Pétri munie d'un couvercle, et à l'intérieur de laquelle régnaient une température de 25°C et une humidité de 90 %, était extrêmement faible. Ce fait montre le rôle important que joue la proportion aqueuse de l'alimentation utilisée dans la croissance du Ver à Soie Eri, bien que les larves du Ver à Soie utiliseront également, si nécessaire, l'eau résultant de l'oxydation des aliments dans le corps.

RESUME

Cette étude a été faite en vue de déterminer la fraction aqueuse optimum de l'alimentation à base de gélose essentiellement composée de poudre de feuilles de plantes nourricières telles que le Ricinus communis et l'Ailanthus glandulosa et utilisée pour l'élevage du Ver à Soie Eri.

Pour tout le cycle larvaire, la fraction aqueuse optimum de l'alimentation à base de gélose utilisée pour l'élevage du Ver à Soie Eri a été d'environ 75 %. Les larves élevées avec les alimentations contenant les plus fortes proportions aqueuses (75 et 80 %) se sont développées de façon complète et bon nombre d'entre elles ont survécu au stade adulte. Par contre, avec les alimentations ayant des proportions aqueuses inférieures à 65 %, toutes les larves examinées sont mortes au cours du cycle larvaire, et aucune, n'a survécu au stade adulte.

REFERENCES

(Voir texte anglais : original).

Tableau 1. - Composition des alimentations contenant des fractions aqueuses différentes.

Composants	Alimentations						
	1	2	3	4	5	6	
Poudre de feuille d' <u>Ailanthus glandulosa</u> (g)	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	
"Kinako" (soja desséché) (g)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
Sucre (g)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
Gélose en poudre (g)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	
Déhydroacétate de sodium (mg)	30	34	39	45	54	68	
Eau (ml)	11	13,5	16,5	21	27	36	
% d'eau	Calculé	55	60	65	70	75	80
	Mesuré	56,5	61,3	66,2	71,5	74,2	79,1

Tableau 2. - Quantités de solution aseptique et d'eau utilisées dans la préparation des alimentations contenant des fractions aqueuses différentes.

Solution	Alimentations					
	1	2	3	4	5	6
Solution aseptique (ml)	10	11,3	13	15	18	22,7
Eau (ml)	1	2,2	3,7	6	9	13,3

Tableau 3. - Résultats obtenus en élevant des vers à Soie Eri avec des alimentations à base de gélose et contenant des proportions aqueuses différentes.

Elements étudiés	Alimentations					
	1 (55%)	2 (60%)	3 (65%)	4 (70%)	5 (75%)	6 (80%)
Nombre de larves récemment écloses étudiées	20	20	20	20	20	20
Nombre de larves ayant récemment fait leur mue à chaque âge						
2ème âge	20	18	19	20	20	20
3ème âge	18	18	19	20	20	20
4ème âge	16	18	19	20	20	20
5ème âge	0	4	10	20	20	19
Nombre de larves arrivées à maturité		0	2	19	20	18
Nombre de chrysalides			0	12	20	18
Nombre de cocons produits				18	20	18
Poids de fibre de cocon produite par une larve mâle (mg)				214	220	199
Poids de la larve du ver à Soie Eri arrivée à maturité (σ)				3,2	3,3	3,2
Poids de la chrysalide du ver à Soie Eri (σ)				1,7	1,6	1,4
Période larvaire (jours)				21-26	20-23	21-25

Les chiffres entre parenthèses indiquent le pourcentage aqueux des alimentations.

Tableau 4. - Résultats de l'élevage des larves du ver à Soie Eri étudiés 15 jours après l'éclosion.

Eléments étudiés	Alimentations					
	1 (55%)	2 (60%)	3 (65%)	4 (70%)	5 (75%)	6 (80%)
Nombre de larves ré- cemment écloses étudiées	20	20	20	20	20	20
Nombre de larves ayant survécu	16	18	19	20	20	20
Poids total des larves ayant survécu (g)	0,90	2,70	5,80	13,40	18,40	16,40
Poids moyen des lar- ves (mg)	56	150	305	670	920	840
Age des larves	3ème âge	15	0	0	0	0
	4ème âge	1	18	19	20	14
	5ème âge	0	0	0	0	6

Tableau 5. - Besoins en eau du ver à Soie Eri aux différents âges lar-
vaires.

Eléments étudiés (2ème âge)	Alimentations					
	1 (55%)	2 (60%)	3 (65%)	4 (70%)	5 (75%)	6 (80%)
Nombre de larves étu- diées au 1er jour du 2ème âge.	20	20	20	20	20	20
Poids moyen des larves au 1er jour du 2ème âge (mg)	8	9	9	9	8	8
Résultats 10 jours après le début de l'expérience						
Nombre de larves en vie	19	20	20	20	20	20
Poids moyen des larves (mg)	54	140	330	420	550	490
Age	3ème âge	19	1	0	1	0
	4ème âge	0	19	20	19	20

Eléments étudiés (3ème âge)	Alimentations					
	1 (55%)	2 (60%)	3 (65%)	4 (70%)	5 (75%)	6 (80%)
Nombre de larves étudiées au 1er jour du 3ème âge.	20	20	20	20	20	20
Poids moyen des larves au 1er jour du 3ème âge (mg)	40	40	40	40	40	40
Résultats 10 jours après le début de l'expérience						
Nombre de larves en vie	18	20	20	20	19	18
Poids moyen des larves (g)	0,25	0,41	0,53	0,91	0,99	0,82
Age						
4ème âge	18	18	11	1	3	12
5ème âge	0	2	9	19	16	6

Eléments étudiés (4ème âge)	Alimentations					
	1 (55%)	2 (60%)	3 (65%)	4 (70%)	5 (75%)	6 (80%)
Nombre de larves étudiées au 1er jour du 4ème âge.	20	20	20	20	20	20
Poids moyen des larves au 1er jour du 4ème âge (g)	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16
Résultats 10 jours après le début de l'expérience.						
Nombre de larves en vie	17	20	10	13	19	18
Poids moyen des larves (g)	0,49	0,93	1,60	1,96	2,10	1,74
Age						
4ème âge	2	0	0	0	0	0
5ème âge	15	20	10	13	19	18

Eléments étudiés (5ème âge)	Alimentations					
	1 (55%)	2 (60%)	3 (65%)	4 (70%)	5 (75%)	6 (80%)
Nombre de larves étudiées au 1er jour du 5ème âge	10	10	10	10	10	10
Poids moyen des larves au 1er jour du 5ème âge (g)	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59
Résultats 5 jours après le début de l'expérience						
Nombre de larves en vie	10	10	10	10	10	10
Poids moyen des larves (g)	1,32	1,68	2,46	2,67	3,08	3,27
Nombre de larves arrivées à maturité	4	9	10	10	10	10
Nombre de chrysalides	0	3	6	4	7	7

Tableau 6. - Fraction aqueuse des matières fécales excrétées au 1er jour du 5ème âge par des Vers à Soie Eri élevés avec des alimentations contenant des proportions aqueuses différentes.

Eléments étudiés	Types d'alimentation		
	Alimentation N°2	Alimentation N°5	Feuilles fraîches d' <i>Ailanthus glandulosa</i>
Fraction aqueuse des matières fécales excrétées au 5ème âge (%)	58,5	72,5	64,3
Proportion aqueuse des alimentations utilisées (%)			
Calculée	60	75	
Mesurée	61,3	75,0	67,3

ON THE FEEDING MECHANISM AND PREPARED FOOD
OF SILKWORM BOMBYX MORI L.

(Original)

by

Yasuji HAMAMURA (Japan) (1)

The things why Larvae of silkworm Bombyx mori do eat only mulberry leaves had been and have been touching deeply my heart throughout the first job in the Laboratory of biochemistry. And, it had been taken almost twenty years before the first paper "on the mechanism of food selection in silkworm" has been published. It was just before of retiring from my first job in Kyoto Univ. of Ind. This report is a summary of works which have been done on the mechanism of food selection in silkworm larvae and on their prepared foods which are still going on in my second job in Konan University.

I - On The Mechanism Of Food Selection By Silkworm Larvae.

It was doramatically found that the feeding behaviour of silkworm is consisting of three steps toward their food. In which three stimulants which attracts the larvae on to these leaves has existed in the cold éthanol soluble fraction. The second which stimulates the biting action has come from hot methanol soluble fraction of the residue of ethanol extract. And the third which is able to stimulate the continuous swallowing by the larvae has been found in the residue insoluble in methanol.

Combining of these fractions silkworm larvae could be perfectly come to on agar jelly and ate it up continuously. These three stimulants then were provisionally called attractant, biting and swallowing factors

(1) Yasuji HAMAMURA, Biological Department, Konan University, Kobe.

respectively. This was the first observation studied biochemically on feeding behaviour of silkworm larvae.

The isolation of these factors from mulberry leaves had been undertaken in the helps of both chemical analysis and biological test. In which young mulberry leaves had been extracted with several solvents under the usual methods and fractionated as shown in Fig. 1.

a) The attractants isolated from the fraction (E₃) :

The neutral fraction of the ether solution which was fractionated by washing with 1 % sulphuric acid and 2 % sodium carbonate in this order, and the steam distillate of this neutral fraction were powerfully attractive for silkworm larvae. The yield of an active fraction in this distillate was about 0.2 mg. per 4 kg fresh leaves. The ultraviolet absorption curve of this distillate was similar to those of terpene alcohols, and the infra-red spectra also was corresponded to those of terpinyl acetate. Further studies using gas-chromatography have given a suggestion that the citral, linalyl acetate, linalol and terpinyl acetate were involved in this final fraction.

b) Biting factors isolated from the fraction (E₂) :

The fraction (E₂), first of all, was chromatographed on silica-gel column. The yellowish green fraction passed through the column was condensed to syrup and dried up, and then the resulting residue was extracted with petroleum ether. Finally, β -sitosterol which stimulate the biting action of silkworm could be obtained in crystalline state from the petroleum solution. On the other hand, one more biting factor, isoquercitrin was isolated in crystalline state from the solution eliminated lead with H₂S in the fraction (W). It has been found independently that morin, one of flavonoids in Morus tinctoria, has shown a same result on this line. What is more, sucrose and inositol obtained from the fraction (W) have been indicated as a fraction of co-factor for the feeding behaviour in this worm.

c) Swallowing, third factor, obtained from the fraction (R) :

From the residue, insoluble in ether, methanol and water, cellulose, silicate and phosphate have been determined as the active swallowing factors, because continuous eating behaviour has not been shown on the agar jelly food without these factors even other biting factors were contained enough (Table 1).

II - On the Prepared Food.

The studies on the feeding behaviour had naturally taken me to the research of prepared food for producing cocoon. Throughout the larval stages an aseptic method has been adopted in our all studies of prepared food. It is supposed to be the best way in keeping food fresh and in protecting from the contamination of microorganism.

a) Prepared food not containing mulberry leaf powder :

It has been found that silkworm requires some unknown factor for larval moulting in the course of prepared food studies. However, it was overcome by addition of Royal jelly into the basal food as shown in Table 2. These results have then led us to find that an addition of 5 mg. acetylcholine or choline-chloride per 10 g. prepared food can be induced perfectly the larval moulting.

b) Prepared food containing mulberry leaf powder :

The prepared food, as can be seen in Table 3, containing 20 % of mulberry leaf powder has also been using on this line, and getting a stable production of cocoons by now.

c) On the cocoon and silk :

As shown in Table 4, the cocoons have been produced in a good quality by use of our present prepared food containing 20 % of mulberry leaf powder. And, a comparative study has been carried out on amino acid composition of sericin and fibroin proteins of the cocoons produced by each feeding of mulberry leaf and synthetic prepared food without any addition of mulberry leaf source. The results can be seen in Table 5. In which no major difference in amino acid ratios could be seen in relation to the food source. Then, the qualities tested in silk producing process from cocoons were just usual as compared with natural one. Further studies on this line have strongly been carrying out in our group for beautiful purpose.

REFERENCES

- HAMAMURA Y., Nature, 183, 1746 (1959).
 ----- , ibid, 190, 879 (1961).
 ----- , et al., ibid, 190, 880 (1961).
 ----- , et al., ibid 194, 754 (1962).
 ----- , et al., ibid, 194, 755 (1962).
 ----- , Mem. of Kyoto Univ. of Ind., 3, 567 (1962).
 ----- , Shizen, 18, 56 (1963)
 ----- , Kagaku to Seibutsu, I, 364 (1963).
 HAYASHIYA K., et al., Nippon Nogeikagaku Kaishi, 37, 160 (1963).
 ----- , et al., ibid, 37, 735 (1963).
 ----- , et al., Proc. Japan Acad., 40, 349 (1964).
 ----- , et al., Nature (in press)
 KATO M., et al., Proc. Japan Acad., 40, 131 (1964).
 NAITO K., et al., Nippon Nogeikagaku Kaishi, 35, 848 (1963).

Table 1. - Agar jelly food.

Citral	1 ml. (10 mg. % ether solution)
β -sitosterol	5 mg. (spray on the surface of food)
Isoquercitrin or morin	3 mg.
Cellulose powder	700 mg.
Sucrose	30 mg.
Inositol	5 mg.
Potassium phosphate	10 mg.
Silica-gel	40 mg.
2 % Agar solution	3 ml,

The attractants are not necessary by other factors for biting and swallowing are important and indispensable in practical feeding.

Table 2. - Composition of synthetic prepared food (% in dry diet)

Potato starch	15
Sucrose	10
Defatted Soy protein	20
Wesson's Salt mix.	0.9
Cellulose Powder	52
Vitamins	(0.4 mg.)
Stimulant mix. (1)	1.7
Water	(150)

(1) Stimulant mixture	
β -sitosterol	500 mg./100 g. dry diet
morin	200 mg. "
Inositol	500 mg. "
K ₂ HPO ₄	500 mg. "

Table 3. - One of prepared food containing mulberry leaf powder.

Mulberry leaf powder	15 g.
Soy bean casein	30 g.
Starch	15 g.
Cellulose	35 g.
Sucrose	10 g.
Agar-agar	2 g.
β -Sitosterol	500 mg.
Choline chloride	"
Lecithin	"
Vitamin mix.	"
Mineral mix.	"

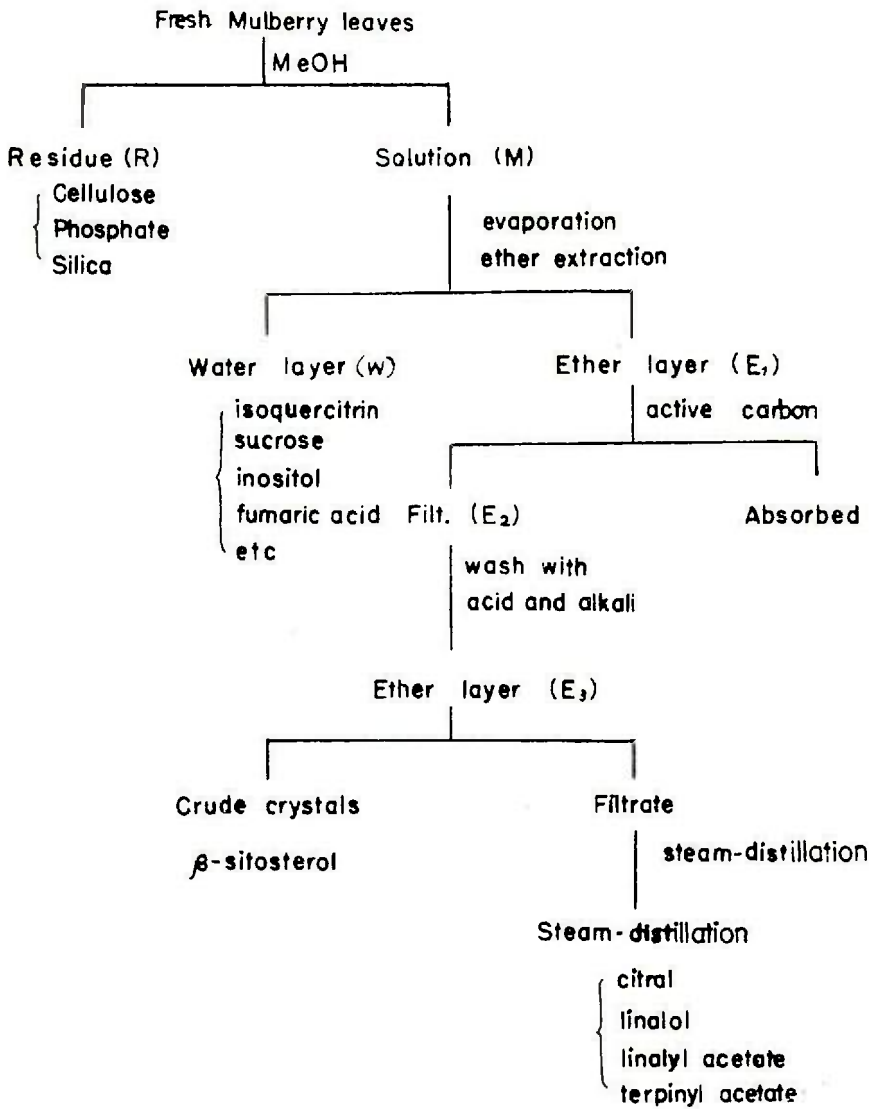
Table 4. - On the qualities of cocoons.

	With prepared food containing 20 % of mulberry leaf powder	With natural mulberry leaf
Yields of cocoons	90 %	90-95 %
Weight of a cocoon	2.1 g.	2.0-2.4 g.
Weight of a cocoon layer	410 mg.	400-500 mg.
Cocoon layer ratio (cocoon layer/whole cocoon)	19.8 %	20-23 %

Table 5. - Amino acid composition of sericin and fibroin proteins.
(μ mols per g ; ratio in brackets)

Amino acid	Sericin			Fibroin		
	Mulberry leaf	Prepared food N° 6	Prepared food N° 6 (aseptic)	Mulberry leaf	Prepared food N° 6	Prepared food N° 6 (aseptic)
gly	1119 (14.1)	999 (13.3)	820 (13.0)	5462 (43.5)	4640 (43.4)	4910 (44.2)
ala	415 (5.3)	348 (4.6)	310 (4.8)	3759 (29.9)	3250 (30.4)	3240 (29.2)
ser	2440 (30.8)	2362 (31.5)	1970 (31.4)	1352 (10.7)	1080 (10.1)	1130 (10.2)
tyr	208 (2.6)	187 (2.5)	180 (2.8)	606 (4.8)	510 (4.7)	530 (4.8)
val	221 (2.8)	202 (2.6)	170 (2.7)	268 (2.1)	210 (1.9)	230 (2.1)
NH ₃	552 (6.9)	564 (7.5)	470 (7.5)	202 (1.6)	290 (2.7)	310 (2.8)
asp	1224 (15.4)	1182 (15.8)	920 (14.6)	187 (1.5)	160 (1.5)	170 (1.5)
glu	378 (4.8)	321 (4.2)	270 (4.3)	147 (1.1)	100 (0.9)	120 (1.1)
thr	590 (7.4)	597 (7.9)	470 (7.5)	125 (0.9)	90 (0.8)	90 (0.8)
lys	238 (3.0)	200 (2.6)	200 (3.1)	99 (0.7)	70 (0.6)	80 (0.7)
phe	28 (0.3)	23 (0.3)	20 (0.3)	81 (0.6)	80 (0.7)	70 (0.6)
lleu	45 (0.5)	45 (0.6)	40 (0.6)	65 (0.5)	70 (0.6)	70 (0.6)
arg	248 (3.1)	242 (3.1)	220 (3.5)	64 (0.5)	50 (0.4)	70 (0.6)
leu	84 (1.0)	83 (1.1)	70 (1.1)	63 (0.5)	60 (0.5)	60 (0.5)
pro	47 (0.5)	47 (0.6)	60 (0.9)	40 (0.3)	+	+
his	78 (0.9)	75 (1.0)	80 (1.2)	25 (0.2)	20 (0.2)	30 (0.2)
met	+	+	+	12 (0.1)	+	+

Figure 1. - Fractionations of attractant, biting andswallowing factors.



MECANISME DE NUTRITION ET ALIMENTATION PREPAREE
DU VER A SOIE BOMBYX MORI L.

(Traduction)

par

Yasuji HAMAMURA (Japon) (1)

Pendant toute la période où j'ai travaillé au laboratoire de Biochimie, je me suis toujours demandé quelles étaient les raisons pour lesquelles les larves du Ver à Soie Bombyx mori ne se nourrissaient que de feuilles de mûrier. Et il a fallu attendre près de 20 ans pour que paraisse le premier article "sur le mécanisme de sélection de la nourriture chez le Ver à Soie". Ce texte fut publié juste avant que je ne quitte mon premier poste à la Kyoto Univ. of Ind. Cet article est un résumé des travaux qui ont été faits sur le mécanisme de sélection de la nourriture chez les larves du Ver à Soie et sur l'alimentation préparée, travaux que je poursuis au second poste que j'occupe à l'Université Konan.

I - Le Mécanisme de Sélection de la Nourriture opérée par les Larves du Ver à Soie.

Nous avons constaté que le processus de nutrition du Ver à Soie comporte 3 stades. A chacun de ces stades correspond un stimulant. Le premier, qui attire les larves vers les feuilles de mûrier existe dans la fraction soluble d'éthanol froid. Le second, qui stimule la prise de nourriture, est extrait de la fraction soluble de méthanol chaud du résidu de l'extrait d'éthanol. Et le troisième, qui est capable de stimuler chez les larves une ingestion continue a été découvert dans le résidu insoluble dans le méthanol.

(1) Yasuji HAMAMURA, Section Biologie, Université Konan, Kobé.

La combinaison de ces fractions pouvait parfaitement être obtenue dans la gélose et les larves du Ver à Soie mangeaient de façon continue. Ces trois stimulants furent alors appelés provisoirement et respectivement : facteurs d'attractivité, de prise de nourriture et d'ingestion. Ceci constituait la première observation étudiée bio-chimiquement sur le comportement des larves de Ver à Soie vis-à-vis de leur nourriture.

Nous avons entrepris d'isoler ces facteurs des feuilles de mûrier au moyen de l'analyse chimique et du test biologique. Dans ces expériences nous avons extrait de jeunes feuilles de mûrier avec plusieurs solvants selon les méthodes habituelles et nous les avons fractionnées comme le montre la Figure 1.

a) Facteurs d'attractivité isolés de la fraction (E₃) :

La fraction neutre de la solution d'éther qui fut fractionnée par lavages avec 1 % d'acide sulfurique et 2 % de carbonate de soude, lavages faits dans cet ordre, et le produit de distillation à la vapeur de cette fraction neutre étaient très attractifs pour les larves du Ver à Soie. Le rendement d'une fraction active dans ce distillat était d'environ 0,2 mg. pour 4 kg. de feuilles fraîches. La courbe d'absorption de rayons ultra-violet de ce distillat était identique à celles des alcools terpènes, et le spectre des infra-rouges correspondait également à celui de l'acétate de terpine. Des études plus poussées faites à l'aide de la chromatographie gazeuse ont donné à penser que le citral, l'acétate de linalol, le linalol et l'acétate de terpine faisaient partie de cette fraction finale.

b) Facteurs de prise de nourriture isolés de la fraction (E₂) :

La fraction (E₂) fut tout d'abord chromatographiée sur colonne de gel de silice. La fraction de couleur vert-jaunâtre qui traversa la colonne fut condensée sous forme de sirop et séchée, puis le résidu obtenu fut extrait avec de l'éther de pétrole. Finalement, il a été possible d'obtenir de la solution de pétrole, et sous forme cristalline du β -sitostérol qui stimule la prise de nourriture. D'autre part, l'isoquercitrine, autre facteur de la prise de nourriture, a été isolée sous forme cristalline de la solution éliminée avec H₂S dans la fraction (W). Il a été constaté, indépendamment de cette expérience, que la morine, un des flavonoïdes du *Morus tinctoria*, fournissait un résultat identique. Qui plus est, le sucrose et l'inositol obtenus de la fraction (W) ont été signalés comme étant une fraction de co-facteur dans le comportement nutritionnel du Ver à Soie.

c) Ingestion, 3ème facteur, obtenu de la fraction (R) :

Du résidu insoluble dans l'éther, le méthanol et l'eau, la cellulose, le silicate et le phosphate ont été déterminés comme étant des facteurs actifs de l'ingestion. En effet, le fait de manger continuellement ne s'est pas manifesté pour la gélose sans que ces facteurs et même d'autres facteurs de prise de nourriture ne soient présents en quantité suffisante (Tableau 1).

II - L'Alimentation Préparée.

Ces études sur le comportement nutritionnel devaient naturellement me pousser à faire des recherches sur l'alimentation préparée en vue de la production de cocons. Dans toutes nos études sur l'alimentation préparée nous avons adopté la méthode aseptique à tous les stades larvaires. Cette méthode est supposée être la meilleure pour conserver la nourriture fraîche et pour la protéger contre la contamination des micro-organismes.

a) Nourriture préparée ne contenant pas de poudre de feuille de mûrier.

Nous avons constaté lors de nos études sur la nourriture préparée que le Ver à Soie exigeait un certain facteur inconnu pour que se produisent les mues. Ce problème a toutefois été résolu en ajoutant de la gelée Royale à la nourriture de base, comme le montre le Tableau 2. Ces résultats nous ont alors amené à constater qu'en ajoutant 5 mg. d'acétylcholine ou de chlorure de choline dans 10 g. de nourriture préparée on peut parfaitement provoquer les mues.

b) Nourriture préparée contenant de la poudre de feuille de mûrier.

Comme le montre le Tableau 3, nous avons également utilisé de la nourriture préparée contenant 20 % de poudre de feuille de mûrier, et elle donne à présent une production de cocons qui est stable.

c) Le Cocon et la Soie.

Comme le montre le Tableau 4, nous avons obtenu des cocons de bonne qualité en utilisant la nourriture préparée dont nous disposons à présent, et qui contient 20% de poudre de feuille de mûrier. Et nous avons procédé à la comparaison du contenu en acides aminés des protéines de la séricine et de la fibroïne des cocons obtenus avec chacune de ces nourritures : avec 20 % de feuilles de mûrier ou sans feuilles. Le Tableau 5 présente les résultats obtenus, et ces résultats ne font apparaître aucune différence importante des rapports amino-acides

en fonction de la nourriture utilisée. Ensuite, les qualités contrôlées lors du processus de production de la Soie à partir des cocons étaient tout à fait normales par rapport aux qualités naturelles. Des recherches plus approfondies dans ce domaine sont faites par notre groupe en vue d'aboutir à un résultat parfait.

REFERENCES

(Voir texte anglais : original).

Tableau 1. - Nourriture avec gélose.

Citral	1 ml. (solution d'éther 10 mg. %)
β -sitostérol	5 mg. (vaporisé sur la surface de la nourriture)
Isoquercitrine ou morine	3 mg.
Poudre de cellulose	700 mg.
Saccharose	30 mg.
Inositol	5 mg.
Phosphate de potassium	10 mg.
Gel de silice	40 mg.

Solution de gélose 2 %	3 ml.

Les produits attractifs ne sont pas nécessaires, mais d'autres facteurs pour la prise de nourriture et l'ingestion sont importants et indispensables pour une alimentation pratique.

Tableau 2. - Composition de la nourriture préparée synthétique
(%) en nourriture sèche).

Amidon de pomme de terre	15
Saccharose	10
Protéine de soja délipidée	20
Mélange de sel de Wesson	0,9
Poudre de cellulose	52
Vitamines	(0,4 mg.)
Mélange stimulant (1)	1,7
Eau	(150)

(1) Mélange stimulant :	
β -sitostérol	500 mg. /100 g. de nourriture sèche
Morine	200 mg. _____ id _____
Inositol	500 mg. _____ id _____
K_2HPO_4	500 mg. _____ id _____

Tableau 3. - Alimentation préparée contenant de la poudre de feuille
de mûrier.

Poudre de feuille de mûrier	15 g.
Caséine de soja	30 g.
Amidon	15 g.
Cellulose	35 g.
Saccharose	10 g.
Agar-agar	2 g.
β -sitostérol	500 g.
Chlorure de choline	"
Lécithine	"
Mélange de vitamines	"
Mélange minéral	"

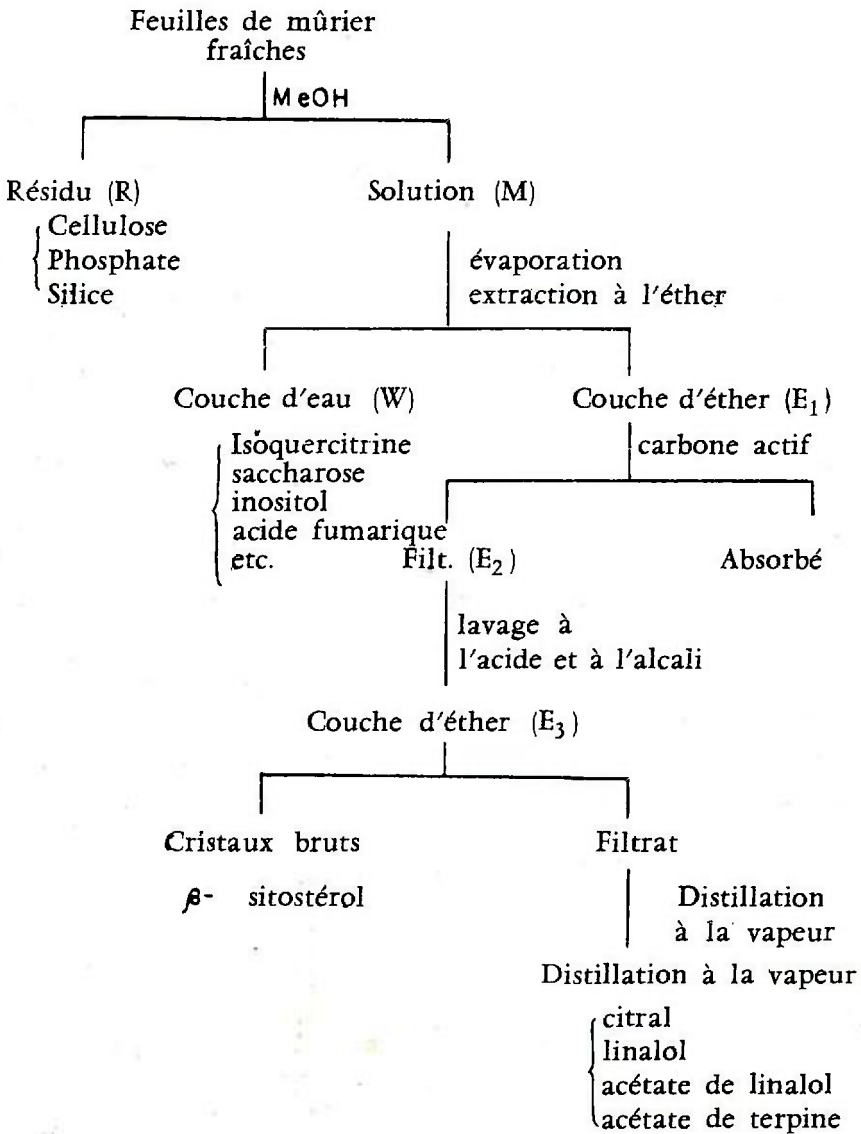
Tableau 4. - Qualité des cocons.

	Avec une nourriture préparée contenant 20 % de poudre de feuille de mûrier	Avec des feuil- les de mûrier naturelles
Rendements de cocons	90 %	90-95 %
Poids d'un cocon	2,1 g.	2,0-2,4 g.
Poids de la coque d'un cocon	410 mg.	400-500 mg.
Rapport coque cocon (coque du cocon/cocon entier)	19,8 %	20-23 %

Tableau 5. - Composition en acides animés des protéines de la séricine et de la fibroïne (μ moles par g : rapport entre parenthèses).

Amino acid	Sericin			Fibroin		
	Mulberry leaf	Prepared food N° 6	Prepared food N° 6 (aseptic)	Mulberry leaf	Prepared food N° 6	Prepared food N° 6 (aseptic)
gly	1119 (14.1)	999 (13.3)	820 (13.0)	5462 (43.5)	4640 (43.4)	4910 (44.2)
ala	415 (5.3)	348 (4.6)	310 (4.8)	3759 (29.9)	3250 (30.4)	3240 (29.2)
ser	2440 (30.8)	2362 (31.5)	1970 (31.4)	1352 (10.7)	1080 (10.1)	1130 (10.2)
tyr	208 (2.6)	187 (2.5)	180 (2.8)	606 (4.8)	510 (4.7)	530 (4.8)
val	221 (2.8)	202 (2.6)	170 (2.7)	268 (2.1)	210 (1.9)	230 (2.1)
NH ₃	552 (6.9)	564 (7.5)	470 (7.5)	202 (1.6)	290 (2.7)	310 (2.8)
asp	1224 (15.4)	1182 (15.8)	920 (14.6)	187 (1.5)	160 (1.5)	170 (1.5)
glu	378 (4.8)	321 (4.2)	270 (4.3)	147 (1.1)	100 (0.9)	120 (1.1)
thr	590 (7.4)	597 (7.9)	470 (7.5)	125 (0.9)	90 (0.8)	90 (0.8)
lys	238 (3.0)	200 (2.6)	200 (3.1)	99 (0.7)	70 (0.6)	80 (0.7)
phe	28 (0.3)	23 (0.3)	20 (0.3)	81 (0.6)	80 (0.7)	70 (0.6)
lleu	45 (0.5)	45 (0.6)	40 (0.6)	65 (0.5)	70 (0.6)	70 (0.6)
arg	248 (3.1)	242 (3.1)	220 (3.5)	64 (0.5)	50 (0.4)	70 (0.6)
leu	84 (1.0)	83 (1.1)	70 (1.1)	63 (0.5)	60 (0.5)	60 (0.5)
pro	47 (0.5)	47 (0.6)	60 (0.9)	40 (0.3)	+	+
his	78 (0.9)	75 (1.0)	80 (1.2)	25 (0.2)	20 (0.2)	30 (0.2)
met	+	+	+	12 (0.1)	+	+

Figure 1. - Fractionnements des facteurs d'attractivité, de prise de nourriture et d'ingestion.



SUPPLEMENTARY REPORT ON CHOLINE DERIVATIVES AS
A GROWTH FACTOR IN EARLY DEVELOPMENT
OF THE SILKWORM (x)

(Original)

by

Keizo HAYASHIYA and Jun NISHIDA (Japan) (1)

As previously the authors reported (1), acetylcholine is required in the diet of silkworm larvae for normal moulting to occur. On a semi-synthetic diet (diet 4) composed of pure substances described in Table 1, the newly hatched larvae die after surviving for about 14 days without further moult. In tests utilizing twenty larvae each, it was found that the diet containing mulberry leaves (diet 1) (2) yielded 100 % successful moult to second instar with a larval weight of 5.4 mg. each; the diet with defatted soybean (3, 4) and no other important adjuvants (diet 2) yielded 80 % moult weighing 4.50 mg. ; the diet with royal jelly (5) (diet 3) yielded 100 % moult weighing 5.85 mg. ; the diet without adjuvants (diet 4) yielded no moult ; the diet with royal jelly (diet 5) yielded 70 % moult weighing 4.8 mg. and the diet with acetylcholine (diet 6) yielded 80 % moult weighing 4.0 mg. From these results one observes that royal jelly increases moulting and larval weight. Royal jelly contains large amounts of acetylcholine (6, 7). A water soluble

(1) Keizo HAYASHIYA and Jun NISHIDA, Biochemical Laboratory, Faculty of Textiles Fibers, Kyoto University of Industrial Arts and Textile Fibers, Daishogun, Kyoto.

(x) This article is to be recognized as Studies on prepared food for silkworm, Bombyx mori, N° 13.

low molecular weight dialyzable fraction of royal jelly also provided similar growth stimulation. Two authors, therefore, added acetylcholine to the diet (8) expecting the same results found with royal jelly (diet 6). As described above, acetylcholine may replace royal jelly in stimulating moulting of the larvae.

Diet 4 contains 2000 γ of choline chloride. If the effect of acetylcholine is replaced with that of choline, some question may occur on the stimulation of larval moulting by choline whether as the source of acetylcholine or as that of methyl group. Thus, diets N° 7 - N° 17 were prepared. The diet containing 5000 γ acetylcholine (diet 8) yielded 80 % moulting. The threshold moulting response is between 4000 γ and 5000 γ . Choline chloride yielded same effect as that of acetylcholine. The larvae require more than 4000 γ per 10 g. diet for optimal growth, which is corresponding to 5000 γ of acetylcholine in molecular ratio. The diets (N° 10-17) yielded no moult. Namely, betaine, glycine, methionine, cystine, taurine, ethanol amine, serine gave negative effect for the stimulation of larval moulting. Carnitine chloride which was found as a vitamine for larval growth of Tenebrio molitor by Dr. G. Fraenkel (9) did also no moult. From these observations the authors should point out that choline as well as acetylcholine give a stimulating effect on the larval moulting and members concerning to transmethylation in vivo were not always required for this purpose. Thus, choline may be signified as a source of acetylcholine. The enzymatic studies on the activities of cholinesterase and cholinacetylase during larval growth are now going on by present authors and will be published soon. We wish to express our thanks to Dr. Y. Hamamura for his support and advice.

LITERATURE CITED

- (1) K. HAYASHIYA, M. KATO, Y. HAMAMURA - Nature, in press.
 - (2) T. FUKUDA, M. SUTO, Y. HIGUCHI - Nature 187, 669-670 (1960)
 - (3) T. ITO - J. Sericult. Sci. Japan (Nippon Sanshigaku Zasshi) 31, 1-6 (1962).
 - (4) K. HAYASHIYA, K. NAITO, K. MATSUURA, J. NISHIDA, Y. HAMAMURA - J. Agricult. Soc. Japan (Nippon Nogeikagaku Zasshi) 37, 160-2 (1963).
 - (5) T. ITO - J. Jap. Soc. Food and Nutrition (Eiyo to Syokuryo) 14, 1-4 (1961).
 - (6) D. HENSCHER - Naturwissenschaften 6, 41 (1954).
 - (7) T. WATANABE - J. Pharm. Soc. Japan (Yakugaku Zasshi) 75, 86 (1955).
 - (8) Y. HAMAMURA, K. HAYASHIYA, K. NAITO - Nature 190, 879-881 (1961).
 - (9) H. E. CARTER, P. K. BHATTACHARYYA, K. R. WEIDMAN , G. FRAENKEL - Arch. Biochem. Biophys. 38, 405 (1952).
-

Table 1. - Composition of prepared foods.

	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5	N° 6
Cellulose powder	3.0 g.	5.0 g.	5.0 g.	5.5 g.	5.5 g.	5.5 g.
DIFCO Casein purified	0	0	0	1.0	1.0	1.0
Soybean defatted	2.0	2.0	2.0	0	0	0
Starch	1.5	1.5	1.5	2.0	2.0	2.0
Sucrose	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Minerals (Wesson's)	90 mg.	90 mg.	90 mg.	90 mg.	90 mg.	90 mg.
Vitamines (x)	40 mg.	40 mg.	40 mg.	40 mg.	40 mg.	40 mg.
Stimulators (xx)	170 mg.	170 mg.	170 mg.	170 mg.	170 mg.	170 mg.
Mulberry powder	2.0 g.	0	0	0	0	0
Royal jelly	0	0	1.5 g.	0	1.5 g.	0
Acetylcholine	0	0	0	0	0	5 mg.
Water	15 cc.	15 cc.	15 cc.	15 cc.	15 cc.	15 cc.

(x) A vitamin mixture composed of the following at the designated concentration in mg./10 g. of diet : biotin 0.02, Ca-pantothenate 0.2, choline chloride 2.0, folic acid 0.02, niacine amide 0.2, VB₆ HCl 0.1, VB₂ (F MN-Na) 0.1, VB₁ HCl 0.1, VB₁ 0.1 and VC 37.16.

(xx) As previously pointed out by the authors and co-workers (8), the following compounds (especially the first) greatly stimulate the feeding reaction. The rates are identical to those listed for vitamins : β -sitos-terol 50, morin 20, inositol 50, and K₂HPO₄ 50.

Table 2. - Composition of prepared foods.

Diets No.	Composition
No. 7	control excepting choline chloride from diet 4
No. 8	No. 7 plus Acetylcholine chloride
No. 9	No. 7 plus Choline chloride
No. 10	No. 7 plus Betaine
No. 11	No. 7 plus Glycine
No. 12	No. 7 plus Methionine
No. 13	No. 7 plus Cystine
No. 14	No. 7 plus Taurine
No. 15	No. 7 plus Ethanol amine chloride
No. 16	No. 7 plus Serine
No. 17	No. 7 plus Carnitine chloride

Table 3. - Growth of the larvae reared on prepared foods.

Diets	mg. of test chemicals	numbers of larvae reared	numbers of larvae reached to the 2nd instar	days taken to the 2nd instar
No. 7	0	20	0	
No. 8	2	20	0	
	5	20	16	6-8 days
	7	20	19	6-8 days
No. 9	1.5	20	0	
	4	20	17	6-9 days
	7	20	13	7-9 days
No. 10	3	20	0	
	6	20	0	
No. 11	2	20	0	
	4	20	0	
No. 12	4.1	20	0	
	12.3	20	0	
No. 13	6.6	20	0	
	19.8	20	0	
No. 14	3.7	20	0	
	10.5	20	0	
No. 15	0.7	20	0	
	1.7	20	0	
No. 16	3	20	0	
	9	20	0	
No. 17	4	20	0	
	8	20	0	

RAPPORT COMPLEMENTAIRE SUR LES DERIVES DE LA
 CHOLINE EN TANT QUE FACTEURS DE CROISSANCE AU
 DEBUT DU DEVELOPPEMENT DU VER A SOIE (x)

(Traduction)

par

Keizo HAYASHIYA et Jun NISHIDA (Japon) (1)

Comme l'ont signalé antérieurement les auteurs de cet article (1), l'acétylcholine est nécessaire dans l'alimentation des larves du Ver à Soie pour que les mues se produisent normalement. Avec une alimentation semi-synthétique (alimentation 4) composée des substances pures mentionnées dans le Tableau 1, les larves nouvellement écloses mourraient au bout de 14 jours environ, sans que ne se produisent de mues. Lors des expériences faites en utilisant 20 larves à chaque fois, nous avons constaté que la nourriture contenant des feuilles de mûrier (alimentation 1) (2) avait un rendement de 100 % de mues réussies pour le 2ème âge avec des larves d'un poids de 5,4 mg. La nourriture contenant du soja délipidé (3) (4) et aucun autre adjuvant important (alimentation 2) avait un rendement de 80 % de mues, et le poids des larves était de 4,50 mg. La nourriture contenant de la gelée royale (5) (alimentation 3) avait un rendement de 100 % de mues, et le poids des larves était de 5,85 mg. La nourriture contenant des adjuvants (alimentation 4) ne fournissait aucune mue. La nourriture contenant de la gelée royale (alimentation 5) avait un rendement de 70 % de mues, et le poids

(1) Keizo HAYASHIYA et Jun NISHIDA, Laboratoire de Biochimie, Faculté des Fibres Textiles, Université de Kyoto des Arts Industriels et Fibres Textiles, Daishogun, Kyoto.

(x) Cet article doit être considéré comme le N° 13 des Etudes sur l'alimentation préparée du Ver à Soie Bombyx mori.

des larves était de 4,8 mg. La nourriture contenant de l'acétylcholine (alimentation 6) avait un rendement de 80 % de mues, et le poids des larves était de 4,0 mg. Ces résultats montrent que la gelée royale augmente les mues et le poids des larves. La gelée royale contient d'importantes quantités d'acétylcholine (6) (7). On obtenait une stimulation identique de la croissance avec une fraction de gelée royale dialysable soluble dans l'eau et à faible poids moléculaire. Deux auteurs ont donc ajouté de l'acétylcholine à la nourriture (8) dans l'espoir d'obtenir les mêmes résultats que ceux enregistrés avec la gelée royale (alimentation 6). Comme nous l'avons indiqué plus haut, l'acétylcholine peut remplacer la gelée royale pour stimuler les mues des larves.

L'alimentation 4 contient 2.000 γ de chlorure de choline. Si l'effet de l'acétylcholine est remplacé par celui de la choline, la question peut se poser au sujet de la stimulation par la choline des mues des larves, de savoir qui de l'acétylcholine ou du groupement méthyl en est à l'origine. Nous avons donc préparé les alimentations N° 7 -- N° 17. La nourriture contenant 5.000 γ d'acétylcholine (alimentation 8) avait un rendement de 80 % de mues. La réaction limitée de mues est comprise entre 4.000 γ et 5.000 γ . Le chlorure de choline produisait le même effet que l'acétylcholine. Les larves ont besoin, pour une croissance optimum, de plus de 4.000 γ par 10 g. de nourriture, ce qui correspond à 5.000 γ d'acétylcholine en fonction du rapport moléculaire. Nous n'avons obtenu aucune mue avec les nourritures N° 10-17). C'est-à-dire que la bétaine, la glycine, la méthionine, la cystine, la taurine, l'éthanolamine et la sérine avaient un effet négatif sur la stimulation des mues des larves. Nous n'avons non plus obtenu aucune mue avec le chlorure de carnitine qui, selon les observations faites par le Dr. G. Fraenkel (9), constituait une vitamine pour la croissance des larves de Tenebrio molitor. Partant de ces constatations, les auteurs font ressortir que la choline aussi bien que l'acétylcholine exercent un effet stimulant sur la mue des larves, et les groupements concernant la transméthylation in vivo n'étaient pas toujours nécessaires pour cela. Ainsi donc, la choline peut être considérée comme une source d'acétylcholine. Les auteurs de cet article procèdent actuellement à des études enzymatiques sur l'action de la cholinestérase et de la cholinacétylase pendant la croissance des larves, et leurs travaux seront publiés prochainement. Nous remercions le Dr. Y. Hamamura de son aide et de ses conseils.

REFERENCES

(Voir texte anglais original).

Tableau 1. - Composition des alimentations préparées.

	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5	N° 6
Poudre de cellulose	3,0 g.	5,0 g.	5,0 g.	5,5 g.	5,5 g.	5,5 g.
Caséine purifiée DIFCO	0	0	0	1,0	1,0	1,0
Soja dégraissé	2,0	2,0	2,0	0	0	0
Amidon	1,5	1,5	1,5	2,0	2,0	2,0
Saccharose	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Minéraux (Wesson)	90 mg.	90 mg.	90 mg.	90 mg.	90 mg.	90 mg.
Vitamines (x)	40 mg.	40 mg.	40 mg.	40 mg.	40 mg.	40 mg.
Stimulants (xx)	170 mg.	170 mg.	170 mg.	170 mg.	170 mg.	170 mg.
Poudre de mûrier	2,0 g.	0	0	0	0	0
Gelée royale	0	0	1,5 g.	0	1,5 g.	0
Acétylcholine	0	0	0	0	0	5 mg.
Eau	15 cc.	15 cc.	15 cc.	15 cc.	15 cc.	15 cc.

(x) Mélange de vitamines composé des éléments suivants et aux taux de concentration indiqués en mg./10 g. de nourriture : biotine 0,02, Ca-pantothénate 0,2, chlorure de choline 2,0, acide folique 0,02, amide de niacine 0,2, VB₆-HCl 0,1, VB₂ (FMN-Na) 0,1, VB₁-HCl 0,1, VB₁ 0,1, VC 37,16.

(xx) Comme l'ont déjà signalé les auteurs de cet article et leurs collaborateurs (8), les composés suivants (et surtout le premier d'entre eux) stimulent de façon importante la réaction de nutrition. Les taux sont identiques à ceux indiqués pour les vitamines : β -sitostérol 50, morine 20, inositol 50, K₂HPO₄ 50.

Tableau 2. - Composition des alimentations préparées.

N° des alimentations	Composition
N° 7	Alimentation témoin à l'exception du chlorure de choline de l'Alimentation 4.
N° 8	N° 7, plus Chlorure d'Acétylcholine
N° 9	N° 7, plus Chlorure de Choline
N° 10	N° 7, plus Bétaïne
N° 11	N° 7, plus Glycine
N° 12	N° 7, plus Méthionine
N° 13	N° 7, plus Cystine
N° 14	N° 7, plus Taurine
N° 15	N° 7, plus Chlorure d'éthanolamine
N° 16	N° 7, plus Sérine
N° 17	N° 7, plus chlorure de Carnitine

Tableau 3. - Croissance des larves élevées avec les alimentations préparées.

Alimentations	mg. de produits chimiques d'essai	Nombre de larves élevées	Nombre de larves ayant atteint le 2ème âge	Nombre de jours pour atteindre le 2ème âge
N° 7	0	20	0	
N° 8	2	20	0	
	5	20	16	6-8 jours
	7	20	19	6-8 jours
N° 9	1,5	20	0	
	4	20	17	6-9 jours
	7	20	13	
N° 10	3	20	0	
	6	20	0	
N° 11	2	20	0	
	4	20	0	
N° 12	4,1	20	0	
	12,3	20	0	
N° 13	6,6	20	0	
	19,8	20	0	
N° 14	3,7	20	0	
	10,5	20	0	
N° 15	0,7	20	0	
	1,7	20	0	
N° 16	3	20	0	
	9	20	0	
N° 17	4	20	0	
	8	20	0	

NUTRITIONAL REQUIREMENTS AND ARTIFICIAL DIETS FOR
THE SILKWORM, BOMBYX MORI L.

(Original)

by

Toshio ITO (Japan) (1)

The success of rearing of the larvae of the silkworm entirely on artificial diets has been reported in 1960 independently by Fukuda et al., Ito et al., and Yoshida et al. The diets used in these reports were composed of fairly common substances, such as powdered mulberry leaf, soybean meal, potato starch, sugar, and so on. The results were rather unsatisfactory as expected by a high mortality of larvae and the production of small cocoons, but the possibility of rearing silkworm larvae independent of fresh mulberry leaves was established.

Subsequently, a series of experiments have been started in order to determine which natural ingredients could be replaced with chemical compounds. When soybean meal, defatted with ethyl ether, was used in place of non-treated meal, the growth of the silkworm became impossible, whereas the inclusion of soybean oil resumed the larval growth (Ito, 1960a, b, 1961). This result indicates that the larva requires some component(s) of the oil for its normal growth. This was the first example showing that the artificial diet could satisfactory be used for analysis of the nutritional requirements of the silkworm, a unique leaf-feeding insect. Since then, a large number of the indispensable nutrients have been clarified covering carbohydrates, amino acids, proteins, vitamins, lipids, minerals, and so on. In these experiments chemically defined diets as well as an aseptic method of larval rearing have occasionally been used (Ito and Horie, 1962).

(1) Toshio ITO, The Sericultural Experiment Station, Tokyo.

Previously, it has been reported that the larva of the silkworm requires at least three B vitamins, Ca-pantothenate, nicotinic acid, and pyridoxine-HCl, for its growth and survival (Horie and Ito, 1963). Recently, the effects of varying concentrations of these three vitamins on larval growth and survival were tested, and the results obtained will be reported in the present preliminary note.

The composition of synthetic diet used is given in Table 1. The diet contained morin and feeding stimulants separated from mulberry leaves (Horie, 1962) in order to make diets more palatable. Each of the diets either lacked one of the vitamins listed in Table 2, or contained varying amount of one of the three vitamins mentioned above. The results are summarized in Table 3. The concentration of vitamins listed in Table 3 is considered to be rather minimum threshold, however, no appreciable effect of the improvement of diet efficiency was observed even at a higher concentration. The higher concentration was sometimes rather detrimental. It is interesting that the proper concentrations of added vitamins fall into the ranges reported for the fresh mulberry leaves (Kirimura *et al.*, 1962).

Knowledge of the results of these fundamental research on qualitative and quantitative requirements for nutrients has so far contributed to the formulation of artificial diets even in the practical application. When the diet contains approximately 50 % mulberry leaf powder with other ingredients, it is rather easy, at present, to raise larvae in the laboratory all around year, and it is hardly possible to find out the difference in the food value between artificial diet and mulberry leaf.

Table 4 shows the comparison between 1961 and 1964 with reference to the quality of cocoon obtained on artificial diet, and it should be noted that 1964 cocoons are of natural size.

Further investigations on the artificial diet for the silkworm are necessary at least in two respects ; (i) to elucidate the details of nutritional requirements especially in relation to cocoon production, and (ii) to improve the efficiency of artificial diets including those not containing mulberry leaf powder at all (synthetic diet).

LITERATURE

- FUKUDA T., M. SUTO, and Y. HIGUCHI (1960), Silkworm raising on the artificial food. - J. Seric. Sci. Japan, 29, 1-3.
- HORIE Y. (1962), Effects of various fractions of mulberry leaves on the feeding of the silkworm, Bombyx mori L. *ibid.*, 31, 258-264.
- HORIE Y. and T. ITO (1963), Vitamin requirements of the silkworm. - Nature, 197, 98-99.
- ITO T. (1960a), A preliminary note on the nutritive value of soybean oil for the silkworm, Bombyx mori. - Proc. Japan Acad., 36, 287-290.
- ITO T. (1960b), An artificial diet for the silkworm, Bombyx mori, and the effect of soybean oil on its growth. - Proc. 11th Internat. Congr. Ent., 3, 157-162.
- ITO T. (1961), Nutrition of the silkworm, Bombyx mori. I. Nutritive effects of soybean oil for the larva. - Bull. Seric. Exp. Sta., 16, 311-348.
- ITO T. and Y. HORIE (1962), Nutrition of the silkworm, Bombyx mori. VII. An aseptic culture of larvae on semi-synthetic diets. - J. Insect Physiol., 8, 569-578.
- ITO T. and M. TANAKA (1960), Rearing of the silkworm on an artificial diet and the segregation of pentamolters. - J. Seric. Sci. Japan 29, 191-196.
- KIRIMURA J., T. SUZUKI, and Y. HASHIMOTO (1962), The vitamin B-complex content of mulberry leaves. - Bull. Seric. Exp. Sta., 17, 545-557.
- YOSHIDA T., M. MATSUOKA, and K. KIMURA (1960), On the rearing of silkworm larvae with an artificial diet containing dried mulberry leaf powder as its basic material. *ibid.*, 15, 543-586.

Table 1. - Composition of basal diet.

Substance	Dry diet (%)
Potato starch	18.0
Glucose	18.0
Defatted soybean meal	18.0
β -Sitosterol	0.3
Soybean oil	4.0
Ascorbic acid	2.0
Wesson's salt mixture	4.0
Cellulose powder	34.9
Morin	0.3
Feeding stimulants (1)	0.5
Total	100.0
Vitamin B mixture	Added
Distilled water per g of dry diet	1.5 (ml)

(1) Feeding stimulants were separated from mulberry leaves.

Table 2. - Composition of vitamin mixture.

Vitamin	Amount added to g dry diet (μ g)
Biotin	2
Calcium pantothenate	150
Choline chloride	1500
Folic acid	2
Inositol	200
Nicotinic acid	100
Pyridoxine hydrochloride	30
Riboflavin	20
Thiamine hydrochloride	20

Table 3. - The concentration of added vitamins which are necessary for normal growth.

Vitamin	Minimum concentration
Calcium pantothenate	$1 \times 10^{-5}M$
Nicotinic acid	$1 \times 10^{-5}M$
Pyridoxine hydrochloride	$1 \times 10^{-6}M$

Table 4.-The quality of cocoons obtained on artificial diets.

		Weight of a cocoon	Cocoon shell weight
1961	Male	1.15 grams	0.205 grams
	Female	1.37	0.212
1964	Male	1.73	0.374
	Female	2.28	0.423

BESOINS NUTRITIFS ET ALIMENTATIONS ARTIFICIELLES
DU VER A SOIE BOMBYX MORI L.

(Traduction)

par

Toshio ITO (Japon) (1)

Le fait d'avoir réussi à élever des larves de Ver à Soie exclusivement avec des alimentations artificielles a été signalé en 1960, séparément, par Fukuda et coll., Ito et coll. et Yoshida et coll. Les alimentations décrites dans ces différents rapports étaient composées de substances assez ordinaires : poudre de feuille de mûrier, poudre de soja, amidon de pommes de terre, sucre, etc... Les résultats obtenus alors étaient assez médiocres du fait qu'on enregistrait une mortalité importante des larves, et qu'on obtenait de petits cocons, mais la possibilité d'élever des larves de Ver à Soie sans feuilles de mûrier fraîches était établie.

Par la suite, toute une série d'expériences ont été faites en vue de déterminer les ingrédients naturels qui pourraient être remplacés par des composés chimiques. Lorsqu'on substituait de la poudre de soja délipidée avec de l'éther éthylique à la poudre de soja non traitée, la croissance du Ver à Soie devenait impossible, et la croissance larvaire reprenait si l'on rajoutait de l'huile de soja. (Ito, 1960 a, b, 1961). Ce résultat indique que les larves ont besoin pour une croissance normale de certain(s) composant(s) de l'huile. Ce fut le premier exemple qui montra que l'on pouvait utiliser de façon satisfaisante l'alimentation artificielle pour analyser les besoins nutritifs du Ver à Soie, insecte se nourrissant uniquement de feuilles. Depuis lors, la

(1) Toshio ITO, Station Expérimentale Séricicole, Tokio.

lumière a été faite sur un grand nombre de substances nutritives indispensables : hydrates de carbone, acides aminés, protéines, vitamines, lipides, etc... Dans ces expériences, des alimentations chimiquement déterminées et une méthode aseptique d'élevage des larves ont été occasionnellement utilisées (Ito et Horie, 1962).

Il a été antérieurement signalé que les larves du Ver à Soie ont besoin pour se développer et survivre d'au moins trois vitamines B : le ca-pantothénate, l'acide nicotinique et la pyroxidine-HCl. (Horie et Ito, 1963). Récemment, les effets exercés par des concentrations différentes de ces trois vitamines sur la croissance et la survie des larves ont été étudiées, et les résultats obtenus feront l'objet de la présente note préliminaire.

La composition de l'alimentation synthétique utilisée est présentée dans le Tableau 1. Cette alimentation contenait de la morine et des substances stimulant la nutrition extraites des feuilles de mûrier (Horie, 1962) de façon à rendre ces alimentations plus agréables au goût. Chacune des alimentations ainsi préparées soit ne contenait pas l'une des vitamines figurant au Tableau 2, soit contenait des quantités différentes de l'une des trois vitamines mentionnées plus haut. Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 3. Les concentrations de vitamines indiquées au Tableau 3 sont considérées comme des seuils plutôt minima. Toutefois, même avec des concentrations plus importantes, nous n'avons pas constaté d'amélioration sensible de l'efficacité de l'alimentation. Des concentrations plus importantes exerçaient même parfois un effet préjudiciable. Il est intéressant de noter que les concentrations appropriées des vitamines ajoutées tombent dans les limites signalées pour les feuilles de mûrier fraîches (Kirimura et coll., 1962).

La connaissance des résultats fournis par ces expériences fondamentales sur les besoins qualitatifs et quantitatifs en substances nutritives a permis jusqu'à présent de mettre au point des alimentations artificielles qui ont même été utilisées dans la pratique. Lorsque l'alimentation contient approximativement 50 % de poudre de feuille de mûrier associée à d'autres ingrédients, il est relativement facile à l'heure actuelle, d'élever des larves en laboratoire pendant toute l'année, et il n'est guère possible de découvrir la différence qui existe entre la valeur nutritive de l'alimentation artificielle et celle de la feuille de mûrier. La Tableau 4 présente une comparaison établie entre 1961 et 1964 par rapport à la qualité du cocon obtenu avec une alimentation artificielle, et il convient de remarquer que les cocons de 1964 ont une

taille normale.

Il est nécessaire de poursuivre les recherches sur l'alimentation artificielle du Ver à Soie au moins pour les deux raisons suivantes :

a) Eclaircir les détails des besoins nutritifs, particulièrement en ce qui concerne la production des cocons,

b) Accroître l'efficacité des alimentations artificielles, y compris celles qui ne contiennent pas du tout de poudre de feuille de mûrier (alimentation synthétique).

BIBLIOGRAPHIE

(Voir texte anglais : original).

Tableau 1. - Composition de l'alimentation de base.

Substance	Alimentation sèche (%)
Amidon de pommes de terre	18,0
Glucose	18,0
Poudre de soja délipidée	18,0
β -Sitostérol	0,3
Huile de soja	4,0
Acide ascorbique	2,0
Mélange de sel de Wesson	4,0
Poudre de cellulose	34,9
Morine	0,3
Substances stimulant la nutrition (1)	0,5
Total	100,0
Mélange de vitamines B	Ajouté
Eau distillée par g. d'alimentation sèche	1,5 (ml)

(1) Les substances stimulant la nutrition furent extraites des feuilles de mûrier.

Tableau 2. - Composition du mélange de vitamines.

Vitamine	Quantité ajoutée par g. d'alimentation sèche (μ g)
Biotine	2
Pantothénate de calcium	150
Chlorure de choline	1500
Acide folique	2
Inositol	200
Acide nicotinique	100
Chlorhydrate de pyridoxine	30
Riboflavine	20
Chlorhydrate de thiamine	20

Tableau 3. - Concentration des vitamines ajoutées nécessaires à une croissance normale.

Vitamine	Concentration minimum
Pantothénate de calcium	$1 \times 10^{-5} M$
Acide nicotinique	$1 \times 10^{-5} M$
Chlorhydrate de pyridoxine	$1 \times 10^{-6} M$

Tableau 4. - Qualité des cocons obtenus avec des alimentations artificielles.

		Poids d'un cocon	Poids de la coque du cocon
1961	Mâle	1,15 gramme	0,205 gramme
	Femelle	1,37	0,212
1964	Mâle	1,73	0,374
	Femelle	2,28	0,423

CHLOROGENIC ACID AS A GROWTH FACTOR OF SILKWORM (x)
(Original)

by

Masaru KATO and Hiromi YAMADA (Japan) (1)

Recently, a synthetic prepared food for silkworm, Bombyx mori L., has been offered on which the larvae have shown their appetite enough (1). Raising silkworm, however, 1st to 5th instars with this food, a considerable uneven growth was still found as comparing with those of fresh leaves, although the food is almost complete one in view of its appetitive activity. This fact is suggesting that some unknown factors which are required for the complete growth of the larvae are still present in fresh leaves. It seemed critical to investigate the unknown factors in the leaf. The present authors found that chlorogenic acid plays an important role in the growth of silkworm reared under the aseptic conditions.

MATERIALS AND METHODS

The F₁ of the cross of the strains Gunko and Manri, kindly provided by Gunze Silk Co., was used throughout the experiments.

(1) Masaru KATO and Hiromi YAMADA, Department of Zoology, Faculty of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan.

(x) Report N° 11 of joint studies on prepared food for silkworm, Bombyx mori.

(xx) Chlorogenic acid had already been isolated in mulberry leaf by K. Naito et al. and suggested recently that it might be a biting factor.

The components of synthetic food used are shown in Table 1. In the test of growth activity of mulberry leaf extracts, each sample extracted was coated respectively on the cellulose powder before the preparation of the food.

a) Usually, 1 g. of the food mixture was placed in 5 cm. petri dish and steamed at 100° C. for 30 minutes. Ten of the newly hatched larvae were placed in each dish, and three such dishes were used in the test of each sample. The feeding was carried out at 25°C, and the 2nd instar larvae appeared were counted at every day. Then their body weight were measured respectively at the appropriate test period.

b) An aseptic feeding technique was also adopted for the experiments in which the test period exceeded 4 to 11 days as shown in Table 2. In this case, 1.0 to 1.7 g. of food was placed in 16 mm. test tube and autoclaved at 1.5 kg/cm². for 30 minutes. At that time, twenty larvae were placed in one tube and three such tubes were used for each sample.

Methanol extract of fresh mulberry leaves was prepared according to Hamamura (2).

Toyo Roshi N° 51 filter paper (40 x 40 cm²) was used for chromatography. It was carried out at room temperature by ascending method.

RESULTS

It is shown in Table 2 that feeding of the larvae on the synthetic food (Table 1) gave 10.1 mg of mean body weight after 11 days, which is only 13 % of that on fresh leaves. In addition, a remarkable retardation, in the course of growth, was particularly observed by use of the synthetic food. This discrepancy was partly recovered by the addition of methanol extract of fresh mulberry leaves to the food as shown in Table 2, and this result indicates that at least one growth factor has to be present in the methanol extract.

The above methanol extract (234 ml., prepared from 80 g of fresh leaves) was concentrated to 40 ml, then extracted twice with each 60 ml of ethyl ether. The ether and the water fractions were put to the tests for their growth promoting activity respectively, and main part of growth activity was found in the water fraction as shown in Table 3. For further purification, 1.2 ml of the water fraction was concentrated to a small volume and applied to 2 sheets of paper and chromatographed

using 50 % aqueous methanol solvent. The chromatogram was, first of all, examined under ultraviolet light and was then sprayed with 1 % methanol solution of FeCl_3 .

The results are shown in Fig. 1. Each part of the paperchromatogram (PPC) in Fig. 1 was cut out and was eluted with water at 100°C . for 30 minutes. These eluates were concentrated and then bioassayed for their activities. The results obtained are shown in Table 4. It was found that the biological activity mainly distributed in the region of PPC-2 having pale-blue fluorescence and showing greyish green color with FeCl_3 reagent.

The fluorescent compound contained in the active fraction was identified with chlorogenic acid as summarized in Table 5, by (a) color of fluorescence, (b) coloring reaction of FeCl_3 , and (c) Rf values in paperchromatography using three different solvent systems. Then the growth promoting activity of authentic chlorogenic acid was examined for identification as shown in Table 6 and in Fig. 2. The addition of 0.1 % of chlorogenic acid to the synthetic food gave the same biological effect as in the case of water fraction. Indeed, the added amount of chlorogenic acid was almost equivalent to that contained in the water fraction of fresh leaves.

SUMMARY

A growth factor for silkworm, *Bombyx mori* L., was investigated in the methanol fraction of mulberry leaf on the studies of synthetic prepared food. It has been determined that chlorogenic acid contained in mulberry leaf was able to promote the larval growth enough.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors wish to express their sincere thanks to Dr. Y. Hamamura and Dr. K. Naito for their suggestions and our technical assistants Misses M. Oya, M. Kumazawa and H. Hamanaka for help to this work.

REFERENCES

- (1) K. HAYASHIYA, K. NAITO, J. NISHIDA, and Y. HAMAMURA, Nippon Nogeikagaku Kaishi, 37, 735 (1963).
- (2) Y. HAMAMURA, Memo. of Kyoto Univ. of Ind., Vol. 3, N^o 3, 567 (1961).

Table 1. - Components of Synthetic Food.

g. per 10 g. dry weight	
Cellulose powder	5.0
Sucrose	1.0
Potato starch	1.5
Soybean protein	2.0
Minerals	0.15
Vitamins	0.09
Morin	0.02
β - Sitosterol	0.05
Inositol	0.05
K_2HPO_4	0.05
Acetylcholine	0.01
Water	15 ml.

Table 2. - Growth and Body Weight

	After 11 days of hatching	
	Body weight (mg)	Number of 3rd instar
Synthetic food	10.1	0
Synthetic food + methanol extract (17 ml/10 g. food)	23.2	13
Fresh Mulberry leaves	77.4	52

Table 3. - Fractionation by Ether Extraction.

	Body weight after 2 days (mg)
Synthetic food	1.0
Synthetic food + methanol extract (17 ml/10 g. food)	2.4
Synthetic food + ether fraction (9 ml/10 g. food)	1.3
Synthetic food + water fraction (3 ml/10 g. food)	2.3

Table 4. - Purification by Paperchromatography

	Body weight after 3 days (mg)
Synthetic food	1.5
" " + water fraction	2.6
" " + PPC-1	1.4
" " + PPC-2	3.5
" " + PPC-3	1.7
" " + PPC-4	1.5
" " + PPC-5	1.4

Table 5. - Identification of Active Factor with Chlorogenic Acid

	Active factor	Chlorogenic acid
Color of fluorescence	Pale blue	Pale blue
Color of FeCl ₃ reaction	Greyish green	Greyish green
Rf value in methanol-water (1:1)	0.75	0.75
Rf value in acetic acid- water (1:9)	0.69	0.69
Rf value in butanol-acetic acid-water (4:1:1)	0.57	0.58

Table 6. - Biological Activity of Chlorogenic Acid

			Body weight after 9 days (mg)
Synthetic food			8.3
"	"	+ chlorogenic acid (10 mg/10 g. food)	15.3
"	"	+ chlorogenic acid (3 mg/10 g. food)	11.9
"	"	+ chlorogenic acid (1 mg/10 g. food)	8.7
"	"	+ water fraction (3 ml/10 g.)	14.7

Figure 1. - Paperchromatography of water fraction.

Rf	UNDER UV LIGHT	FeCl_3 REACTION	
1.0	GREEN	REDDISH BROWN	PPC-1
0.8	PALE BLUE	GREYISH GREEN	" - 2
0.6	QUENCH	GREEN	" - 3
0.4	VIOLET		" - 4
0.2	GREEN		" - 5
0.0			

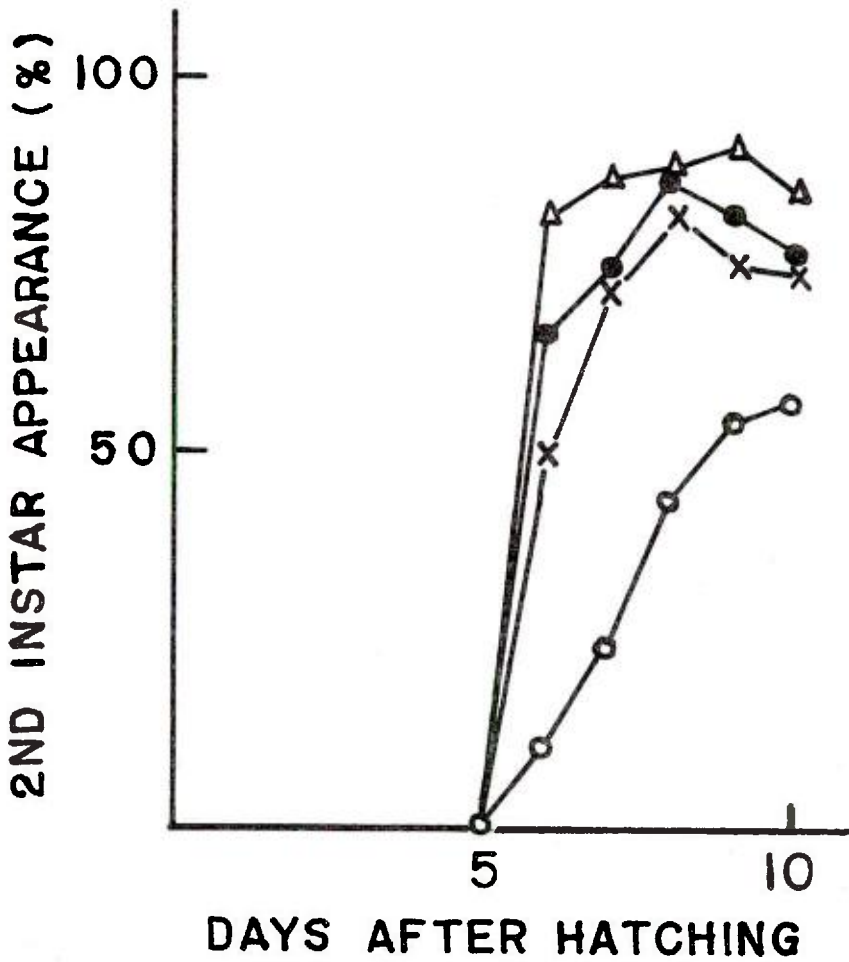


Figure 2. - Effect of chlorogenic acid on the growth of silkworm larvae.

- ——— ○ Synthetic food
 Δ ——— Δ * * + chlorogenic acid (10 mg. / 10 g. food).
 X ——— X * * + chlorogenic acid (3 mg. / 10 g. food).
 ● ——— ● * * + water fraction (3 ml. / 10 g. food).

L'ACIDE CHLOROGENIQUE, FACTEUR DE CROISSANCE
DU VER A SOIE (x)

(Traduction)

par

Masaru KATO et Hiromi YAMADA (Japon) (1)

Une alimentation préparée synthétique pour le Ver à Soie Bombyx mori L. a récemment été présentée à des larves qui l'ont mangée avec un appétit suffisant (1). Cependant, en élevant des Vers à Soie du 1er au 5ème âge avec cette nourriture, on a constaté une croissance très irrégulière par rapport à celle obtenue avec des feuilles fraîches, bien que cette nourriture soit presque complète en ce qui concerne son activité appétitive. Ce fait donne à penser que certains facteurs inconnus, nécessaires pour obtenir une croissance complète des larves sont encore présents dans les feuilles fraîches. Il apparaissait nécessaire de faire des recherches sur les facteurs inconnus que contient la feuille. Les auteurs de cet article ont découvert que l'acide chlorogénique ^{xx} joue un rôle important dans la croissance du Ver à Soie élevé dans des conditions aseptiques.

MATERIAUX ET METHODES

Pour toutes ces expériences nous nous sommes servis de la F₁ née du croisement des races Gunko et Manri et que nous a aimablement fourni la Gunze Silk Co.

(1) Masaru KATO et Hiromi YAMADA, Section de Zoologie, Faculté des Sciences, Université de Kyoto, Kyoto, Japon.

(x) Rapport N° 11 d'études faites en commun sur l'alimentation « préparée » du Ver à Soie Bombyx mori.

(xx) L'acide chlorogénique avait déjà été isolé dans la feuille de mûrier par K. Naito et coll., et il a été suggéré récemment qu'il pourrait constituer un facteur de prise de nourriture.

Les éléments entrant dans la composition de l'alimentation synthétique sont présentés dans le Tableau 1. Pour le test d'activité de croissance des extraits de feuilles de mûrier, chaque échantillon extrait était enrobé de poudre de cellulose avant de procéder à la préparation de l'aliment.

a) On plaçait habituellement 1 g. de nourriture dans des boîtes de Pétri de 5 cm et on l'autoclavait à 100°C pendant 30 minutes. Dix des larves nouvellement écloses étaient placées dans chaque boîte, et on utilisait trois de ces boîtes pour l'examen de chaque lot.

Ces larves étaient alimentées à une température de 25°C, et l'on comptait chaque jour les larves ayant atteint le 2ème âge. Puis on les pesait à des moments déterminés du test.

b) Comme le montre le Tableau 2, nous avons également adopté une méthode d'alimentation aseptique pour les expériences où la durée du test atteignait de 4 à 11 jours. Dans ce cas, nous placions de 1,0 à 1,7 g. de nourriture dans des tubes de 16 mm. et on la passait à l'autoclave avec une pression de 1,5 kg/cm² pendant 30 minutes. On plaçait alors 20 larves dans chaque tube et l'on utilisait trois tubes par lot.

On préparait de l'extrait de méthanol de feuilles fraîches de mûrier selon la méthode indiquée par Hamamura (2).

Pour la chromatographie qui a été réalisée à la température de la pièce et par méthode ascendante, nous avons utilisé du papier filtre Toyo Roshi N° 51 (40 x 40 cm²).

RESULTATS

Le Tableau 2 montre que les larves nourries avec une alimentation synthétique (Tableau 1) avaient un poids moyen de 10,1 mg au bout de 11 jours, ce qui ne représente que 13 % du poids moyen des larves nourries avec des feuilles fraîches. De plus, on notait particulièrement un retard très important au cours de la croissance lorsque la nourriture synthétique était utilisée. Comme le montre le Tableau 2, ce retard était partiellement rattrapé en ajoutant de l'extrait de méthanol de feuilles fraîches de mûrier à la nourriture. Et ce résultat montre que l'extrait de méthanol doit contenir au moins un facteur de croissance.

L'extrait de méthanol mentionné ci-dessus (234 ml., préparé à partir de 80 g. de feuilles fraîches était concentré à 40 ml., puis extrait deux fois avec 60 ml. d'éther d'éthyle chaque fois. Les fractions d'éther et d'eau furent soumises au test afin de déterminer leur activité respective en faveur de la croissance, et comme le montre le Tableau 3, la majeure partie de l'activité de croissance fut trouvée dans la phase aqueuse. Afin d'obtenir une purification plus poussée, nous avons concentré 1,2 ml. de la phase aqueuse sous un faible volume, et nous l'avons appliquée sur 2 feuilles de papier puis chromatographiée en utilisant un solvant de méthanol aqueux à 50 %. Nous avons tout d'abord examiné le chromatogramme à la lumière ultra-violette, puis nous l'avons vaporisé avec une solution contenant 1 % de Fe Cl₃ dans le méthanol. Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure 1. Chaque partie du papier chromatogramme (PPC) représenté sur la Figure 1 fut découpée et éluée avec de l'eau portée à 100°C. pendant 30 minutes. Ces éluats furent concentrés et analysés du point de vue de leur activité. Les résultats obtenus sont représentés dans le Tableau 4. Nous avons constaté que l'activité biologique était essentiellement répartie dans la zone PPC-2 ayant une fluorescence bleu pâle et qui prenait une coloration vert grisâtre avec le réactif Fe Cl₃.

Comme le montre sous forme de résumé le Tableau 5, le composé fluorescent contenu dans la fraction active fut identifié avec l'acide chlorogénique par :

- a) la couleur de la fluorescence,
- b) la coloration de la réaction avec Fe Cl₃,
- c) les valeurs *r_f* en chromatographie sur papier utilisant 3 systèmes différents de solvants.

Puis, comme le montrent le Tableau 6 et la Figure 2, nous avons examiné l'activité biologique du véritable acide chlorogénique favorisant la croissance afin d'établir une comparaison. En ajoutant 0,1 % d'acide chlorogénique à la nourriture synthétique, nous avons obtenu le même effet biologique que dans le cas de la phase aqueuse. En fait, la quantité d'acide chlorogénique ajoutée équivalait à peu près à celle contenue dans la phase aqueuse des feuilles fraîches.

RESUME

Nous avons recherché dans la fraction de méthanol de feuilles fraîches de mûrier un facteur de croissance du Ver à Soie Bombyx mori L. lors de nos études sur l'alimentation préparée synthétique. Nous avons constaté que l'acide chlorogénique contenu dans les feuilles de mûrier pouvait favoriser la croissance des larves.

REMERCIEMENTS

Les auteurs de cet article tiennent à remercier très sincèrement le Dr. Y. Hamamura et le Dr. K. Naito des conseils qu'ils leur ont donnés, ainsi que leurs assistantes techniques Melles M. Oya, M. Kumazawa et H. Hamamura de l'aide qu'elles leur ont apportée pour faire ces travaux.

REFERENCES

(Voir texte anglais : original)

Tableau 1. - Composants de la Nourriture Synthétique

	g. par 10 g. de poids sec
Poudre de Cellulose	5,0
Saccharose	1,0
Amidon de pomme de terre	1,5
Protéine de soja	2,0
Minéraux	0,15
Vitamines	0,09
Morine	0,02
β - Sitostérol	0,05
Inositol	0,05
K_2HPO_4	0,05
Acétylcholine	0,01
Eau	15 ml.

Tableau 2. - Croissance et Poids du Corps.

	11 jours après l'éclosion	
	Poids du Corps (mg)	Nombre de vers 3ème âge
Alimentation synthétique	10,1	0
Alimentation synthétique + extrait de méthanol (17 ml/10 g. de nourriture)	23,2	13
Feuilles de mûrier fraîches	77,4	52

Tableau 3. - Fractionnement par Extraction à l'Ether.

	Poids du Corps après 2 jours (mg)
Alimentation synthétique	1,0
Alimentation synthétique + extrait de méthanol (17 ml/10 g. de nourriture)	2,4
Alimentation synthétique + extrait étheré (9 ml/10 g. de nourriture)	1,3
Alimentation synthétique + extrait aqueux (3ml/10 g. de nourriture)	2,3

Tableau 4. - Purification par Chromatographie sur Papier.

	Poids du Corps après 3 jours (mg)
Alimentation synthétique	1,5
" " + fraction aqueuse	2,6
" " + PPC-1	1,4
" " + PPC-2	3,5
" " + PPC-3	1,7
" " + PPC-4	1,5
" " + PPC-5	1,4

Tableau 5. - Identification du Facteur Actif avec l'Acide Chlorogénique.

	Facteur Actif	Acide Chlorogénique
Couleur de la fluorescence	bleu pâle	bleu pâle
COLORATION de la réaction avec FeCl ₃	vert grisâtre	vert grisâtre
Valeur RF dans méthanol-eau (1:1)	0,75	0,75
Valeur RF dans acide acétique-eau (1:9)	0,69	0,69
Valeur RF dans butanol-acide acétique-eau (4:1:1)	0,57	0,58

Tableau 6. - Activité Biologique de l'Acide Chlorogénique.

			Poids du Corps après 9 jours (mg)
Alimentation synthétique			8,3
"	"	+ acide chlorogénique (10 mg/10 g. de nourriture)	15,3
"	"	+ acide chlorogénique (3 mg/10 g. de nourriture)	11,9
"	"	+ acide chlorogénique (1 mg/10 g. de nourriture)	8,7
"	"	+ phase aqueuse (3 ml/10 g.)	14,7

Figure 1. - Chromatographie sur papier de la fraction aqueuse.

R F	Sous lumière ultra-violette	Réaction avec Fe Cl_3	
1,0 .			
0,8 .	Vert	Brun Rougeâtre	PPC - 1
0,6 .	Bleu pâle	Vert grisâtre	» - 2
0,4 .	Absence de coloration	Vert	» . 3
0,2 .	Violet		» - 4
0,0 .	Vert		» - 5

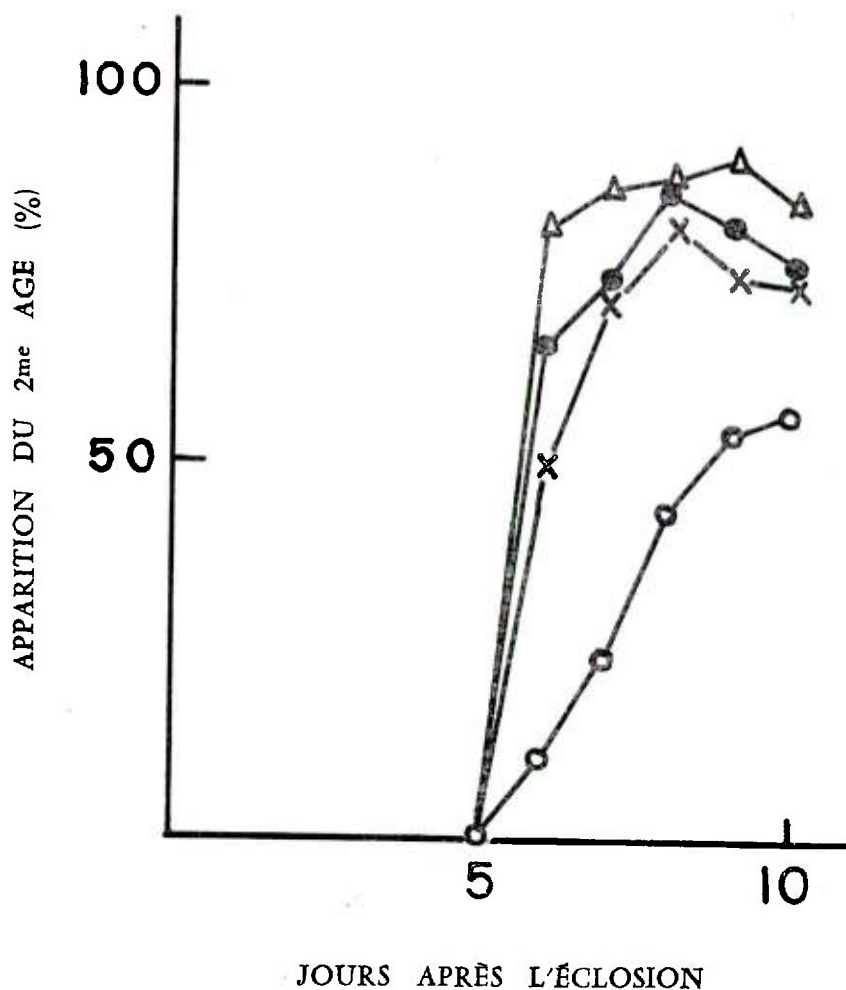


Figure 2. - Effet de l'acide chlorogénique sur la croissance des larves du Ver à Soie.

- | | | |
|-------|--------------------------|--|
| ○ — ○ | Alimentation synthétique | |
| △ — △ | » | + acide chlorogénique
(10 mg. / 10 g. de nourriture). |
| X — X | » | + acide chlorogénique
(3 mg. / 10 g. de nourriture). |
| ● — ● | » | + fraction d'eau
(3 ml. / 10 g. de nourriture). |

ESSAIS PRELIMINAIRES A LA MISE AU POINT
D'UNE ALIMENTATION PREPAREE A PARTIR DE FEUILLES DE
MURIER CUITES POUR LE VER A SOIE BOMBYX MORI L.

(Original)

par

LEGAY J. M. et PASCAL M. (France) (1)

Le phénomène initial qui nous a orienté vers cette recherche fut l'ingestion par le Ver à Soie de feuilles de mûrier cuites ; soit que les feuilles aient été plongées dans l'eau en ébullition, soit qu'elles aient été pasteurisées en bocaux sans addition d'eau selon la méthode adoptée pour les conserves ménagères. (Legay et Pascal 1955).

Une cuisson de 30 minutes à 100° C. en milieu aqueux limité s'est montrée incapable de détruire le pouvoir attractif de la feuille de mûrier et l'eau de cuisson contenait à son tour ces principes attractifs.

On a pu priver la feuille de toute attractivité par épuisement dans plusieurs bains successifs à 100° C., et inversement on a pu concentrer les produits attractifs dans une quantité d'eau déterminée par cuissons successives de feuilles fraîches renouvelées ; on peut aussi concentrer l'eau de cuisson par ébullition et obtenir ainsi un jus attractif utilisable pour des essais ultérieurs.

La plupart de nos essais ont par suite porté sur des milieux d'élevage à base de feuille de mûrier cuite ; il s'agit donc de milieux oligi-

(1) LEGAY J. M., Professeur à la Faculté des Sciences de Lyon (anciennement Chef du laboratoire de Biologie à la Station d'Alès), et PASCAL M., Ingénieur Principal au laboratoire de Cytopathologie de St Christol-les-Alès (anciennement chargé du laboratoire de Physiologie Alimentaire des Insectes de la Station d'Alès).

ques (d'après la classification de Dougherty, 1959).

La première question que nous nous sommes posés fut alors de trouver un substrat acceptable possédant des qualités physiques telles que la larve put en découper des fragments, comme elle fait pour la feuille fraîche.

1 - Recherche d'un substrat physique.

Nous avons successivement proposé aux jeunes vers éclos : de la feuille cuite, de la gélose, de la cellulose structurée, des substances alimentaires diverses.

1°) Feuille cuite.

Le support idéal semblait être la feuille cuite en bocaux. Divers essais (Legay, Pascal et Baud 1959) ont montré que cette feuille était trop modifiée pour permettre un élevage satisfaisant au-delà de la 1^{ère} mue, on peut toutefois sur certaines races obtenir 2 ou 3 mues ; exceptionnellement nous avons obtenu 5 mues avec des poids de larves comparables à ceux de la 3^{ème} mue sur mûrier frais.

2°) Gélose.

Les essais faits avec de la gélose ont seulement montré que les larves avaient la possibilité d'ingérer une substance étrangère imbibée de produit attractif, à la seule condition que sa résistance mécanique soit favorable, sans cependant faire défaut car alors les pièces buccales se trouvaient bloquées, la larve elle-même se trouvant captive de son aliment et mourant sans pouvoir continuer à s'alimenter.

3°) Cellulose structurée.

Nous avons utilisé des lamelles de moëlle de sureau débitées au microtome. Ces lamelles servaient soit de support directement imbibées de jus, soit à la confection de "sandwiches" dont la partie centrale était une mixture étudiée.

4°) Substances diverses considérées comme support mais apportant en même temps des éléments nutritifs.

Dans cette catégorie ont été essayés les corps suivants : mie de pain, pain azyme, farine et germe de blé stabilisé, farine entière de soja.

II - Recherche de compléments chimiquement définis.

Aux substances utilisées comme support nous avons adjoint successivement ou en mélanges définis les corps suivants : glucose, sucrose, cholestérol, choline (chlorure), acide ascorbique, B carotène, caséine, levure, fruit d'églantier (chair colorée), extrait de carotte.

Nous avons cherché à préciser la nature d'une supplémentation efficace de la feuille cuite. Divers apports vitaminiques naturels n'ont pas permis d'amélioration constante. Par contre les larves acceptant très facilement de passer de l'aliment cuit à l'aliment cru et vice-versa, ce comportement nous a permis d'apporter selon des modalités très diverses la supplémentation désirée, soit avec de la feuille de mûrier, soit même avec du scorsonère, du Podospermum, ou de la salade. La nymphose a été ainsi atteinte sans difficulté dans tous les cas même si l'aliment cuit est donné en exclusivité pendant les IIème, IIIème et IVème stades.

Des mélanges tels que ceux comprenant : mie de pain, jus de mûrier, farine de soja, acide ascorbique ont permis d'atteindre au terme de sept jours d'alimentation des poids larvaires moyens compris entre 2 et 4 mg. sans qu'aucun individu n'ait atteint la mue.

Toujours désireux d'utiliser la matière attractive que constitue la feuille de mûrier conservée en bocaux, nous avons utilisé une formule inspirée des travaux japonais, mais adaptée à nos besoins :

Feuille entière conservée en bocal	15,0 g.
Caséine Lactique	1,0 g.
Soja (poudre entière).....	1,5 g.
Amidon de pomme de terre	1,5 g.
Saccharose	1,0 g.
Eau distillée.....	10 à 12 ml.
Vitamine B ₁	150 γ
Vitamine B ₂	150 γ

Ces divers éléments sont homogénéisés et la pâte obtenue est stérilisée à l'autoclave 10 minutes puis conservée à congélation. L'élevage se fait dans des boîtes en verre ou dans des tubes avec le maximum de précautions pour éviter l'envahissement par les champignons.

Il est préférable d'opérer aseptiquement ce qui est facile si l'on désinfecte les oeufs au départ.

De tels élevages nous ont montré que le Ver à Soie du mûrier était un lépidoptère exigeant car la croissance des individus s'adaptant à cet aliment est restée très au-dessous de la normale.

Par contre deux autres chenilles de lépidoptères ont été nourries avec succès grâce à ce régime alimentaire. Deux générations successives ont été obtenues chez Mamestra brassicae avec une très faible mortalité.

Artia caja a dans les mêmes conditions atteint la fin du dernier stade larvaire où une virose s'est déclarée, mettant fin à l'essai.

Ainsi donc des résultats encourageants ont été obtenus ; il convient de faire remarquer que la formule alimentaire mise au point constitue une solution approchée parallèle à celle adoptée par les auteurs japonais. Elle tend à substituer à la poudre de feuille de mûrier, d'une obtention difficile et d'une conservation très limitée, une feuille de mûrier stable encore valable après un an de conservation à la température du laboratoire. Cependant la réalisation d'un élevage convenable se heurte à une série de problèmes relevant de disciplines diverses :

- limitation de l'ingestion,
- altération du milieu,
- détermination en besoins vitaminiques.

Leur solution complète impliquerait la mise en oeuvre de moyens de recherche importants et coordonnés.

REFERENCES

- LEGAY et PASCAL, 1955 - Sur la possibilité de nourrir le Ver à Soie Bombyx mori L. avec des feuilles de mûrier cuites et conservées. C.R. Soc. Biol. T. CXLIX, n° 13-14, p. 1362-64, 1955.
- LEGAY, PASCAL et BAUD, 1959 - Contribution à l'étude de l'alimentation chez le Ver à Soie Bombyx mori L., Ann. Epiph. **3**, 321-50, 1959.
- DOUGHERTY (E.C.), 1959 - Introduction to axenic culture of invertebrate metazoa : a goal. Ann. N.York Acad. Sciences, **77**, 27-54, 1959.

PRELIMINARY ATTEMPTS TO FORMULATE A PREPARED FOOD
FROM BOILED MULBERRY LEAVES FOR
THE SILKWORM BOMBYX MORI L.

(Translation)

by

LEGAY J. M. and PASCAL M. (France) (1)

The initial phenomenon which induced us to carry out the present research was the ingestion by the silkworm of boiled mulberry leaves which had been either plunged into boiling water or pasteurized in bottles without adding water according to the method used for tinned food (Legay and Pascal, 1955).

It appeared that a boiling of 30 minutes duration at a temperature of 100° C. in a limited aqueous medium was unable to destroy the attractive power of the mulberry leaf, and that the water which had been used contained also these attractive elements.

We succeeded to deprive the leaf of all its attractiveness by exhausting it in several successive baths at 100° C., and conversely we succeeded to concentrate the attractive substances in a specific amount of water by successive boilings of renewed fresh leaves. It is also possible to concentrate by ebullition the water which has been used and thus we could get an attractive juice available for subsequent experiments.

Consequently, most of our experiments have been made with rearings based upon boiled mulberry leaves, that is to say oligidic envi-

(1) LEGAY J. M., Professor, Faculty of Sciences, Lyons (formerly, Head of the Biology laboratory at the Alès Sericultural Station). PASCAL M., Head Engineer, Cytopathology laboratory, St Christol-les-Alès (formerly, Head of the laboratory of Alimentary Physiology of Insects at the Alès Sericultural Station).

ronments (according to Dougherty's classification, 1959).

The first problem we had to solve was to find an acceptable substratum having the required physical qualities to allow the larva to cut off fragments, as it does with the fresh leaf.

1 - Research of a physical substratum.

We have successively given boiled leaf, agar, structured cellulose and different nutritive substances to newly hatched larvae.

1°) Boiled leaf.

The ideal support seemed to be the leaf boiled in bottles. Several attempts (Legay, Pascal and Baud, 1959) have shown that this leaf was too deeply altered to allow a satisfactory rearing beyond the 1st instar. It is possible, however, with certain breeds, to reach the 2nd or the 3rd instars. Exceptionally, we could reach the 5th instar with larvae whose weight was comparable with the weight obtained at the 3rd instar for larva fed on fresh mulberry leaves.

2°) Agar.

The experiments carried out with agar have only shown that the larvae could ingest an extraneous substance impregnated with attractive produce provided that its mechanical resistance should be favourable, though not absent, because the buccal organs got blocked. The larva was then captive of its food and it died without being able to eat any more.

3°) Structured cellulose.

We have used thin sheets of elder pith cut up with a microtome. These sheets were used either as supports after having been soaked in juice, or for the preparation of "sandwiches" whose central part was composed of an elaborate mixture.

4°) Different substances considered as supports but providing at the same time nutritive elements.

In this category of substances we have tested the following elements: bread crumb, azyme bread, meal and sprout of stabilized corn, whole meal of soya-bean.

II - Research of chemically defined complements.

To the substances used as supports we have added either successively or in defined mixtures, the following bodies : glucose, sucrose, cholesterol, choline (chloride), ascorbic acid, B carotene, casein, yeast, wild-rose fruit (coloured pulp), carrot extract.

We have endeavoured to specify the nature of the efficient supplements to be added to the boiled leaf. The adding of different natural vitamins has not permitted to obtain a constant improvement. On the other hand, as the larvae accepted very easily to feed on the boiled food then on the raw food and vice versa, this behaviour enabled us to add the required supplements according to very different methods, either with mulberry leaf or even with scorzonera, Podospermum and salad. The pupation was thus reached without difficulty in all the different cases even if the boiled food was given exclusively during the 2nd, 3rd and 4th instars.

Such mixtures as those including : bread crumb, mulberry juice, soya meal, ascorbic acid allowed us to obtain after seven days of feeding, average larval weights ranging from 2 to 4 mg. without any larva having reaching moulting.

Always desirous to use the attractive substance which is constituted by the mulberry leaf preserved in bottles, we have used a formula drawn from Japanese works but adapted to our requirements :

Whole leaf preserved in bottles	15,0 g.
Lactic casein	1,0 g.
Soya-bean (whole meal)	1,5 g.
Potato starch	1,5 g.
Sucrose	1,0 g.
Distilled water	10-12 ml.
B ₁ Vitamin	150 γ
B ₂ Vitamin	150 γ

These different elements are homogenized and the paste which is obtained is sterilized in an autoclave during 10 minutes then maintained frozen. Rearing is made in glass boxes or in tubes with the maximum of precautions in order to prevent the invasion of funguses.

It is better to perform in aseptic conditions, which is easy if the eggs are disinfected at the start.

Such rearings have shown us that the mulberry silkworm is an exacting lepidopteran because the growth of the larvae adapting themselves to this food has remained far inferior to the normal growth.

On the other hand, two other larvae of lepidopterans have been successfully fed with this diet. Two successive generations have been obtained for Mamestra brassicae with a very low mortality.

Under the same conditions Artia caja has reached the end of the last larval stage, then a virus disease broke out which put an end to the experiment.

So, encouraging results have been obtained. It is advisable to remark that the diet we have formulated constitutes an approximate solution parallel to the one which has been adopted by Japanese authors. It tends to replace the mulberry leaf powder, which is difficult to obtain and which can be preserved only for a very limited time, by a stable mulberry leaf which is still available after one year of preservation at the temperature of the laboratory. Yet, the carrying out of a satisfactory rearing meets with a series of problems relevant to different disciplines :

- limitation of ingestion,
- alteration of the medium,
- determination of the needs in vitamins.

A thorough solution of these problems would involve the use of important and coordinated means of research.

REFERENCES

(See French text : original).

PRIMO SAGGIO SUL DIGIUNO DI BACHI
SPRUZZATI CON SOLUZIONI NUTRITIVE DURANTE LA V^a ETA
COMPARATIVAMENTE IN UNA RAZZA BIVOLTINA (AWOIKU)
ED IN UNA MONOVOLTINA (HACU)

(Original)

di

Carmina MANUNTA (Italia) (1)

Numerose ricerche specialmente da Bounhiol e collaboratori sono state intraprese nel corso delle quali varie sostanze sono state aggiunte ai vegetali (foglia del gelso e scorzonera) che costituiscono il nutrimento dei bachi da seta. In genere si è cercato di aumentare la razione di sostanze organiche (glucidi, protidi, lipidi) e in fattori di assimilazione come vitamine e fermenti diastatici.

Nelle esperienze eseguite da Bounhiol dal 1956 al 19 al 1960 furono usate non sostanze pure ma complessi facili a procurarsi commercialmente: glucosio, miele, polline, olio di lino, alginati della Casa Maton, polvere di licopodio (spore di felci, prodotti officinali), ovoalbumina, vegelactina (composta da latte di soia, latte di vacca, farina di cereali, vitamine A, B, C), lievito fresco, riboflavina Roche, cellulasi, polvere di foglia di gelso seccata a 50°.

Gli effetti sono stati vari ad es. l'aggiunta di lievito fresco turba il metabolismo sicchè i trattati pesano assai meno dei controlli e i bozzoli hanno scarsa seta. Vice-versa l'aggiunta di polvere di gelso resa ade-

(1) Carmina MANUNTA, Cattedra di Biologia, Facoltà di Medicina, Sassari.

rente dall'alginato causa un abbassamento del coefficiente di assimilazione pur permettendo un peso e una secrezione analoga a quella dei controlli o lievemente superiore. Il miele, il polline, la polvere di licopodio permettono una crescita subnormale. Ma i bachi trattati con foglie lievemente spruzzate di miele diluito hanno raggiunto alla filatura pesi superiori a quelli dei controlli, benchè i bozzoli siano stati più leggeri.

Manjeet Singh Jolly (1960) osservo che la gelatina reale pur determinando un aumento del peso larvale non influisce sulla quantità di azoto totale della emolinfa.

Ma spesso per determinate ricerche biochimiche tendenti a spiegare certi fenomeni fisiologici, relativi ad es., al problema delle mute o a quello della riproduzione o riguardante vari aspetti della nutrizione si è costretti a ricorrere allo studio dei bachi a digiuno.

Ma in questo caso il più spesso si incorre in una grande mortalità e spesso non si riesce ad ottenere i bozzoli, crisalidi, farfalle.

Mi è perciò sembrato di un certo interesse rivolgere la mia attenzione ad una serie di soluzioni nutritive che, spruzzate sui bachi digiunanti permettano di avere una minore mortalità larvale e di poter ottenere una certa percentuale di incrisalidamenti e sfarfallamenti.

All'inizio di queste ricerche mi ha stimolato anche la considerazione che, una volta trovata rispondere allo scopo, una delle soluzioni saggiate, ciò poteva anche essere utile nei riguardi del problema della alimentazione permanente dei bachi da seta.

A questo proposito Pascal (1960) nelle sue ricerche sull'alimentazione permanente del baco da seta (mediante Scorsonera, *Podosperrum* addizionati delle sostanze attrattive contenute nella foglia del gelso) osserva che la crescita è possibile ma che il primo ostacolo da superare è la realizzazione delle mute. Questo ostacolo non è determinato, secondo l'Autore, da un'alimentazione in assenza di vegetali freschi poichè si è osservato che sulla lattuga le larve oltrepassano il peso a la grandezza della muta senza che questa intervenga.

Prima di preparare le soluzioni nutritive ho creduto opportuno di dare uno sguardo al metabolismo degli aminoacidi, per avere una indicazione su quelli che erano più strettamente indispensabili. Già in mie precedenti ricerche in cromatografia su carta avevo potuto rilevare che gli aminoacidi sia della emolinfa che del bozzolo derivano dalla

foglia del gelso. Recenti lavori, al riguardo della scuola di Florokin giungono alle seguenti conclusioni.

La qualità e la quantità di un nutrimento del baco da seta durante il periodo di accrescimento tissulare, prima del periodo di alimentazione "facoltativa" a metà della 5^a età hanno una ripercussione indiretta assai grande sulla quantità di seta prodotta. L'elaborazione della fibroina si compie a spese di certi aminoacidi liberi della emolinfa, gli acidi aminati utilizzati essendo essenzialmente la glicocollo, l'acido aspartico, l'acido glutamico (libero sottoforma di amidi), la serina e la treonina. Questi acidi aminati sono di origine alimentare ma alcuni passano a costituire la riserva tissulare quando essi sono ingeriti prima del periodo dell'entrata in attività della ghiandola della seta. Liberati nel corso della istolisi sono poi utilizzati per la sintesi della seta insieme con quelli che provengono direttamente dagli alimenti.

Quando il baco da seta sale al bosco, la componente aminoacido del sangue è assicurata soltanto dalle lisi progressiva dei tessuti.

Questo conduce ad una importante diminuzione di concentrazione della glicina, degli acidi aspartico e glutamico, della trionina e della serina liberi del sangue. Alla fine della filatura la concentrazione in questi aminoacidi del sangue ritorna al suo valore iniziale.

Fra gli acidi aminati provenienti dall'alimentazione l'istidina non partecipa alla preparazione della seta sicchè il tenore del sangue in istidina determina una regolazione che sembra opporsi parzialmente all'abbassamento della pressione osmotica provocata dall'utilizzazione degli altri acidi aminati da parte dei seritteri. Una funzione analoga pare esplicita anche la metionina.

E' evidente così come l'aminoacido più importante del metabolismo protidico dei bachi da seta sia la glicocollo, onde ho ritenuto opportuno iniziare i miei saggi preliminari con una soluzione ricca in contenuto di questo aminoacido pur avendo aggiunto piccole quantità di alanina di tirosina e di triptofano. Trascrivo i risultati da me ottenuti in questo 1 saggio.

Saggio preliminare sulla nutrizione artificiale durante la 5^a età larvale in razza bivoltina (Awoijku) e monovoltina (Hacu durante l'allè-
vamento del 1960.

Fu preparata la seguente soluzione nutritizia :

Glicocolla	g.	5,0
Alanina	"	1,5
Glucosio	"	10,0
Tirosina	"	0,5
Fenilalanina	"	0,5
Acido ascorbico	"	0,1
Acido pantotenico	"	0,1
Acido nicotinico	"	0,1
Riboflavina	"	0,05
Triptofano	"	0,1
Acqua fontis	cc.	1000

Questa soluzione è divisa in frazioni di 250 cc. l'una. Alla prima si aggiunge 1 cc. di $FeCl_3$ al 2 % di Fe (soluzione A) ; alla seconda frazione si aggiunge 1 cc. di $CuCl_2$ al 2 % di Cu (soluzione B) ; alla terza frazione 1 cc. di soluzione $AlCl_3$ al 2 % di Al (soluzione C) ; alla quarta frazione 1 cc. di $CoCl_2$ al 2 % di Co (soluzione D).

Sono poi scelti bachi dei due ceppi in esame in 4° sonno e al giorno successivo scelti i mutati e divisi in 6 lotti. Per Awoijku questi sono costituiti da un numero di 150 bachi ciascuno e per Hacu di soli 100 individui ciascuno.

Tutti i lotti sono nutriti regolarmente per tutto il 1° giorno 5^a età e per metà del 2° giorno e lasciati stare poi a digiuno fino al giorno successivo (14-6). Si dà così al mattino di questo giorno inizio all'esperienza.

Cioè un lotto viene spruzzato 5 volte al giorno con acqua fontis (M) in modo da avere un controllo nelle stesse condizioni di esperimento completamente a digiuno ; un lotto viene nutrito normalmente con foglie di gelso e costituisce il controllo normale (N) e gli altri 4 lotti vengono spruzzati 5 volte al giorno con le rispettive soluzioni nutritizie A, B, C, D.

Trascrivo i dati sull'andamento delle singole prove.

	DATA						
	15/6	16/6	17/6	18/6	19/6	20/6	21/6
N (morti)							
Awoijku	0	0	0	0	0	Filatura	Filatura
Hacu	0	0	0	0	0	0	
M (morti)							
Awoijku	0	10	18	27	30	23	
Hacu	2	8	11	12	23	10	
A (morti)							
Awoijku	2	8	18	18	17	9	
Hacu		8	6	5	21	26	
B (morti)							
Awoijku	8	8	10	19	30	8	
Hacu	2	7	9	5	27	25	
C (morti)							
Awoijku	1	2	9	21	28	10	
Hacu	1	2	7	6	13	40	
D (morti)							
Awoijku			30	30	11	10	
Hacu	2	15	14	7	19	12	

I risultati dopo allo sbizzolamento furono i seguenti :

N - Per i controlli normali si ebbero per Awoijku 140 bozzoli con 138 crisalidi e 2 bachi morti ; 4 bachi morti e 6 crisalidi. Per Hacu 92 bozzoli con 89 crisalidi, 3 bachi morti, 2 crisalidi e 8 bachi morti. Nei controlli normali per Awoijku si ebbero 141 sfarfallati, per Hacu 85 sfarfallamenti.

M - Per i controlli spruzzati con acqua fontis si ebbero : per Awoijku 3 crisalidi senza bozzolo, 9 bozzoli con crisalide, un doppione con 2 crisalidi ; per Hacu 2 bozzoli con crisalidi. Per Awoijku 5 sfarfallamenti ; per Hacu nessuno.

A - Per gli spruzzati con soluzione nutritiva addizionata di cloruro ferrico si ottennero : per Awoijku 9 crisalidi senza bozzolo, 55 bozzoli con crisalidi, 2 doppiioni con 4 crisalidi, 7 bozzoli con bachi marci ;

per Hacu 1 crisalide senza bozzolo, 11 bozzoli con crisalidi, 7 bozzoli con bachi marci. Per Awoijku 61 sfarfallati e 7 non sfarfallati ; si ebbero 25 accoppiamenti da cui si ebbero solo 20 deposizioni di uova ; fra queste 5 ovature con solo 10-20 uova ciascuna. 5 ovature si comportano come univoltine e 10 ovature sono sgusciate. Per Hacu solo 3 crisalidi non sfarfallate e degli sfarfallati (16) non si ebbe nessun accoppiamento perchè tutti maschi.

B - Per i trattati con la soluzione nutritizia addizionata di cloruro di rame si ebbero : per Awoijku 3 crisalidi senza bozzolo, 6 dopponi con 10 crisalidi, un doppone con 1 crisalide e 1 baco morto, 43 bozzoli con crisalidi, 4 bozzoli con bachi morti ; per Hacu 10 bozzoli con crisalidi, 5 bozzoli con bachi morti. Per Awoijku solo 2 crisalidi non sfarfallate, 55 sfarfallate da cui si ebbero 26 accoppiamenti con 8 ovature nate, 7 ovature univoltine, 11 senza deposizione. Per Hacu 4 crisalidi non sfarfallate, 6 sfarfallate ma tutti maschi.

C - Per i trattati con soluzione nutritizia addizionata di cloruro di Al si ebbero : per Awoijku 4 crisalidi senza bozzolo, 58 bozzoli con crisalidi, 11 bozzoli con bachi morti ; per Hacu 23 bozzoli con 11 crisalidi, un doppone con una crisalide. Per Awoijku 16 non sfarfallati, 46 sfarfallamenti con 23 accoppiamenti da cui si ebbero 10 ovature monivoltine e 10 nate e 3 vuote ; per Hacu 3 crisalidi non sfarfallate e 9 sfarfallate di cui soltanto 1 femmina, onde si ottenne un solo accoppiamento con poche uova monovoltine.

D - Per i trattati con la medesima soluzione addizionata di cloruro di Co si ottennero : per Awoijku 1 crisalide senza bozzolo, 52 bozzoli con 48 crisalidi, 3 dopponi con 6 crisalidi ; per Hacu 10 bozzoli con 7 crisalidi. Per Awoijku n. 4 non sfarfallate n. 2 con accenno di sfarfallamento, e 49 sfarfallati, si ebbero 20 accoppiamenti di cui 15 ovature nate, 3 non fecondate, 1 con poche uova univoltine, e 1 vuota . Anche per questi trattati nelle ovature le uova appaiono in numero assai più scarso che nei controlli normali e appaiono assai più piccole. I bachi nati sono stati allevati in secondo allavamento e benchè alla nascita apparissero bacolini più piccoli dei normali, tuttavia durante l'allevamento le larve raggiunsero ben presto lo sviluppo del normale controllo.

Per Hacu si ebbero solo 7 sfarfallati di cui 1 sola femmina, quindi 1 solo accoppiamento con 1 ovatura composta di sole 10 uova, gli altri 6 sfarfallati erano maschi.

Per avere un quadro più chiaro dell'andamento generale per le due razze in esame ho ritenuto opportuno, calcolare, oltre alla mortalità larvale fino all'inizio della filatura, anche le percentuali di imbozzolamento, di incrisalidamento e di sfarfallamento (questa percentuale è calcolata in base al numero di crisalidi ottenute, mentre le altre percentuali in base al numero di individui in esperimento - cioè 150 per Awoijku e 100 per Hacu per i singoli trattamenti).

I valori ottenuti sono riportati nel seguente specchio, ove sono trascritti anche i pesi, relativamente per i due sessi, delle farfalle, benchè solo per la razza Awoijku, in quanto per Hacu il materiale sfarfallato è stato assai più scarso.

L'analisi dei risultati ottenuti riassunti nella Tab. 1, permette di raggiungere le seguenti conclusioni :

1 - La soluzione nutritizia da me spruzzata sui bachi digiunanti a cominciare dal 2° giorno 5^a età fino all'inizio della filatura determina una diminuzione della mortalità larvale prima della filatura, ben evidente solo nella razza bivoltina, poichè nella monovoltina i valori sono pressochè uguali a quelli dei digiunanti, spruzzati con sola acqua. Viceversa si ha un aumento nella percentuale di imbozzolamento, anche se i bozzoli ottenuti sono molto piccoli e spesso incompleti, tale aumento è più significativo nella razza Awoijku che in Hacu.

2 - La percentuale di incrisalidamento nei digiunanti con sola acqua per entrambe le razze in esame risulta notevolmente inferiore ai valori ottenuti per i trattati. In quanto allo sfarfallamento si è osservato un andamento normale rispetto ai controlli nei riguardi delle percentuali, benchè nei trattati queste si mantengano no più elevate che nei digiunanti trattati con sola acqua. L'effetto del trattamento appare permettere il fenomeno delle mute normalmente come in condizioni di normale alimentazione.

3 - Chiaramente poi si mette in evidenza un comportamento nettamente differenziale fra le due razze in esame, essendosi ottenuti valori più alti sia delle percentuali di imbozzolamento che di incrisalidamento per la razza bivoltina Awoijku che per la monovoltina Hacu.

4 - Anche i fenomeni di riproduzione sembrano decorrere normalmente nonostante il peso minimo degli adulti con la conseguente deposizione di ovature ridotte a un numero assai scarso di uova a peso evidentemente anche più piccolo che nei normali. Questo risultato è certamente dovuto alla carenza in fosforo. Infatti dai risultati di Baud (1960) sul metabolismo del fosforo nei riguardi della riproduzione è

MORTALITÀ LARVALE, PRIMA DELLA FILATURA

N		M		A		B		C		D	
Awoijku	Hacu:	Awoijku	Hacu:	Awoijku	Hacu:	Awoijku	Hacu:	Awoijku	Hacu:	Awoijku	Hacu:
0,0%	0,0%	70,2%	66,0%	40,8%	66%	55,3%	75%	47,03%	69%	60,6%	69,0%

PERCENTUALE DI IMBOZZOLAMENTO

N		M		A		B		C		D	
Awoijku	Hacu:	Awoijku	Hacu:	Awoijku	Hacu:	Awoijku	Hacu:	Awoijku	Hacu:	Awoijku	Hacu:
93,3%	89%	7,3%	2,0%	44,4%	16%	36,6%	15,0%	46,0%	25,0%	32,0%	10%

PERCENTUALE DI INCRISALIDAMENTO

N		M		A		B		C		D	
Awoijku	Hacu:	Awoijku	Hacu:	Awoijku	Hacu:	Awoijku	Hacu:	Awoijku	Hacu:	Awoijku	Hacu:
96%	94%	0,98%	0,3%	40,5%	19%	30,1%	10%	40,10%	12%	30,6%	7%

PERCENTUALE DI SFARFALLAMENTO

N		M		A		B		C		D	
Awoijku	Hacu:	Awoijku	Hacu:	Awoijku	Hacu:	Awoijku	Hacu:	Awoijku	Hacu:	Awoijku	Hacu:
98%	90,4%	0,36%	0%	89%	84,2%	91,2%	60%	74,2%	74,1%	89,1%	100%

PESO DEGLI ADULTI DEI DUE SESSI

N		M		A		B		C		D		
Sesso	Awoijku	Hacu	Awoijku	Hacu	Awoijku	Hacu	Awoijku	Hacu	Awoijku	Hacu	Awoijku	Hacu
♀	g. 7,90	4,80	g. -	-	g. 3,05	2,15	g. 3,40	2,40	g. 2,70	2,05	g. 3,00	2,20
			(1)	(1)								

1) Le farfalle appaiono più piccole che in C e non sono state pesate perchè si sono ottenuti solo una ♀ e quattro ♂.

stato messo in rilievo come conseguenza di un'alimentazione sub-normale una diminuzione del tasso di fosforo negli ovociti - l'Autore ha anche analizzato il tasso di fosforo in uova normali e in esperienze di subalimentazione quantitativa. Questo risultato mette in rilievo come in un prossimo saggio occorra aggiungere alla soluzione nutritiva da me usata qualche complesso fosforato.

5 - Le variazioni delle varie percentuali per i trattati con le rispettive soluzioni madre addizionate di Al, di Cu, di Fe di Mn non sembrano legate alla presenza dell'oligoelemento, ma piuttosto al diverso metabolismo delle due razze in esame. Infatti in Hacu a metabolismo più intenso che alla razza Awoijku i valori ottenuti sono più bassi. Nello stesso senso si può spiegare il fatto che in tale stipite gli sfarfallati erano per lo più

6 - Poiché l'acqua di fonte contiene tracce di tutti gli oligoelementi, l'influenza benevola sull'allevamento in condizioni di digiuno durante la 5^a età larvale - a cominciare dal 2^o giorno - è sul fenomeno della muta sia larvale che imaginale oltre che sulla riproduzione, appare dovuta alle sostanze organiche (glucidi, protidi e fattori di accrescimento) presenti nella soluzione madre.

RIASSUNTO

E' stato eseguito un primo saggio sul digiuno durante la V età in bachi spruzzato rispettivamente con acqua fontis e con soluzione nutritiva addizionata rispettivamente con oligo-elementi (Fe, Al, Cu, Co) in due razze l'una bivoltina e l'altra monovoltina.

I trattamenti hanno messo in rilievo una influenza benevola sia nella percentuale di imbozzolamento, che di incrisalidamento e di sfarfallamento, oltre che sulla riproduzione.

Tale influenza benevola appare dovuta più alle sostanze organiche (glucidi, protidi e fattori di accrescimento) presenti nella soluzione madre che agli oligo-elementi. Questo si spiega facilmente con la considerazione che tracce degli oligo-elementi necessari per l'attivazione dei processi durante le fasi metaboliche più intense possono essere a disposizione nelle riserve tissulari. Si sa infatti che molti oligo-elementi (Ag, Fe, Mn) sono immagazzinati più nelle prime età larvali che nell'ultima. Un nesto comportamento differenziale si mette in rilievo fra le due razze in esame, spiegabile con il metabolismo più intenso nella razza monovoltina per la quale appunto si sono ottenuti valori assai significativamente più bassi sia nei riguardi dell'imbozzolamento che dello sfarfallamento, (nel quale si sono ottenuti prevalentemente maschi).

RESUME

PREMIER ESSAI SUR LE JEUNE DES VERS A SOIE ASPERGES
AVEC DES SOLUTIONS NUTRITIVES AU COURS DU 5ème AGE;
COMPARAISON ENTRE UNE RACE BIVOLTINE (AWOIJKU) ET
MONOVOLTINE (HACU).

(Traduction)

L'auteur estime que pour étudier des phénomènes physiologiques tels que ceux relatifs à la mue, la reproduction ou divers aspects nutritionnels, il est avantageux d'employer le jeune larvaire, complété par une alimentation chimiquement définie (solutions de constituants simples, miscibles en toutes proportions). Dans les travaux japonais traitant des mêmes problèmes, la base alimentaire comporte toujours des produits organiques complexes tels que : cellulose, caséine, etc.

Dans ce premier essai, la solution nutritive utilisée sur des vers jeûnant au cours du 5ème âge, s'est montrée efficace, davantage par sa fraction organique que par les divers oligo-éléments testés séparément.

Il convient de considérer ce travail comme une tentative originale pouvant conduire à la résolution des problèmes délicats posés par l'alimentation préparée du ver à soie : isolement de substances encore inconnues de la feuille fraîche, par exemple.

(C. MANUNTA, Chaire de Biologie,
Faculté de Médecine de Sassari) .

SUMMARY

FIRST TEST ON THE FASTING OF SILKWORMS SPRINKLED WITH NUTRITIVE SOLUTIONS DURING THE 5th. INSTAR ; COMPARISON BETWEEN A BIVOLTINE BREED (AWOIJKU) AND A MONOVOLTINE BREED (HACU).

(Translation)

The author of this paper considers that in order to study such physiological phenomena as those relating to moulting, reproduction, or different nutritional aspects, it is more profitable to use larval fasting complemented with a chemically defined food (solutions of elementary components miscible in any proportion). In the Japanese works dealing with the same problems, the basic food always includes compound organic products such as cellulose, casein, etc.

In this first test, the nutritional solution used on fasting larvae during the 5th instar appeared to be more efficient by its organic fraction than by the different trace-elements tested independently.

This work should be considered as an original attempt likely to be conducive to the resolution of some critical problems yet unsolved as regards prepared food for silkworm raising, such as the isolating of fresh leaf elements which are still unknown to us.

(C. MANUNTA, Càtedra di Biologia,
Facoltà di Medicina, Sassari).

BIBLIOGRAFIA

- MANUNTA C. (1954) - Sul disegno cromatografico fluorescente e ninidrina-positivo in varie razze di bachi da seta Bombyx mori, durante lo sviluppo embrionale e larvale.
(Symposia Genetica, Vol. II).
- MANUNTA C. (1959) - Ricerche cromatografiche su carta sul metabolismo dell'azoto, anche in condizioni di digiuno, in varie razze di Bombyx mori.
(Symposia Genetica, Vol. VI, pp. 353-373).
- BAUD L. (1960) - Exposé des travaux de biochimie.
(Conf. Tech. Seric. Int., Murcie, Espagne).
- PASCAL M. (1960) - Vue d'ensemble des recherches sur l'alimentation permanente du ver à soie.
(II-Conf. Tech. Seric. Int., Murcie, Espagne).
- FLORKIN M., JEUNIAUX Ch. (1960) - Influence de l'alimentation sur la sécrétion de la soie, à la lumière de la connaissance de l'origine et du rôle des acides aminés de l'hémolymphe.
(II-Conf. Tech. Seric. Int., Murcie, Espagne).
- BOUNHIOL J.J. (1960) - Essais pour enrichir la nourriture des vers à soie par adjonction de diverses substances.
(II-Conf. Tech. Seric. Int., Murcie, Espagne).
- JOLLY M.S. (1960) - Effets de la gelée royale et du tiuracil sur le développement larvaire et sur la teneur azotée du sang de deux races parentes et de leurs hybrides chez la larve de Bombyx mori.
(II-Conf. Tech. Seric. Int., Murcie, Espagne).
-

Directeur-Gérant : A. Schenk — Dépôt Légal : 1^{er} Trimestre 1965

Imprimerie du Languedoc, Anduze (Gard)