

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse Naturali e Ambiente
CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE DELLE PRODUZIONI
VEGETALI
CICLO: XXVI

SELEZIONE DI RAZZE DI *Bombyx mori* AD ALTA EFFICIENZA NUTRIZIONALE E RELATIVE PROBLEMATICHE

Tesi di Dottorato



Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Antonio Berti

Supervisore: Dr.ssa Silvia Cappellozza

Co-supervisore: Ch.mo Prof. Andrea Battisti

Dottorando:
Alessio Saviane

Gennaio 2014

Declaration

I hereby declare that this submission is my own work and that, to the best of my knowledge and belief, it contains no material previously published or written by another person nor material which to a substantial extent has been accepted for the award of any other degree or diploma of the university or other institute of higher learning, except where due acknowledgement has been made in the text.

7 gennaio 2014

Alessio Saviane

A copy of the thesis will be available at <http://paduaresearch.cab.unipd.it/>

Dichiarazione

Con la presente affermo che questa tesi è frutto del mio lavoro e che, per quanto io ne sia a conoscenza, non contiene materiale precedentemente pubblicato o scritto da un'altra persona né materiale che è stato utilizzato per l'ottenimento di qualunque altro titolo o diploma dell'università o altro istituto di apprendimento, a eccezione del caso in cui ciò venga riconosciuto nel testo.

7 gennaio 2014

Alessio Saviane

Una copia della tesi sarà disponibile presso <http://paduaresearch.cab.unipd.it/>

Indice

RIASSUNTO	V
SUMMARY	VII
1 Introduzione generale	1
1.1 Alcuni cenni storici	1
1.2 La biologia del baco da seta	3
1.3 Le collezioni del CRA-API	7
1.3.1 Le risorse genetiche di <i>Morus</i> spp.	7
1.3.2 Le risorse genetiche di <i>Bombyx mori</i>	9
1.4 L'allevamento del baco da seta	12
1.5 L'efficienza nutrizionale negli stadi giovanili degli insetti	17
1.6 Le patologie del baco da seta	20
Bibliografia del capitolo 1	25
La selezione di larve dall'accresciuta efficienza alimentare	31
2 Rearing of <i>Bombyx mori</i> (Lepidoptera: Bombycidae) on artificial diet speeds up selection of monovoltine strains characterised by a high food conversion efficiency and silk productivity	33
2.1 Abstract	33
2.2 Introduction	34
2.3 Materials and methods	35
2.3.1 Silkworm strains	35
2.3.2 Selection strategy	35
2.3.3 Selection on artificial diet	35
2.3.4 Selection on leaf	36
2.3.5 Production assessment	36
2.3.6 Nutritional indexes	36
2.3.7 Statistical analysis	38
2.4 Results	38
2.4.1 Selection for silk production	38
2.4.2 Consumption traits	39
2.4.3 Efficiency traits	41
2.5 Discussion and conclusions	43
2.6 Acknowledgements	45

References of chapter 2	47
La conservazione delle uova polivoltine in <i>Bombyx mori</i>	51
3 Assessment of embryo viability in a polyvoltine strain of <i>Bombyx mori</i> L. (Lepidoptera, Bombycidae) exposed to low temperature	53
3.1 Abstract	53
3.2 Introduction	54
3.3 Materials and methods	55
3.3.1 Rearing and staging of eggs	55
3.3.2 Embryo survival after short and long cold storage	55
3.3.3 Effects of embryo cold storage on larval and pupal stages	56
3.3.4 Supercooling point	56
3.3.5 Statistical analysis	56
3.3.6 Results	57
3.3.7 Embryo survival after long storage	58
3.3.8 Discussion	59
3.4 Acknowledgements	61
References of chapter 3	63
<i>Enterococcus mundtii</i> : un nuovo patogeno per <i>Bombyx mori</i>	67
4 Identification of <i>Enterococcus mundtii</i> as a pathogenic agent involved in the “flacherie” disease in <i>Bombyx mori</i> L. larvae reared on artificial diet	69
5 Conclusioni generali	77
A Elsevier license	79

RIASSUNTO

Il baco da seta (*Bombyx mori* L.) è un insetto appartenente all'ordine dei lepidotteri, famiglia Bombycidae; è una delle due uniche specie rappresentanti il genere *Bombyx*, assieme a *Bombyx mandarina* M., suo progenitore ancestrale.

In passato, in Europa, il suo utilizzo era legato soprattutto al mondo agricolo ed alla produzione della fibra serica ma questo tipo di attività è andata scomparendo dal vecchio continente, a favore di alcuni Paesi asiatici, fra cui soprattutto la Cina, con basso costo della manodopera. A dispetto del declino di questo tipo di attività tradizionali, il baco da seta ha però cominciato ad essere utilizzato per applicazioni tecnologiche di alto profilo legate al mondo della ricerca scientifica e della bio-industria. Si sono indagati, da un lato, utilizzi che impiegano la seta come biomateriale e che mirano allo sfruttamento delle sue proprietà fisiche e chimiche sia su scala macroscopica sia su scala microscopica come nel campo delle nanotecnologie. Dall'altro lato, le scienze biologiche e le biotecnologie sono in grado di utilizzare l'insetto stesso, oppure colture cellulari da esso derivate come bio-fabbriche per la produzione di proteine altrimenti sintetizzate in batteri o lieviti. Poiché il baco da seta, rispetto ad altri organismi utilizzati per gli stessi scopi, è di dimensioni adeguate a sperimentazioni anche complesse, pur non richiedendo ampi spazi d'allevamento o elevate quantità di cibo, come ad esempio gli animali superiori, è facilmente allevabile in laboratorio e possiede un ciclo biologico breve (circa 45 giorni), rappresenta un ottimo modello per la ricerca di base nei campi delle scienze della vita. In tal senso, per rendere il *B. mori* un'appetibile piattaforma tecnologica, importanti passi avanti sono stati fatti con il sequenziamento del genoma e con la formulazione di diete artificiali in grado di svincolare l'allevamento dell'insetto, strettamente monofago, dalla produzione della foglia di gelso, reperibile solo stagionalmente nelle regioni a clima temperato.

Sullo sfondo di queste potenzialità tecnologiche e anche in relazione ad un rinato interesse da parte dell'industria del settore serico per una filiera produttiva extra-asiatica, va inquadrato il lavoro di ricerca presentato nella seguente tesi.

La sperimentazione descritta è, infatti, inquadrabile in una più generale attività di rilancio della ricerca di base riguardante il baco da seta ed in sintonia con le necessità di un potenziale settore produttivo localizzato in paesi climaticamente simili all'Italia. Il materiale di partenza, ossia le razze di *B. mori*, appartengono infatti alla banca di germoplasma del Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura – Unità di ricerca di

Apicoltura e Bachicoltura (CRA-API) di Padova; la collezione di accessioni è composta da circa 200 razze distinguibili sulla base di diverse caratteristiche fenotipiche e genotipiche.

Partendo dalla suddetta collezione, è stato compiuto un lavoro di selezione basato su una strategia di allevamento misto dieta-foglia finalizzato alla selezione di razze, caratterizzate da un'elevata efficienza alimentare sia su foglia di gelso sia su dieta sostitutiva, in modo da ottimizzare il rapporto costi-benefici in tutti quegli ambiti interessati ad aspetti di produttività. Come sopra ricordato, la strategia era basata su un approccio misto: un primo step, più tradizionale e orientato all'incremento dei parametri produttivi della seta in senso classico, era incentrato sull'allevamento con foglia, fornita senza limitazioni di quantità. Un secondo step prevedeva, invece, un ciclo d'allevamento su una dieta sostitutiva della foglia di gelso in cui la selezione per la produttività avveniva a fronte di un'alimentazione contingentata. Dopo tre anni in cui si sono svolte sei generazioni di selezione, le popolazioni originali sono state confrontate sia tra loro sia con le selezioni ottenute; per tale comparazione, sono stati utilizzati indici alimentari in grado di qualificare le larve secondo la loro efficienza nel convertire le proteine contenute nella matrice alimentare in massa corporea e seta.

La valutazione finale ci ha permesso di evidenziare come la strategia adottata, si sia rivelata efficace nel permettere la selezione dei caratteri desiderati sebbene, alcune differenze legate alla diversa adattabilità delle varie razze alla dieta artificiale, suggeriscano l'utilità dell'introduzione di una selezione preliminare per questo carattere.

Nell'ambito della sperimentazione finalizzata alla selezione delle razze ad alta efficienza sono stati condotti alcuni esperimenti complementari che hanno portato alla produzione di rilevanti dati scientifici. In primo luogo è stato isolato e caratterizzato un microorganismo, dimostratosi patogeno per il baco da seta allevato su dieta artificiale ed, in secondo luogo, sono state effettuate approfondite misurazioni sulla resistenza alle basse temperature da parte di uova di una razza polivoltina appartenente alla collezione del CRA-API.

I risultati esposti nel presente lavoro rappresentano, allo stato attuale, non un punto d'arrivo ma la tappa intermedia di un processo di selezione che verrà proseguito presso CRA-API oltre che la base di partenza per la produzione di nuovi ibridi dalle prestazioni migliorate ed allevabili, indifferentemente, su foglia e dieta sostitutiva con buone performances.

SUMMARY

The silkworm (*Bombyx mori* L.) is an insect belonging to the lepidopteran order, family Bombycidae: it is one of the two unique species belonging to the genus *Bombyx*, together with its ancestor – *Bombyx mandarina* Moore. In the past, silkworm exploitation in Europe was particularly related to the agricultural sector and the production of the silk thread but this type of activity has been disappearing from the old continent, in favour of some Asian countries, especially China, where cost of labour is low.

In spite of the decline of these traditional activities the silkworm started to be used as a tool in a lot of technological applications and as a model in scientific research in various fields. Silk is regarded as a promising biomaterial because of its physical and chemical features both on the macro and micro-scale as well as in nano-technologies. Furthermore biology and biotechnology are interested in silkworm, or in its cell cultures, as a bioreactor to produce recombinant proteins which should otherwise be produced in bacteria or yeasts. The silkworm has a suitable size even for complex experiments with respect to other organisms used for the same aims, however it does not require large rearing rooms or high quantity of food, it can be easily reared under controlled conditions and its biological cycle is short (it lasts about 45 days), representing thus, also a model for basic research in life sciences. Moreover, to use the silkworm as a technological platform, important steps were achieved by sequencing the whole genome and by developing new optimized artificial diets for this insect (strictly monophagous), which freed rearing from seasonal constraints coming from mulberry leaf production in temperate climates.

Thus, the above-mentioned new potentialities and a revived interest from the textile industry, about a silk supply chain outside Asia, establish the background of the research work described in this thesis. In fact, performed experiments relate with relaunching basic research activities about *B. mori* and aimed at meeting the needs of a silk industry, possibly developing in temperate countries.

The starting material, that is the *B. mori* strains, belongs to the germplasm collection of Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura – Unità di ricerca di Apicoltura e Bachicoltura (CRA-API) of Padua and consists of about 200 strains, which differ in their phenotypic and genotypic characteristics.

From the aforementioned collection, a selection process based on a mixed rearing strategy on both mulberry leaves and artificial diet has been started. The final goal was to select new strains characterized by high nutritional

efficiency in order to optimize the cost-benefit ratio in all those application oriented to productivity. As already stated selection was based on a mixed approach: the first and more traditional step consisted in rearing silkworm larvae on mulberry leaf without any limitation in its quantity, by selecting only for the most important commercial parameters. On the other hand, the second step was a rearing cycle on artificial diet with a limited food amount fed to fifth instar larvae, followed by a selection process according to the most important productive traits.

After three years and six generations of selection and genetic improvement, the obtained strains were compared among each other and with the unselected populations on the base of nutritional indexes which permitted an assessment of their conversion efficiency of proteins contained in the food matrix to body mass and silk.

The final evaluation allowed to highlight the efficacy of the adopted strategy in selecting the desired features, although a difference related to diverse adaptability of the strains to the diet was recorded. In particular, for some of them, an additional preparatory step of selection on diet appears to be appropriate.

During the period when experiments aimed at selection of highly efficient strains were performed, other relevant experimental data were produced. First of all, a new micro-organism which proved itself to be pathogenic for the silkworm reared on artificial diet was isolated and characterized; then, in-depth measurements about cold hardiness of eggs of a polyvoltine silkworm strain belonging to CRA-API's collection were carried out.

Described results to date do not represent the final goal but, an intermediate stage of a selection process that will continue at CRA-API and also, the starting point for the production of new hybrids with improved performances and suited to be reared on both mulberry leaf and artificial diet.

1

Introduzione generale

1.1 Alcuni cenni storici

IL baco da seta rappresenta un esempio più unico che raro di come la domesticazione totale di un insetto selvatico sia riuscita a produrre una nuova specie totalmente dipendente, per la propria sopravvivenza, dall'uomo e da un sistema di allevamento in condizioni controllate. L'inizio di questo processo, stando ai più antichi riferimenti storici, risale ad alcuni millenni a.C. ed è collocabile nella regione asiatica posta alla falde dell'Himalaya dove vive ancora il *Bombyx mandarina* Moore da cui si pensa derivi il *Bombyx mori* (il baco da seta comunemente detto). Nelle regioni asiatiche, esistono oltre al *B. mandarina*, diversi lepidotteri selvatici noti per la loro capacità di produrre seta sfruttabile per la produzione di filati, anche se di qualità inferiore a quelli ottenibili dal bozzolo del baco da seta. Comunque, nonostante questo, la seta utilizzata come materia prima dall'industria tessile è rappresentata quasi totalmente dalla fibra serica di *B. mori*.

Sebbene le evidenze storiche facciano risalire l'allevamento del baco già al 2500 a.C. questa pratica, nota allora solo in oriente, non si diffuse al di fuori dei confini dell'impero cinese poiché i segreti riguardanti l'allevamento, la produzione delle uova e la trattura vennero gelosamente custoditi attraverso l'applicazione, anche della pena capitale, contro chi tentava di violarne il segreto. Per tale ragione l'Europa entrò in possesso delle prime uova di baco da seta solo intorno al VI secolo d.C. attraverso una modalità che affonda le proprie radici nella leggenda. Si attribuisce infatti al coraggio di due monaci, che trafugarono alcune uova e le nascosero all'interno del loro bastone da viaggio cavo, l'introduzione della bachicoltura in Europa orientale. Da qui, rapidamente, questa pratica che trovò terreno fertile in molti paesi caratterizzati da un clima adatto all'allevamento, si diffuse in Spagna, Italia meridionale, Francia, Austria ed anche in alcuni paesi

del nord Europa seppur con minore fortuna. Tra tutti, fu però l'Italia il paese che seppe trarre i maggiori benefici da questa attività sia per ragioni climatiche legate all'allevamento del baco e alla coltivazione del gelso (la pianta le cui foglie costituiscono l'unica fonte di nutrimento per questo insetto strettamente monofago) sia per un'azione politica che promosse il fiorire della pratica bachicola e delle attività artigianali ad essa collegate fino a rendere la penisola il più importante produttore occidentale.

Questa rapida espansione attirò attenzioni e risorse che vennero impiegate in un processo di razionalizzazione in grado di trasformare, col passare dei decenni, l'allevamento del baco da seta da una attività a conduzione familiare, basata su conoscenze tramandate oralmente, ad una pratica razionale corredata da una importante letteratura tecnico-scientifica. Nei recenti secoli passati la bachicoltura ha poi attraversato momenti di forte crescita ed espansione contrapposti a grandi crisi determinate anche dalla diffusione di nuove patologie ora del gelso, ora del baco da seta. Nonostante questo però nei secoli XVIII e XIX gli aspetti tecnico-scientifici legati all'industria bachicola, mostrano un forte sviluppo sulla spinta dei risultati delle ricerche scientifiche prodotte in Italia, ponendo le basi della moderna bachicoltura fino a cambiare il volto dell'attività. Si comincerà infatti a riservare l'allevamento delle razze pure ad entità specializzate che produrranno poi gli incroci ed i poliibridi ancora oggi impiegati ed apprezzati per la loro produttività e la resistenza alle malattie.

Durante il XX secolo, i due conflitti mondiali ebbero un forte effetto depressivo sulla produzione mondiale ed italiana di seta ed il processo d'industrializzazione che li seguì, diede un'ulteriore colpo ad un settore già in difficoltà. A cavallo tra gli anni ottanta e novanta arrivò poi – ultimo in ordine di tempo – il fenomeno della mancata filatura dovuto all'impiego, in frutticoltura, di un insetticida ad effetto iuvenilizzante in grado d'impedire il superamento dello stadio giovanile e la filatura del bozzolo (L. Cappellozza, S. Cappellozza e Miotto, 1992; Monconduit e Mauchamp, 1999). L'insieme di questi fattori, uniti a costi di produzione sempre più alti, determinò lo spostamento della bachicoltura verso paesi in cui c'era ampia disponibilità di manodopera a basso costo. Tra questi la Cina in particolare è oggi leader, coprendo più dell'ottanta per cento dell'intera produzione mondiale (International Sericultural Commission, 2013) anche se, negli ultimi anni, alcuni segnali fanno pensare che la produzione di seta possa, anche in questo Paese, andare incontro ad una flessione tanto da suscitare le preoccupazioni di quei settori dell'industria che basano la propria attività sulla fibra serica.

E' importante infine ricordare che oggi il gelso e il baco da seta, ossia l'ossatura portante dell'industria bachicola, per essere correttamente inquadrati in un mondo in rapida evoluzione e sempre alla ricerca di nuove tecnologie, vanno anche pensati in maniera innovativa. Per quanto riguarda il gelso, alcuni esempi di utilizzo alternativo prevedono l'impiego delle piante come produttori di biomassa (Lu et al., 2009), come strumenti per la fitorimediazione (Olson, Flechter e Philp, 2001) oppure per la produzione di foraggio (Sanchez, 2002). Il baco da seta è invece un importante modello per la ricerca di base (Goldsmith, Shimada e Abe, 2005; Nagaraju e Goldsmith, 2002) e

può essere impiegato per indagare nuovi principi attivi (Hamamoto, Tonoike et al., 2009) ed i relativi meccanismi di azione e trasporto (Hamamoto, Kamura et al., 2005). Notevole interesse destano inoltre le possibilità di sfruttare le grandi capacità di sintesi proteica di *B. mori* e della ghiandola della seta in particolare, per usare la larva come bioreattore (Kato et al., 2010; Tatemastu, Sezutsu e Tamura, 2012) così come gli impieghi medicali e cosmetici di quelli che erano un tempo considerati prodotti di scarto quali le crisalidi (Winitchai et al., 2011; Wei et al., 2009) e la sericina dell'acqua di sgommatura (Wu, Z. Wang e Xu, 2007; Limpeanchob et al., 2010).

1.2 La biologia del baco da seta

Il ciclo biologico del baco da seta, è caratterizzato da tutte le fasi tipiche di un insetto olometabolo ossia, di un insetto che attraversa quattro fasi morfologicamente ben distinte. Il punto di partenza è l'uovo al cui interno si svilupperà un embrione, in grado di dare origine ad una larva che dopo una successiva serie di mute (nella maggior parte dei casi quattro) filerà, rinchiudendosi, in un bozzolo di seta dove avverranno due ulteriori trasformazioni (mute). La prima farà sì che la larva diventi pupa mentre la seconda porterà allo sfarfallamento dell'adulto. Le farfalle, seppur munite di ali, sono incapaci di volare ad una volta uscite dal bozzolo sericeo, si accoppiano e nell'arco della stessa giornata depongono le uova chiudendo così il ciclo biologico.

L'uovo di *B. mori* è costituito da un guscio proteico a struttura lamellare relativamente rigido e resistente prodotto dalle cellule follicolari materne. La sua lunghezza è di circa 1,20 mm e la larghezza di circa 0,80 mm mentre, si presenta schiacciato sulla rimanente dimensione, con una leggera depressione centrale che può essere più o meno accentuata a seconda della razza. Il colore del guscio è geneticamente determinato ed è apprezzabile dopo la nascita della larva, esibendo un fenotipo che nella maggior parte dei casi esprime un guscio trasparente oppure, trasparente con delle tonalità di verde anche se non mancano mutanti per questa caratteristica. Ad una estremità dell'uovo è presente un micropilo che, al momento della deposizione, consente la fecondazione dell'uovo da parte degli spermatozoi raccolti dalla farfalla femmina durante l'accoppiamento all'interno di una struttura denominata *bursa copulatrix*.

A deposizione avvenuta ci sono principalmente due scenari possibili per lo sviluppo embrionale. Il primo, prevede un andamento continuo dell'embriogenesi fino al momento della schiusa ed è tipico delle razze tropicali, in cui la caratteristica del polivoltinismo è diffusa e legata alla disponibilità di foglia di gelso su tutto l'arco dell'anno. Il secondo scenario è invece quello caratteristico delle razze monovoltine, adattate ai climi con forte stagionalità, dove la pianta di gelso durante il periodo invernale non produce foglie. In quest'ultimo caso l'embrione arresta il proprio sviluppo dopo circa quarantotto ore, riducendo il metabolismo al minimo ed entrando in diapausa. Inizia a questo punto una fase detta di "estivazione" in cui



Figura 1.1: Uova deposte da adulti di *B. mori* appartenenti a diverse razze. Le uova mostrano una parte della variabilità espressa a livello della pigmentazione dell'uovo in base alla razza. Il colore dell'uovo è determinato dal genotipo della membrana sierosa collocata al di sotto del guscio che è di origine embrionale. Si notino, ad esempio, le uova rosse determinate del mutante "Red egg", quelle grigio scuro delle razze giapponesi (in alto a destra) e quelle grigio chiaro di una razza cinese (in basso a destra). Fatta eccezione per alcuni mutanti, le uova, al momento della deposizione, vengono fissate al substrato da una secrezione delle ghiandole colleteriche.

le uova vengono stoccate a temperatura ambiente, prima di iniziare una graduale discesa di quest'ultima fino a 5 °C, quando comincia la fase detta di "ibernazione". Una volta che le uova hanno superato un numero minimo di ore di freddo, sono pronte per la schiusa che può avvenire in maniera ottimale in uno spazio temporale limitato; superato questo intervallo la percentuale di schiusa inizierà a decrescere fino ad azzerarsi. Per la grande importanza che ha in campo sperimentale, vale la pena ricordare la possibilità di far nascere in maniera estemporanea le uova tramite un opportuno trattamento. Si può, in particolare, decidere di eseguire un trattamento termico con acido cloridrico dopo venti ore dalla deposizione, per ottenere una schiusa immediata delle uova impedendo l'entrata in diapausa, oppure, ricorrere all'ibernazione abbreviata. In quest'ultimo caso l'uovo viene portato a 5 °C quando è "a seme marrone" (si veda più avanti nel capitolo) e dopo quaranta giorni è possibile ottenere la ripresa dello sviluppo embrionale, sempre ricorrendo ad un trattamento termico con acido cloridrico (Various Authors, 1978).

Al di sotto del guscio che è, come detto sopra, geneticamente determinato dalla farfalla femmina, si trova una membrana pigmentata di origine embrionale detta "sierosa". La pigmentazione in oggetto definisce il colore dell'uovo visibile ad occhio nudo prima della schiusa segnalata dallo "sbianchimento", ossia dal viraggio ad una tonalità più chiara del colore dell'uovo determinato dalla larva che, ormai pronta a schiudere, inizia a rosicchiare la membrana che la circonda prima di forare il guscio. L'uovo appena deposto è giallo citrino mentre, dopo circa 40 ore, comincia a mostrare una pigmentazione color marrone (uova a "seme marrone") che cambierà, entro il giorno suc-

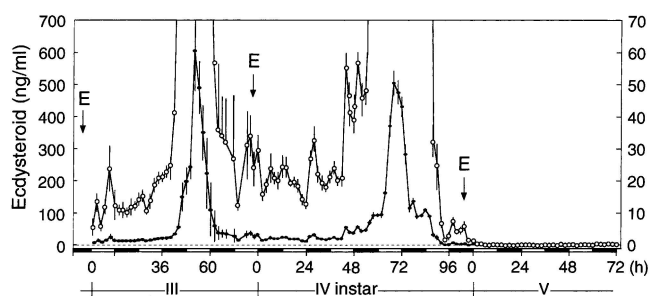


Figura 1.2: Grafico dei picchi di ecdisteroidi nell'emolinfa tra la III e l'inizio della V età (da Takaki e Sakurai (2003)). La lettera E indica il momento della muta. L'ampia oscillazione del titolo ormonale, rende necessaria una diversa scala sugli assi delle ordinate di destra e di sinistra per rappresentare l'ampiezza della fluttuazione. L'asse di sinistra (pallini pieni) ha una scala di un ordine di grandezza superiore.

cessivo, fino ad assumere la colorazione definitiva. Durante la fase centrale dell'incubazione, la colorazione caratteristica dipende dalla razza ed è, per la maggior parte di quelle di origine giapponese, grigio plumbeo. Le razze di origine cinese, hanno invece un uovo che presenta delle tonalità di grigio molto più chiare mentre, le razze polivoltine, hanno un comportamento diverso, con un guscio di colore giallo che si pigmenta solo in prossimità del momento della nascita. Esistono poi, in aggiunta a queste colorazioni tipiche, diverse mutazioni ed eccezioni al colore della sierosa.

Dopo un'incubazione di 8-10 giorni a 26-27 °C con un'umidità relativa dell'ottanta per cento circa, le larve escono dall'uovo ed iniziano ad alimentarsi voracemente. Lo sviluppo degli stadi giovanili del baco da seta, procede velocemente e si compie in circa 25-27 giorni attraverso un processo di accrescimento discontinuo che passa per quattro mute durante le quali, l'insetto non si alimenta e cambia esoscheletro per consentire la distensione delle accresciute masse corporee. La maggior parte delle razze giunge a maturità dopo quattro mute ma esistono, anche in questo caso, delle eccezioni sia in un senso sia nell'altro che possono avere una base genetica, caratteristica della razza in esame, oppure essere la risposta ad uno stress ambientale esterno. In ogni caso il processo della muta è governato dai livelli di ormone giovanile e di ecdisone presenti nell'emolinfa e che esercitano effetti opposti sui tessuti della larva; la loro secrezione avviene attraverso la via endocrina formata da cervello-ghiandole protoraciche-corpora allata. Durante le prime mute, la secrezione di ormone protoracicotropico da parte del cervello, stimola le ghiandole protoraciche a secernere ecdisone (vedi Fig. 1.2) e questi picchi ormonali, in presenza di un alto titolo di ormone giovanile secreto dai corpora allata, determinano una muta larva-larva. Tra la fine della IV età e l'inizio della V avvengono poi, alcune modificazioni a carico delle ghiandole protoraciche che preparano la larva alla successiva trasformazione in crisalide.

Verso la fine della quarta età, le ghiandole protoraciche diventano più sensibili all'ecdisone ed un meccanismo di feedback negativo abbassa la

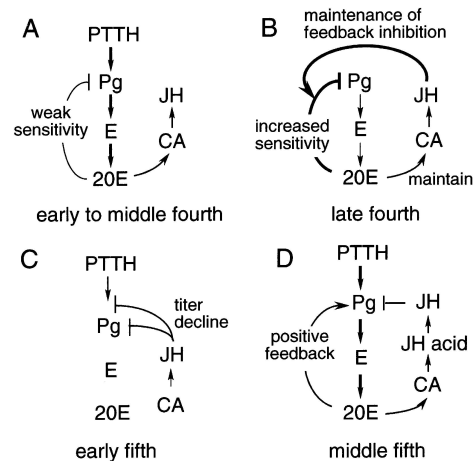


Figura 1.3: La figura evidenzia i cambiamenti che avvengono a livello ormonale tra la fine della IV età e l'inizio della V. A: l'ormone giovanile non inibisce l'attività delle ghiandole protoraciche che in B non ricevono più lo stimolo dell'ormone protoracicotropico. Contemporaneamente il 20-idrossiecdisone inibisce, attraverso un meccanismo a feedback negativo, la sua stessa produzione determinando quindi un abbassamento dell'ormone giovanile (C). La scomparsa di quest'ultimo e la ripresa dell'attività delle ghiandole protoraciche, induce la secrezione di una forma inattiva dell'ormone giovanile che verrà convertito in attivo nei dischi immaginali (D).

loro attività di secrezione. Questo, unito ad un'attività esterasica, porta il titolo di 20-idrossiecdisone (20E) ad un livello estremamente basso e che sembra essere cruciale per l'inizio dei cambiamenti, in grado di portare alla metamorfosi larva-pupa. Il 20E stimola i corpora allata a secernere ormone giovanile (JH) ma la caduta dei suoi livelli nell'emolinfa, causa un abbassamento della concentrazione di JH. Questo abbassamento, unito alla diminuzione del titolo di ecdisone, libera le ghiandole protoraciche dallo stato d'inibizione e la produzione di ecdisteroidi riprende inducendo, nei corpora allata, il rilascio di una forma inattiva dell'ormone giovanile che verrà quindi convertito in quella attiva nei dischi immaginali. Il meccanismo appena descritto è schematizzato in Figura 1.3 (da Takaki e Sakurai (2003)) e, nel suo insieme, rappresenta la serie di reazioni che attivano il programma in grado di portare all'ultima muta larvale e quindi alla trasformazione in pupa (Takaki e Sakurai, 2003; Chen e Gu, 2006; Gilbert, Rybczynski e Warren, 2002).

La trasduzione del segnale di queste vie, i loro punti di controllo ed i cambiamenti che interessano questi meccanismi nel corso dei vari stadi di sviluppo, ancorché non totalmente chiariti, sono mediati da diverse proteine e dalle loro modificazioni e nel loro insieme - anche in risposta a stimoli esterni quali il fotoperiodo e l'alimentazione - regolano lo sviluppo ed il destino della larva di *B. mori* dallo stadio giovanile a quello adulto.

Il quinto stadio larvale, giunto a maturità, esibisce un comportamento tipico che anticipa il momento della filatura del bozzolo. La larva smette di alimentarsi, si libera di tutto il contenuto intestinale (compie cioè la

cosiddetta purga) e la cuticola diventa traslucida. Parallelamente inizia anche a cercare un supporto su cui salire ed a cui fissarsi tramite una lassa trama di fili di seta che costituiranno la spelaia. Ad ancoraggio avvenuto comincia la filatura del bozzolo vero e proprio tramite la secrezione della bava serica attraverso un organo impari detto filiera.

La seta all'interno delle ghiandole, ha una consistenza simile ad un gel ma durante il passaggio nella filiera, cambiamenti nella concentrazione d'acqua e nel valore del pH, unitamente alle forze su di essa applicate ed al contatto con l'aria, conferiscono alla fibra le sue proprietà definitive (Li et al., 2001; Holland et al., 2007). La larva, attraverso un movimento ad otto del capo, sfrutta queste peculiarità e depone strati successivi di fibra serica fino a costruirsi un involucro protettivo all'interno del quale, nel giro di circa 4 giorni, avverrà la trasformazione in crisalide. Serviranno poi altri 10-12 giorni per la trasformazione in adulto e la successiva fuoriuscita dal bozzolo.

Gli adulti maschi appena emersi e fuoriusciti dalla corteccia serica, hanno un comportamento contraddistinto da un frenetico battito d'ali (le appendici alari non sono però in grado di sostenere il volo in nessuno dei due sessi) e dalla ricerca delle femmine per l'accoppiamento. Queste ultime hanno invece un atteggiamento più pigro e sono quasi immobili. Successivamente all'accoppiamento, la farfalla femmina inizia a deporre le uova che vengono fecondate al momento della deposizione e fissate ad un supporto, tramite una secrezione prodotta dalle ghiandole colleteriche. Incapaci di nutrirsi a causa della degenerazione dell'apparato boccale avvenuta durante la trasformazione in adulto, le farfalle muoiono dopo alcuni giorni, una volta esaurite le riserve energetiche accumulate negli stadi giovanili.

1.3 Le collezioni del CRA-API

1.3.1 Le risorse genetiche di *Morus* spp.

La sede padovana del CRA-API rappresenta un'importante banca di germoplasma sia per quanto riguarda il baco da seta sia per il gelso, a cui questo insetto è tradizionalmente legato. La collezione di gelso è composta da circa 60 cultivar che sono state acquisite nel corso degli anni, in relazione all'attività sperimentale svolta, ed in seguito ad accordi stipulati con altri enti di ricerca internazionali come ad esempio, per citare l'ultimo in ordine di tempo, quello con l'INRA (L'INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE; Unità Sericola Nazionale - sede di Lione). All'interno della collezione sono rappresentate diverse specie di gelso (per esempio *alba*, *multicaulis*, *nigra*, ecc.) di cui, una parte, utilizzate in parcelle monocultivar sfruttate per la raccolta delle foglie impiegate nell'allevamento delle larve. Altre varietà hanno scarsa rilevanza come alimento per il baco da seta ma hanno delle potenzialità, ad esempio, come pianta da frutto ed altre ancora rappresentano un importante serbatoio per la biodiversità.

Il gelso (genere *Morus*) si comporta come una pianta decidua nelle regioni a clima temperato ma è in grado di crescere bene anche in climi sub-tropicali

e tropicali, mostrando un ampio areale esteso a climi e latitudini anche molto diversi tra loro. A dispetto di questa estensione e dell'importanza che ha rivestito l'essenza arborea negli anni di intenso sviluppo della bachicoltura mondiale, gli studi sulla sua classificazione sono incompleti e necessiterebbero di una revisione e riorganizzazione, utilizzando tecniche basate su metodi molecolari (Botton et al., 2005) in grado di andare oltre le differenze fenotipiche dovute a fenomeni di adattamento e naturalizzazione. I metodi tassonomici più frequentemente usati, fanno infatti riferimento ai caratteri agronomici della pianta, rendendo difficile la classificazione delle varie specie che si sono via via acclimatate alle diverse regioni climatiche di destinazione (A. Sharma, R. Sharma e Machii, 2000). Inoltre, il lavoro svolto da Botton et al. (2005) ha evidenziato come alcune accessioni presenti all'interno della collezione del CRA-API ed etichettate come appartenenti a specie diverse, nascondano - mascherate da fenotipi differenti - genotipi uguali. Principalmente e non solo per questi motivi, andrebbe pensata una riscrittura dei registri varietali basata su dati tassonomici affidabili e prodotti globalmente con le stesse metodologie, in modo da poter correttamente inquadrare la biodiversità del gelso.

Da un punto di vista genetico invece, il *Morus* si presenta come diploide ($2n=56$) anche se non mancano cultivar a diversa ploidia sia naturalmente esistente che artificialmente indotta (A. Sharma, R. Sharma e Machii, 2000). Partendo da popolazioni naturali, le diverse specie di gelso sono state selezionate nel corso degli anni, attraverso processi di ibridazione controllata e mutagenesi per ottenere ed esaltare le caratteristiche desiderate. Una volta raggiunto l'obiettivo le cultivar vengono riprodotte per talea e potate in maniera opportuna in base all'utilizzo finale della pianta.

Nonostante la storia del gelso risulti indissolubilmente legata alla bachicoltura, è comunque riduttivo limitare le potenzialità di questa pianta al solo allevamento del baco da seta. In base alle caratteristiche delle diverse parti della pianta, esistono infatti numerosi campi d'impiego non legati alla pratica bachicola e ormai ben documentati a livello scientifico. L'elevato contenuto proteico, unito al basso contenuto in fibra e all'ottimo apporto minerale, rendono la foglia di gelso un eccellente alimento per la produzione zootecnica con possibile impiego sia per i ruminanti sia per i monogastrici (Various Authors, 2002; Micheletto, 2005).

Il gelso può inoltre essere impiegato in frutticoltura grazie alla sua capacità di produrre sorosi o more anche in grande quantità. Una pianta può infatti arrivare a produrre, su legno di due anni, fino a 200 Kg di materiale anche se la raccolta presenta alcuni problemi legati alla maturazione scalare ed alla difficile meccanizzazione del processo tipica di altre colture come, ad esempio, il lampone. Similmente a quest'ultimo, il frutto è molto ricco in composti biologicamente attivi tra cui alcuni acidi fenolici, flavonoidi, vitamine ed altre sostanze che, nel loro insieme, rendono questo prodotto interessante per applicazioni inquadrabili nel settore della nutraceutica e dell'alimentazione funzionale (DeFelice, 2002; Kalra, 2003; Keservani et al., 2010). In aggiunta al frutto, molti composti attivi sono presenti all'interno delle radici, della corteccia ed anche della foglia e le proprietà di queste

molecole vanno dall'attività antivirale al controllo della glicemia passando per una serie di altri effetti sistemici (Yatsunami, 2011; Ramesh, Basha e Lakshmi, 2003). Vale infine la pena di ricordare la possibilità d'impiegare il gelso nella bonifica di terreni inquinati tramite fitorimediazione (Rafati et al., 2011; Olson, Flechter e Philp, 2001).

1.3.2 Le risorse genetiche di *Bombyx mori*

Importanti banche di germoplasma di baco da seta si trovano in quei paesi dove, in passato, la bachicoltura ha avuto o ha ora un ruolo di primo piano nello sviluppo delle comunità locali. Grandi collezioni si trovano perciò in Giappone, Cina, India e Corea mentre in Europa, la collezione maggiormente significativa è quella mantenuta presso il CRA-API di Padova dove vengono annualmente riprodotte circa 200 razze di *Bombyx mori*. Una stima globale valuta in circa 3000 il numero di razze mantenute tra oriente ed occidente anche se, la non univoca denominazione, lascia presupporre un'approssimazione per eccesso di questa cifra. In base a caratteristiche morfologiche e fenotipiche, i diversi gruppi vengono classificati come appartenenti ad uno di quattro principali raggruppamenti esistenti. In particolare, le razze aventi larve con tegumento pigmentato e bozzolo a forma di arachide con una costrizione trasversale sull'asse maggiore, sono classificate come giapponesi mentre, quelle con larve dal corpo senza pigmentazione e bozzolo sferico sono classificate come razze cinesi (vedi Fig. 1.4). A livello europeo, minore importanza rivestono le razze tropicali caratterizzate da un'elevata resistenza a condizioni climatiche avverse ma penalizzate da una scarsa produttività e vincolate alla necessità di allevamenti continui possibili, in condizioni normali, solo nei paesi dove il clima permette al gelso di vegetare durante tutto l'anno. Ci sono infine le razze europee con larve dal corpo allungato, molto sensibili al parassita *Nosema bombycis* e contraddistinte da bozzoli di forma ellittica con una costrizione mediale più o meno accentuata e bozzoli bianchi o di color carneo. Esistono poi, in aggiunta alle razze propriamente dette, un notevole numero di mutanti distinguibili sulla base delle caratteristiche conferite dalla mutazione stessa che può avere effetto a livello fenotipico, biochimico, metabolico, ecc.

Il mantenimento di un adeguato pool genico da parte di quegli istituti che svolgono il ruolo di banche genetiche, oltre a rappresentare una risposta al problema della conservazione della biodiversità, è importante, sia per la produzione di ibridi utilizzabili per la produzione di seta finalizzata ad impieghi nel tessile sia per disporre di risorse utili a riempire eventuali nicchie ecologiche o per fronteggiare richieste ora imprevedibili. Infatti, come in passato è stato necessario importare razze giapponesi poco sensibili al *N. bombycis* per poter rilanciare la bachicoltura europea messa in ginocchio da questo parassita così, in futuro, la plasticità offerta da un determinato genotipo potrebbe rappresentare la risposta ad uno stress specifico.

La seppur esigua produzione di bozzoli, ristabilitasi in Italia negli ultimi anni ed una eventuale prospettiva di ripresa degli allevamenti, sostenuta dall'aumento del prezzo della seta e da un calo della produzione da parte

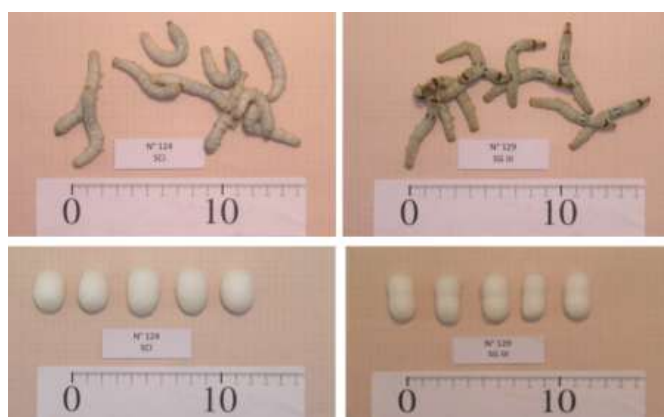


Figura 1.4: In alto a sinistra, larve con fenotipo cinese caratterizzate dall'assenza di pigmentazione; sulla destra il tipo giapponese pigmentato. In basso a sinistra, il tipico bozzolo cinese di forma sferoidale e sulla destra, quello giapponese, con la peculiare costrizione a livello mediale che conferisce la forma ad “arachide”.

della Cina, attuale monopolista o quasi, danno una misura del valore della collezione di germoplasma del CRA-API per applicazioni pratiche, stimolando anche un'opera di selezione delle razze e di produzione di ibridi e poliibridi che va portata avanti su una scala temporale pluriennale.

Alle attività tradizionali appena elencate, vanno anche affiancate tutte le applicazioni scientifiche e quelle pronte per impieghi commerciali nate da tecnologie innovative sviluppate negli ultimi quindici anni. Rispetto ad altri lepidotteri, il baco da seta presenta il vantaggio di avere oltre 400 mutazioni note a carico di diversi *loci*, ognuno in genere con 2-3 varianti alleliche, che lo rendono un eccellente strumento per studiare i diversi meccanismi fisiologici in base alle alterazioni causate dalle mutazioni. I diversi mutanti, spontanei o indotti, hanno ad esempio reso possibile lo studio di vie metaboliche coinvolte nella produzione di pigmenti, di pattern di differenziazione embrionale e la produzione di individui polifagi (Goldsmith, Shimada e Abe, 2005). Negli anni sono stati inoltre sviluppati diversi tool molecolari in grado di permettere lavori di classificazione, l'identificazione di geni collegati a meccanismi di resistenza a patogeni e la creazione di mappe di linkage (Nagaraju e Goldsmith, 2002).

Come organismo modello, il *B. mori* trova impiego anche in vari campi della farmacologia. I meccanismi aspecifici di trasporto della larva, rendono la cinetica di assorbimento dei principi attivi iniettati nella parte mediana dell'apparato digerente simile a quella dei mammiferi e governata dal profilo d'idrofobicità della molecola e dalla sua massa molecolare (Hamamoto, Kamura et al., 2005). Altre ricerche hanno inoltre evidenziato che metabolismo, tossicità cellulare, reazioni col citocromo P450 e via di secrezione dei principi attivi sono simili tra il baco da seta e il topo, candidando questo lepidottero come possibile alternativa negli studi di farmacocinetica. Il suo impiego in questo tipo di sperimentazioni implicherebbe minori questioni etiche, un uso di piccole quantità di farmaco e la possibilità di operare in ambiente sterile

(Sumida e Ueda, 2007) su piccola scala con abbondanza di animali a basso costo (Hamamoto, Tonoike et al., 2009; Hamamoto, Urai et al., 2012).

Dal 2000 Tamura et al. (2000) hanno inoltre dimostrato la possibilità di produrre larve transgeniche in grado di esprimere stabilmente dei costrutti genici opportunamente disegnati, aprendo la via ad una serie di applicazioni biotecnologiche in grado di sfruttare le enormi capacità di sintesi proteica di questo lepidottero (Tatemastu, Sezutsu e Tamura, 2012; Kato et al., 2010). In base al promotore collocato a monte del transgene, si può pilotarne l'espressione affinché avvenga in tutto il corpo (usando ad esempio il promotore dell'actina) oppure in un distretto specifico come la ghiandola della seta. Giocando su questi fattori, è quindi possibile produrre delle proteine ricombinanti sfruttando le sequenze dei quattro prodotti proteici rintracciabili all'interno della ghiandola della seta: la sericina, la fibroina (divisa in catena leggera e pesante) e la fibroexamerina (Tatemastu, Sezutsu e Tamura, 2012). I peptidi, una volta sintetizzati, andranno poi incontro a modificazioni post-traduzionali simili a quelle degli organismi superiori, essendo questi prodotti all'interno di una cellula eucariote. Questo, unitamente alla scelta di un opportuno promotore, ha fatto sì che oggi, più proteine siano in fase di valutazione per una imminente commercializzazione ed altre siano già state immesse sul mercato (Kato et al., 2010).

E' anche interessante notare che alcuni prodotti, un tempo considerati scarti della filiera della seta, sono ora utilizzabili per sviluppare trattamenti ed additivi per le industrie cosmetiche ed alimentari. Le crisalidi ottenute da bozzoli non adatti alla filatura per mancanza dei necessari requisiti qualitativi o lavorati in maniera diversa, possono rappresentare una fonte di oli di elevata qualità da impiegare sia come integratori alimentari sia come ingredienti nella formulazione di presidi medici per la cura del corpo. La miscela di acidi grassi ottenibile dalle pupe mediante estrazione in condizioni super-critiche (Wei et al., 2009), è infatti ricca di ω -3 e altri grassi insaturi in grado di modulare la risposta infiammatoria ed il metabolismo lipidico. Note sono anche le proprietà anti-tirosinasiche e di abbattimento di molecole altamente reattive come i radicali liberi (Winitchai et al., 2011).

Il bozzolo, prima della trattura necessaria per ottenere il filo di seta, viene "sgommato", ossia messo a macerare in acqua calda con l'eventuale aggiunta di sostanze chimiche. Questa procedura ha lo scopo di rimuovere la sericina in grado di mantenere compatta la bava di fibroina, che costituisce la parte utilizzabile nel processo di trattura, e fino ad ora rappresentava uno scarto inquinante dall'elevato contenuto di azoto. Oggi invece, l'acqua di sgommatura può essere vista come una fonte di sericina impiegabile nell'industria cosmetica per il confezionamento di prodotti anti-ageing e di contrasto all'azione dei radicali liberi (Wu, Z. Wang e Xu, 2007). Due studi riportano inoltre la capacità di abbassare il quantitativo di colesterolo assorbito, di migliorare il rapporto HDL/LDL nonché un'attività protettiva contro il cancro al colon lasciando intravedere, per la sericina, un impiego come supplemento alimentare (Limpeanchob et al., 2010; Kaewkorn et al., 2012).

1.4. L'ALLEVAMENTO DEL BACO DA SETA

Tabella 1.1: *Contenuto di macroelementi della foglia di gelso somministrata alle larve, nelle diverse età, espresso in peso secco; nella seconda colonna è indicato anche il contenuto d'acqua; est. inazotati: estrattivi inazotati; da Various Authors (1978).*

Età	acqua (%)	Foglia secca (%)					
		proteine	grassi	fibra	ceneri	est. inazotati	carboidrati
I età	82.07	36.35	3.17	9.27	8.11	43.10	12.23
II età	79.99	31.04	3.10	9.52	7.23	49.11	18.71
III età	77.49	28.29	2.82	10.15	7.33	51.41	18.67
IV età	78.40	27.35	3.15	10.79	7.97	50.74	18.02
V età	75.65	24.16	3.49	10.71	7.20	54.44	20.21

1.4 L'allevamento del baco da seta

Le larve dei lepidotteri sono in genere molto voraci e questo tratto, è particolarmente accentuato nel baco da seta visto che il suo aumento in peso, rapportato al momento della nascita, non trova eguali nel regno animale. L'alimentazione degli stadi giovanili di questo insetto è di tipo monofago e basata esclusivamente sulle foglie della pianta di gelso anche se, nel corso degli anni, sono stati sviluppati degli alimenti sostitutivi (diete artificiali o sostitutive) adatti soprattutto per allevamenti su piccola scala ed in condizioni controllate.

Negli allevamenti tradizionali finalizzati alla produzione di fibra tessile, l'alimentazione della larva è esclusivamente basata su foglia di gelso ottenibile da piante che vengono potate annualmente. Le varietà di gelso utilizzate per gli allevamenti sono molte e vengono scelte in base al clima ed a caratteristiche di precocità e nutrizionali, in modo da poter iniziare gli allevamenti nel periodo più opportuno. In genere le foglie più giovani vengono preferite per l'alimentazione delle larve nelle prime età mentre, al crescere della larva, è più indicato utilizzare foglie più mature e meno ricche d'acqua (vedi Tabella 1.1). Inoltre nel caso d'ambienti con aria particolarmente secca, è opportuno mettere in opera misure per evitare l'eccessiva traspirazione delle foglie che andrebbe a limitare la quantità di alimento assunta. Per contro, in climi molto umidi, al momento della muta tra uno stadio larvale e l'altro, è consigliato cospargere i ripiani d'allevamento con sali igroscopici o con altre sostanze in grado di contenere l'umidità, per contrastare l'insorgere di patologie difficili da controllare una volta manifestatesi.

Il tipico sistema di allevamento, prevede che le larve siano alimentate su dei ripiani con un sistema in grado di permettere la pulizia delle lettiere in modo da mantenere le corrette condizioni igieniche e di umidità ed una somministrazione di almeno tre pasti giornalieri. Nelle prime età, l'apparato boccale non permette ancora alla larva di poter aggredire la pagina fogliare in un punto qualsiasi ma solamente dal suo lembo e per questo, con lo scopo di aumentare lo sviluppo dei margini liberi utilizzabili per l'alimentazione, è necessario tagliarla a fette sottili. Col procedere dello sviluppo, questa necessità viene meno e giunti alla quinta ed ultima età, la foglia viene

1.4. L'ALLEVAMENTO DEL BACO DA SETA

Età	T°	umidità (RH)	durata (gg.)
I	27 °C	85%	3 – 4
II	27 °C	85%	3
III	25 °C	80%	4
IV	23 °C	75%	5 – 6
V	22 °C	70%	7 – 9

Tabella 1.2: *Condizioni d'allevamento e durata in gironi (gg.) delle varie età larvali nel baco da seta allevato su foglia. L'alimentazione consta di tre pasti giornalieri e viene sospesa durante la muta tra un'età e l'altra; da Various Authors (1978).*

somministrata intera. Durante l'accrescimento anche le condizioni ottimali di allevamento subiscono dei cambiamenti: la temperatura di sviluppo ottimale passa dai 27 °C della prima età ai 21-23 °C della quinta età; lo stesso trend vale anche per l'umidità che passa da un valore ottimale di 85% al 70% (vedi Tabella 1.2) mentre va aumentata la superficie sulla quale sono distribuite le larve per evitare l'insorgere di patologie associate all'eccessiva densità.

Per quanto riguarda invece il fotoperiodo, negli ambienti dove si alleva su foglia, non viene in genere applicato nessun tipo di controllo e l'andamento è quello naturale pur evitando l'esposizione diretta delle larve alla luce del sole. Diversa, come vedremo poi, è la situazione su dieta artificiale.

Con una tempistica che varia da razza a razza, dopo circa 7 giorni dall'inizio dell'ultima età, le larve iniziano a mostrare i tipici segni della maturità associati all'imminente filatura del bozzolo. A questo punto, l'alimentazione viene interrotta e la larva si libera del contenuto intestinale tramite la cosiddetta "purga", caratterizzata da feci molto più liquide che non durante i giorni precedenti della V età e di tutte le altre età larvali. Svuotato il tratto digerente, il tegumento assume un caratteristico aspetto traslucido e sulla foglia sono individuabili molti fili di seta che la larva fissa al substrato, esibendo anche un forte geotropismo negativo che la porterà a cercare un supporto su cui arrampicarsi. E' questo il momento ottimale, per posare sulle superfici d'allevamento delle raggieri di plastica che serviranno da supporto, per permettere alla larva di allontanarsi dalla foglia assecondando un comportamento indotto dagli ormoni. Inizialmente, mediante una trama lassa di fili di seta (la spelaia) avverrà l'ancoraggio dell'insetto alla raggiera mentre, in un secondo momento, inizierà la deposizione in strati successivi della bava serica che costituirà il bozzolo compatto vero e proprio ossia, la parte utilizzabile per usi tessili.

Rispetto all'allevamento su foglia, quello su dieta sostitutiva presenta alcune criticità dovute sia alle peculiarità del substrato alimentare in sé sia a cambiamenti nella fisiologia della larva così allevata. I primi dati su allevamenti interamente condotti su dieta, risalgono al 1960 e riportano risultati di bassa qualità relativamente a tutti i più importanti parametri biologici (peso del bozzolo, della corteccia serica, numero di uova deposte dalle farfalle femmina, ecc.), indicando una formulazione fortemente difettosa ed incapace di soddisfare in maniera adeguata le richieste nutrizionali di *B. mori* (Various Authors, 1978). Negli anni a seguire, mediante vari esperimenti, sono

1.4. L'ALLEVAMENTO DEL BACO DA SETA

Tabella 1.3: *Formulazione di dieta artificiale contenente il 25% di foglia di gelso secca polverizzata. Le quantità sono espresse come peso secco su un totale di 100g. La dieta viene preparata e conservata come polvere. Prima della cottura, che può avvenire in autoclave o microonde, la polvere viene idratata con un rapporto polvere : acqua pari a 1 : 2.6.*

Ingredienti	Q.tà/100g
Foglia di gelso essiccata (polvere)	25.0 g
Farina di soia	36.0 g
Farina di grano	15.0 g
Amido di mais	4.0 g
Fibra di soia	5.0 g
Acidi carbossilici	6.0 g
Miscela di sali	3.0 g
Addensanti	4.2 g
Vitamine	399.0 mg
Conservanti	901.0 mg
β -sitosterolo	500.0 mg

stati individuati diversi composti in grado di determinare un miglioramento delle prestazioni delle diete artificiali, con formulazioni che si sono evolute negli anni, fino a colmare buona parte delle differenze un tempo esistenti tra dieta e foglia. Attualmente presso il CRA-API, per l'allevamento delle larve, viene impiegata una dieta artificiale con formulazione proprietaria protetta da brevetto e che sembra adattarsi bene anche all'allevamento di altri insetti come, ad esempio, *Anoplophora glabripennis* e *Psacotha hilaris hilaris*. A seconda della destinazione d'uso, la formulazione (vedi Tabella 1.3) varia leggermente, soprattutto per quanto riguarda il contenuto in foglia: per le razze pure la concentrazione è pari al 40% in peso secco mentre, per ibridi e poliibridi, la percentuale scende al 25%.

I diversi componenti riportati nella Tabella 1.3, vengono miscelati sotto forma di polvere e dopo una macinatura mediante mulino a martelli per ottenere la giusta meshatura, possono venire conservati in un luogo fresco ed al riparo dalla luce solare per alcune settimane. Al momento del bisogno, la dieta viene idratata e cotta in forno a microonde o in autoclave e, dopo essersi raffreddata, è pronta per essere utilizzata entro alcuni giorni. La conservazione tra un pasto e l'altro va fatta a 5 °C evitando l'esposizione alla luce per preservarne le caratteristiche.

La miscela di sostanze contenute nella dieta, per essere efficace nell'allevamento del baco da seta, deve essere in grado di stimolare tre distinte fasi che nel loro insieme, concorrono a determinare un'efficiente assunzione del substrato alimentare (Hamamura, 2001). In *B. mori*, come in altri insetti, si distinguono infatti tre momenti che - indipendentemente - determinano questo e sono:

- l'attrazione da parte del substrato alimentare nei confronti della larva;
- il "biting behaviour";
- l'ingestione del cibo.

Le tre azioni appena elencate sono indipendentemente stimolate, da un insieme di sostanze contenute nella foglia di gelso e che sono in parte volatili ed in parte no; in parte idrosolubili ed in parte solubili in solventi organici. Tra le prime e più importanti ad essere identificate troviamo alcuni terpeni come il linalolo e il linalil-acetato in grado di attrarre le larve; come “biting factor” grande importanza la riveste il β -sitosterolo mentre, tra le sostanze in grado di promuovere l’ingestione del cibo e la corretta peristalsi, troviamo il potassio fosfato, la cellulosa e l’inositolo (Hamamura, 2001). Una volta ottenuta la corretta assunzione della dieta sostitutiva, si passò all’identificazione di quei composti chimici essenziali per lo sviluppo e le mute individuando, tra di essi, alcuni acidi polifenolici come l’acido gallico e l’acetilcolina, necessaria per la muta.

Nel caso l’allevamento venga eseguito in condizioni non sterili, importante è anche l’aspetto microbiologico. Per evitare l’insorgere di patologie, si è proceduto con l’aggiungere alcune sostanze conservanti ad azione antifungina ed antibatterica ad ampio spettro in grado di mantenere la propria attività, nonostante il trattamento termico necessario per la cottura e l’elevato pH dell’intestino.

Vale la pena ricordare poi, che al di là della composizione chimica, anche le caratteristiche fisiche della dieta hanno una certa importanza, per una formulazione di successo ed in grado di sostenere il fabbisogno energetico delle larve. Per ottenere la giusta grana ed una texture ottimale si può giocare sul contenuto d’acqua (che dev’essere almeno doppio, in peso, rispetto alla quantità di polvere), sulle sostanze addensanti e sul valore di pH (l’optimum è compreso tra 4.6-4.8) che, oltre a incidere sul potere gelificante, svolge anche un’azione protettiva rispetto ad eventuali contaminazioni da parte di vari microorganismi.

Altre piante, oltre al gelso, contengono gli stessi elementi chimici anche se non sono adatte all’allevamento, per cui è evidente che un’importanza fondamentale la riveste anche la proporzione tra i vari composti nonché la presenza di sostanze irritanti in grado di svolgere un’azione repellente, e quindi, di protezione per la pianta. Si pensa, inoltre, che anche alcune sostanze contenute nella foglia di gelso essiccata ed utilizzata per la dieta artificiale, svolgano un’azione inibitrice della nutrizione (le emicellulose) anche se attenuata da composti organici acidi come alcuni acidi bicarbossilici (Hamamura, 2001). Per questo alcuni esperimenti, con diete contenenti altissime concentrazioni di polvere di foglia di gelso, diedero risultati inaspettatamente deludenti quando si pensava invece di migliorare, aumentando la percentuale di questo ingrediente.

La dieta in seguito al processo di cottura-raffreddamento si presenta come una pasta solida e viene pertanto somministrata sotto forma di strisce sottili, tagliate mediante una spatola. Limitatamente allo stesso stadio larvale, la dieta viene aggiunta a quella vecchia in quantità eccedente fino alla muta. Dopo aver sospeso l’alimentazione, per consentire correttamente il passaggio all’età successiva, si procede in maniera simile fino alla fine della IV età visto il limitato consumo di cibo; diversamente, durante la V età, quando viene assunto circa l’ottanta per cento di tutto il cibo consumato



Figura 1.5: *Larve al II stadio allevate su dieta artificiale. Le larve tendono a salire sulla superficie della dieta, attratte dalla luce e dall'alimento più fresco aggiunto giornalmente.*

(Rahmathulla e Suresh, 2008) e anche dimensioni delle larve e quantità di feci prodotte aumentano notevolmente, la pulizia viene fatta giornalmente. Inoltre per evitare sia di sprecare che di difettare nella quantità di dieta fornita, l'alimento viene dato in modo preciso, in base al numero di larve, previa pesatura.

Su dieta artificiale le larve non vengono più allevate in maniera tradizionale, in ampi spazi chiusi, su ripiani in grado di consentire il cambio delle lettiere ma all'interno di scatole di plastica, lavabili e riutilizzabili previa disinfezione. Per avere le corrette condizioni di allevamento, le scatole vengono parzialmente chiuse con un coperchio, per evitare un'eccessiva disidratazione della dieta e posizionate all'interno di una camera termostatica in cui vengono controllati, temperatura, umidità e fotoperiodo. Un'importante differenza rispetto all'allevamento su foglia, riguarda la frequenza giornaliera dei pasti che scende da tre ad un solo pasto al giorno in condizioni controllate di laboratorio. Anche in questo caso, come nell'allevamento sopra descritto, l'alimentazione viene sospesa al momento della muta in modo da abbassare l'umidità nelle scatole usate per l'allevamento e permettere un completo disseccamento dell'alimento. Tale metodica impedisce agli individui più precoci nel terminare la muta, di iniziare ad alimentarsi e consente di mantenere il lotto di larve sincronizzate da un punto di vista dello sviluppo.

E' inoltre consigliabile allontanare i mutati e lasciarli a digiuno per una giornata, fino al completamento della muta da parte degli individui più lenti; unendo poi i due gruppi e nutrendoli in maniera sincrona all'interno di una nuova scatola dalle dimensioni maggiori, rapportata allo spazio attualmente occupato dalle larve, sarà possibile mantenere una crescita omogenea.

Come esposto in precedenza, la dieta contiene una quantità variabile di polvere di foglia di gelso ottenuta dalla macinazione del prodotto secco. Il processo di essiccazione e polverizzazione, insieme alla conservazione per tempi medio-lunghi, porta però ad una degradazione dei pigmenti presenti nella foglia di gelso e questo, implica un'importante conseguenza a livello immunitario. Nelle larve alimentate con foglia fresca, è infatti possibile ritrovare nel succo gastrico una proteina denominata Red Fluorescent Protein (RFP), caratterizzata da una forte attività antivirale (Hayashiya, 1978) non riscontrabile nelle larve alimentate su dieta. Evidenze sperimentali, hanno

dimostrato che la RFP si forma dal legame tra una proteina presente sulla membrana delle cellule epiteliali del tratto digerente (P252) e la clorofillide A (un derivato della clorofilla); è stata inoltre dimostrata la stabilità del composto a pH molto elevati e simili a quelli del tratto digerente dei lepidotteri ed anche un'attività antibatterica contro *E. coli*, *S. marcescens*, *B. thuringiensis* e *S. cerevisiae* (Pandian et al., 2008). La degradazione dei pigmenti delle foglie, associata al metodo di produzione della dieta è quindi in grado di spiegare uno degli aspetti che rendono le larve più sensibili a certe patologie, quando allevate su un alimento sostitutivo.

La dieta sostitutiva oltre ad avere un impatto sulla resistenza della larva ai patogeni, determina - come lo fa la foglia - le performance dell'insetto che sono misurabili in base ad una serie di parametri. Le grandezze utili per fare una valutazione sulla bontà e completezza della formulazione, sono il tasso di crescita della larva, il numero di mute della razza, il tasso di sopravvivenza, il peso del bozzolo e la ricchezza in seta, il numero di uova deposte dagli adulti, la regolarità nello sviluppo, ecc. In base ai risultati sperimentali ottenuti nei parametri menzionati, in seguito ad una variazione della composizione della dieta, si può accettare o scartare un'eventuale cambiamento introdotto nella formulazione originaria.

1.5 L'efficienza nutrizionale negli stadi giovanili degli insetti

Il baco da seta può essere sfruttato dall'industria tessile in maniera tradizionale, per la sua straordinaria capacità di convertire le proteine della foglia di gelso in seta oppure, in maniera alternativa, utilizzando le recenti tecnologie che mirino ad utilizzare fibroina e sericina, matrici proteiche del filo sericeo. Le applicazioni ad alta tecnologia riguardanti l'utilizzo della seta come biomateriale, prevedono lo sfruttamento di alcune caratteristiche di questa fibra naturale, superiori a quelle delle migliori fibre sintetiche (come ad esempio il Kevlar), nonostante l'esistenza di una fondamentale differenza a livello di processo produttivo: per la fabbricazione delle fibre artificiali, durante il processo di sintesi, sono infatti richieste grandi quantità di energia (calore e pressione) e devono essere impiegati solventi organici; la seta invece si autoassembla a temperatura ambiente ed in soluzione acquosa, attraverso un processo guidato dal "contenuto di energia" della soluzione proteica all'interno delle ghiandole della seta (Holland et al., 2007). Attraverso la modulazione dei processi produttivi, dalla seta, si possono poi ottenere idrogel, spugne, fibre ed altri materiali che trovano applicazioni in elettronica, ottica e medicina solo per citare alcuni esempi (Omenetto e Kaplan, 2010). Ad ogni modo, qualunque sia l'impiego della seta o delle proteine prodotte al suo posto in seguito a transgenesi (Tatemastu, Sezutsu e Tamura, 2012), l'efficienza di conversione del baco da seta, riveste un ruolo fondamentale sia per migliorare il rapporto costi-benefici per la produzione di fibra tessile (Ramesha, Anuradha et al., 2010; Ramesha, Lakshmi et al.,

2012) o proteine sia per migliorare le capacità della larva di affrontare gli stress imposti dall'ambiente esterno. Infatti le potenzialità di sopravvivenza di un organismo, si basano principalmente sul suo apparato di sintesi proteica e sulle funzioni (strutturali, di modulazione, enzimatiche, ecc.) che questi macro-polimeri sono in grado di svolgere (Babu et al., 2009).

Gli esperimenti atti a valutare l'efficienza nutrizionale degli stadi immaturi degli insetti, si basano spesso sul metodo gravimetrico e quindi sulla pesatura della biomassa, del cibo ingerito ed assimilato, dell'escreto e del cibo avanzato e fanno riferimento, come metodologia, alla revisione sullo stato dell'arte dello studio pubblicato da Waldbauer (1968). In generale, gli insetti presentano diversi livelli di specializzazione a livello di dieta con specie spiccatamente polifaghe ed altre olifaghe o monofaghe. I fitofagi appartenenti a queste due ultime categorie, sono incapaci di adattarsi ad alcune sostanze contenute nel substrato vegetale ingerito da altri organismi, per cui, invece, può fungere da fonte di energia (Scriber e Slansky Jr., 1981). Il baco da seta, da questo punto di vista, rappresenta un notevole esempio di come la pressione evolutiva abbia selezionato degli individui strettamente monofagi ed in grado di alimentarsi di una foglia contenete molti alcaloidi tossici, grazie all'espressione di un sistema enzimatico in grado di detossificare le sostanze contenute nelle foglie di *Morus* (Daimon et al., 2008).

La pesatura delle diverse frazioni alimentari ed escrementi, può essere fatta su materiale fresco oppure secco tenendo presente però, che i due sistemi di misura producono indici non confrontabili (Waldbauer, 1968) e sapendo anche che il contenuto di acqua ed azoto, diminuisce con il deterioramento dell'alimento. Aumentano invece, con il passare del tempo, i metaboliti secondari prodotti dalle piante come sistema di difesa e per consolidare le strutture secondarie (Scriber e Slansky Jr., 1981). In tal senso, alle latitudini europee, va ricordato che per le esigenze nutrizionali del baco da seta, la foglia primaverile presenta caratteristiche di molto superiori a quella autunnale, più ricca in sostanze fibrose e povera in acqua. Inoltre, poiché le larve di *B. mori* sono particolarmente sensibili anche all'idratazione fogliare, al di là della stagionalità, durante gli allevamenti è opportuno limitare l'evaporazione d'acqua dalla foglia o da una eventuale dieta sostitutiva, in modo da non comprometterne il corretto sviluppo. Foglie con una bassa percentuale d'acqua, incidono infatti negativamente sia sulla capacità di assimilazione sia di conversione del cibo in massa corporea determinando poi, una scarsa produttività di uova, di seta ed anche una bassa vitalità degli individui in generale (Paul, Subba Rao e Deb, 1992; Esfandarani, Bahreini e Tajabadi, 2002).

Quando si decide di pianificare una sperimentazione basata sugli indici alimentari, non è opportuno scegliere l'intervallo di tempo su cui fare i rilievi in maniera arbitraria perché si ottengono dati, difficilmente confrontabili con altri esperimenti ed anche meno riproducibili (Waldbauer, 1968). E' più indicato invece sfruttare intervalli fisiologicamente determinati (ad esempio l'intervallo tra 2 mute) oppure, nel caso del baco da seta, il periodo corrispondente all'ultima età larvale poiché, in questo stadio, viene consumato più dell'ottanta per cento del cibo complessivamente assunto (Rahmathulla

e Suresh, 2008). Per di più, la V età, ha un impatto determinante sulla quantità di seta prodotta e su molti altri parametri di cruciale importanza, determinati dall'interazione tra genoma e apporto nutrizionale.

Utilizzando il metodo gravimetrico si rilevano il peso della larva all'inizio ed alla fine dell'esperimento, il peso delle feci, del cibo somministrato e di quello avanzato. Le misure possono essere fatte su materiale secco, essiccando i vari campioni fino a peso costante ed utilizzando un lotto di larve da poter sacrificare per stimare gli incrementi ponderali degli individui. Alternativamente si può decidere di usare il peso fresco, assicurandosi però di correggere il dato sul cibo ingerito per non sovrastimarne la quantità, a causa della perdita di peso per evaporazione che porta a distorcere la quantità di alimento avanzato (Waldbauer, 1968; Candy e Baker, 2002). Per calcolare tale correzione nella pratica sperimentale, si mantengono alcuni campioni in condizioni paragonabili a quelle dell'alimento somministrato alle larve, si esegue una stima della normale perdita di peso dovuta alla traspirazione e si ricava un coefficiente da usare, per migliorare la precisione della valutazione ponderale del cibo avanzato.

In bibliografia si possono trovare esempi di metodi alternativi rispetto alla pesatura diretta delle suddette quantità. In genere queste procedure, si basano sull'utilizzo di saggi colorimetrici o di sostanze radioattive e anche se hanno dei vantaggi, comportano comunque delle limitazioni e anche dei lati negativi (Waldbauer, 1968). Si pensi ad esempio all'ossido di cromo; il suo impiego può essere vantaggioso nel caso di alimenti che possono essere ridotti in polvere e miscelati con esso in maniera omogenea, perché esiste un saggio colorimetrico molto pratico da eseguire (McGinnis e Kasting, 1964). Per contro, questo tracciante risulta di difficile impiego nel caso di insetti alimentati a foglia perché potrebbe non essere omogeneamente distribuito sulla pagina fogliare e comunque, la sua presenza, sarebbe proporzionale alla superficie piuttosto che al peso di alimento ingerito (Waldbauer, 1968). Per tale ragione, nell'analisi eseguita su *B. mori* ed in seguito esposta, si è deciso di utilizzare il classico metodo gravimetrico, rispettando la procedura usuale in sperimentazioni di questo genere (Ramesha, Anuradha et al., 2010; Ramesha, Lakshmi et al., 2012). Per conoscenza, si tenga presente che volendo utilizzare un marker per monitorare il flusso alimentare attraverso un organismo, la sostanza chimica impiegata dovrebbe avere alcuni requisiti fondamentali:

- non incidere sull'assunzione di cibo;
- non essere tossica alle concentrazioni d'impiego;
- non essere assorbita o modificata durante la digestione
- poter essere distribuita uniformemente nell'alimento
- poter essere esaminata con un opportuno metodo d'analisi per rilevare il marker

Dopo aver rilevato le grandezze fondamentali (peso delle feci, del cibo dato, ecc.), i dati possono essere utilizzati per calcolare una serie di indici (Ramesha, Anuradha et al., 2010; Ramesha, Lakshmi et al., 2012) in grado di dare un quadro d'insieme sull'efficienza metabolica dell'organismo studiato. In base alla finalità della sperimentazione, alcuni valori risulteranno quindi più importanti di altri, per valutare il metabolismo globale e trarre le conclusioni del caso.

1.6 Le patologie del baco da seta

Il baco da seta è suscettibile a diverse patologie e la sua sensibilità rispetto ad esse, dipende dall'appartenenza della larva ad una determinata razza, dalle condizioni di allevamento, dallo stadio di sviluppo e dallo stato di salute della larva al momento del contatto col patogeno. *Bombyx mori* è potenzialmente un ospite per agenti infettivi appartenenti al mondo dei virus, dei batteri e dei funghi tra cui, in particolare, un microsporidio, il *Nosema bombycis* (Corradi e Keeling, 2009). In linea generale, una volta che i sintomi della malattia sono identificabili, l'ospite va incontro alla morte non esistendo efficaci contromisure o, in caso di completamento del ciclo biologico, produce una progenie fortemente pregiudicata dallo stato di salute degli individui parentali. Per questo, la più importante misura sanitaria da mettere in atto durante gli allevamenti, è rappresentata dalla prevenzione che si traduce in una corretta gestione degli ambienti di allevamento, nell'utilizzo di uova prodotte da femmine sane, in una corretta densità di popolazione e nel controllo di umidità e temperatura durante tutti gli stadi di sviluppo.

Tra le suddette malattie, per ragioni storiche, una particolare menzione la merita la pebrina, perché nel diciannovesimo secolo si manifestò diffusamente e gravemente in Italia, mettendo in ginocchio la bachicoltura, una delle più importanti attività economiche del tempo, ed elevando il problema a questione nazionale (Marson, 2011). Le risorse messe in campo per risolvere il problema, identificarono in *N. bombycis* l'agente eziologico della malattia e posero le basi per l'introduzione delle misure necessarie per contenere il fenomeno. Questo microsporidio, si diffonde all'interno della popolazione entrando nel tratto digerente, attraverso l'apertura boccale e si propaga tra le cellule dell'organismo compromettendo la fisiologia della larva attraverso una struttura caratteristica denominata "filamento polare" (Keeling e Fast, 2002); vedi Fig. 1.6. Essendo un fungo, la sua capacità di sporulare lo rende capace di resistere per periodi molto lunghi al di fuori di un ospite (Bhat, Bashir e Kamili, 2009) e, queste spore, associate alle foglie di gelso e veicolabili anche da altri insetti, rappresentano la fonte primaria d'infezione. La larva malata espelle poi con le feci altre spore che a causa dello stretto contatto, si diffondono ad altri individui estendendo il contagio (contagio secondario). In aggiunta all'alta mortalità associata alle infezioni precoci, esiste un problema legato alla trasmissibilità di questo patogeno: alla trasmissione orizzontale si aggiunge infatti quella verticale in cui una farfalla femmina malata, produce uova al cui interno sono presenti

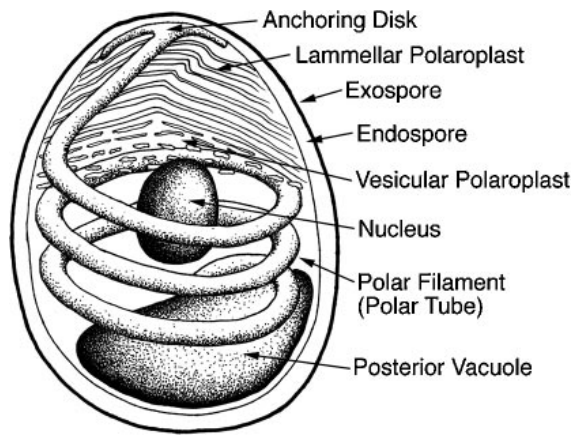


Figura 1.6: Disegno schematico di una spora di *N. bombycis* in cui sono indicate le principali strutture anatomiche. Si noti, in particolare, il “filamento polare” (polar filament) ossia lo strumento in grado di propagare lo sporoplasma infettivo, dalla spora al citoplasma delle cellule dell’ospite; da Keeling e Fast (2002).

i patogeni rendendo vane le normali procedure di disinfezione del corion (Bhat, Bashir e Kamili, 2009). Nell’allevamento su dieta, purché si parta da uova sane, il problema della trasmissione verticale non esiste perché le spore, eventualmente presenti nella polvere, non superano lo step di cottura e la disinfezione delle uova con ipoclorito di sodio, previene eventuali contaminazioni dal guscio. Nell’allevamento tradizionale, potrebbero invece verificarsi contaminazioni della foglia somministrata alle larve come alimento, in grado di creare infezioni primarie sub-letali. Le femmine potrebbero riuscire a sopravvivere fino allo stadio adulto e deporre uova infette in grado di compromettere la generazione successiva. Come misura di profilassi, diventa pertanto indispensabile analizzare i tessuti delle farfalle madri alla ricerca di eventuali spore, mantenendo una corrispondenza tra ogni individuo e la rispettiva deposizione, in modo da poter scartare le uova provenienti da adulti infetti.

Gli altri parassiti appartenenti al regno dei funghi, hanno un comportamento più “tradizionale” ed attaccano sostanzialmente il tegumento esterno, infiltrandolo con le proprie ife. Le condizioni per la proliferazione di queste malattie, sono umidità e temperature alte per cui in caso di condizioni difficili (clima particolarmente umido) durante allevamenti ad alta densità, tali patologie possono facilmente insorgere. Nel loro insieme queste malattie fungine vengono volgarmente chiamate “calcino”, abbinando a quest’ultima denominazione, un aggettivo per definire il colore dei miceli presenti sul corpo della larva malata (calcino bianco, rosa, ecc.) e sono causate da diversi microorganismi (Various Authors, 1978). Tra le principali varianti di questa malattia troviamo il calcino bianco causato da un ceppo di *Beauveria bassiana*, il calcino verde causato da *Spicaria prasina* ed il calcino giallo causato da un altro ceppo di *Beauveria bassiana*. In seguito alla morte dell’insetto, le ife colonizzano completamente il cadavere dell’insetto, conferendogli il tipico aspetto “mummificato” evidenziato in Fig. 1.7.

Anche i batteri possono rappresentare una minaccia per gli allevamenti di baco da seta e producono malattie in grado di causare, talvolta, la perdita dell’intero allevamento. A dispetto di una molteplicità di agenti eziologici, i sintomi causati dalle setticemie batteriche e dalle malattie enteriche sono simili ed iniziano con inappetenza e vomito e si risolvono, in

Figura 1.7: Larve dal tipico aspetto “mummificato” in seguito a morte, dovuta ad infezione di *Beauveria bassiana*. La colonizzazione da parte del fungo tende a rendere il corpo della larva particolarmente rigido.



genere, con la morte dell'individuo contagiato. Altri sintomi sono diarrea, apatia, rigonfiamento dei segmenti toracici e perdita di turgore di quelli addominali. Come esposto in precedenza, le contromisure nel caso di infezioni conclamate, sono praticamente inesistenti e si può solamente cercare di isolare gli individui malati per tentare di limitare il contagio, cercando così di salvare un parte dell'allevamento. Fondamentale risulta pertanto - anche in questo caso - il mantenimento di una corretta pratica di allevamento, in modo da non esporre le larve a quelle condizioni in grado di indurre stati patologici o di favorire la diffusione di patogeni; importante è anche allontanare le larve, con manifesti ritardi di sviluppo perché potrebbero o essere dovuti ad uno stato patologico oppure il segno di qualche deficit congenito, in grado di aprire la porta ad infezioni in grado poi di espandersi a tutta la popolazione (Grekov, Kipriotis e Tzenov, 2005). Da notare che per le ragioni precedentemente esposte e legate all'assenza della Red Fluorescent Protein, queste manifestazioni sono generalmente più violente su dieta artificiale e quindi nei contesti sperimentali legati alla ricerca.

Tra i microorganismi maggiormente nocivi possiamo trovare, ad esempio, *Bacillus spp.*, *Serratia marcescens* e *Streptococcus spp.* ma anche un batterio come l'*Enterococcus mundtii* che, allo stato attuale delle conoscenze, sembra essere patogenetico solo su dieta artificiale. Quest'ultimo in particolare, è stato isolato e caratterizzato nell'ambito della sperimentazione trattata in questa tesi di dottorato, in seguito alle violente epidemie manifestatesi durante gli allevamenti massivi su dieta artificiale, finalizzati alla selezione di individui ad alta efficienza alimentare (S. Cappellozza et al., 2011).

Così come molti altri insetti, anche le larve di *B. mori*, specialmente durante l'ultima età larvale, sono sensibili alle tossine prodotte dal *Bacillus thuringiensis* (Grekov, Kipriotis e Tzenov, 2005). Questo batterio produce dei cristalli di proteina, i cui geni sono di solito localizzati su dei plasmidi e che esibiscono una forte tossicità verso i lepidotteri. La tossina, diventa attiva in seguito alla parziale proteolisi che avviene all'interno del tratto digerente, come conseguenza dell'elevato pH e di un'azione enzimatica. Il frammento attivo si lega quindi ad una proteina di membrana delle cellule epiteliali, dove causa la formazione di un poro aspecifico in grado di compromettere l'omeostasi ionica e di causare il rigonfiamento e la lisi della cellula (Nagamatsu, Koike e Sasaki, 1999).

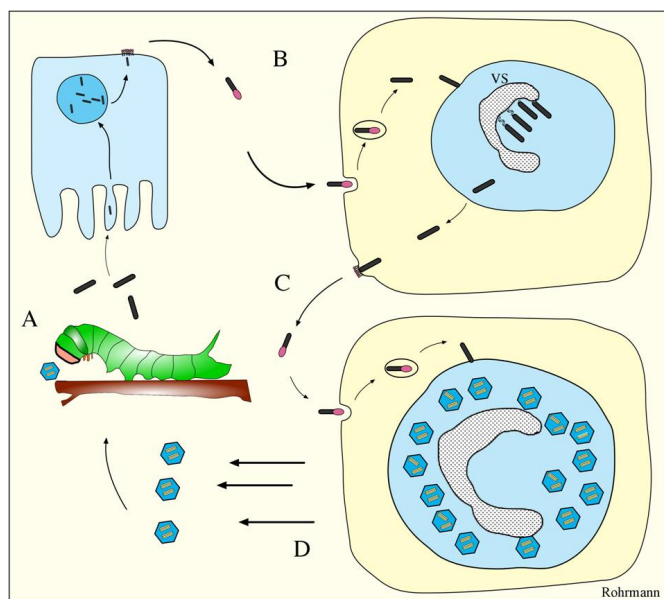


Figura 1.8: Ciclo e diverse forme biologiche di un tipico virus della poliedrosi nucleare (NPV). La larva si infetta per via orale, ingerendo un corpo d'inclusione di natura proteica veicolato dal substrato alimentare (A); all'interno del tratto digerente, pH ed enzimi digestivi liberano la particella virale che infetta una prima cellula (B) da cui originano le "gemme virali", evolutesi per estendere l'infezione tra i tessuti all'interno del medesimo ospite (C). Nelle fasi tardive dell'infezione, le cellule, lisandosi, liberano nuovamente corpi d'inclusione che si disperdono nell'ambiente e che possono infettare nuovi individui (D); da Rohrmann (2011b).

Diversi sono anche i virus in grado di infettare il baco da seta e provocarne la morte o la compromissione dell'allevamento e della produzione di seta. L'infezione può avvenire attraverso eventuali lacerazioni presenti sull'esoscheletro o, più comunemente, per via orale tramite l'ingestione di particelle virali diffuse con le feci da altri individui (Sakaguchi, 1978). Tra i virus aventi come ospite *B. mori*, il più studiato è quello della poliedrosi nucleare (NPV; volgarmente "giallume") sia a causa dei gravi danni che provoca sugli allevamenti, in ambienti a clima tropicale (Khurad et al., 2004), sia per le potenzialità che offre come vettore nelle piattaforme d'espressione basate sugli insetti (Kato et al., 2010).

La particella infettiva si è evoluta in due forme alternative di cui una, più adatta a resistere per lungo tempo in ambiente, l'altra più efficiente nella diffusione tra cellula e cellula all'interno dell'ospite (Cory e Myers, 2003; Rohrmann, 2011a; Rohrmann, 2011b). La prima forma prevede la protezione delle particelle virali all'interno di un corpo d'inclusione (Occlusion Body, OB) di natura proteica, all'interno del quale si trovano più virioni che risultano protetti dagli stress ambientali e sono pertanto in grado di mantenere la propria virulenza, anche dopo lunghi periodi all'esterno di un ospite. Questa forma può resistere anche all'interno del tratto digerente di alcuni vertebrati che possono, pertanto, contribuire a diffondere la patologia a specie suscettibili. Una volta entrati nel tratto digerente, ad esempio di un

lepidottero come il baco da seta, gli OB si dissolvono per l'azione di alcune proteasi e dell'elevato pH intestinale tipico di questi organismi. Avviene quindi, il contagio delle cellule epiteliali del tratto digerente dove il virus si moltiplica e produce i cosiddetti "Budded Virus" (BV) che si differenziano dagli OB, per la struttura dell'envelope virale che consente una più efficiente trasmissione tra le cellule di uno stesso organismo. Quando poi il processo d'infezione sta volgendo verso la fine e l'insetto è prossimo alla liquefazione mediata dagli enzimi del virus (Suzuki et al., 1997), le cellule contagiate - poco prima del momento della lisi - cominciano a produrre di nuovo OB e non più BV, in modo da favorire un'ulteriore espansione dell'epidemia (vedi Fig. 1.8) come descritto in Rohrmann (2011b). Entrambe le forme possono inoltre differenziarsi per la presenza, all'interno di un singolo envelope, di uno o molti capsidi virali. Si ricordi infine che, mentre la trasmissione orizzontale del patogeno ed i suoi meccanismi sono chiaramente dimostrati, dubbi permangono sulla trasmissione verticale trans-ovarica e su eventuali infezioni latenti o persistenti a bassa intensità, in grado di essere indotte a forma conclamata in seguito a stress ambientale (Cory e Myers, 2003; Hughes, Possee e King, 1997; Khurad et al., 2004).

Un altro virus causa di gravi infezioni in *B. mori* appartiene alla famiglia *Reoviridae*, genere *Cypovirus* ed è il virus della poliedrosi citoplasmatica (CPV). Si tratta di un virus ad RNA a doppio filamento che si propaga principalmente per via orale, in seguito all'ingestione di poliedri attraverso cibo contaminato e alla loro dissoluzione pH-dipendente (Mertens e Attoui, 2008; X. Wang et al., 2011). Le cellule bersaglio sono quelle del tratto digerente ed in seguito all'infezione, vengono rilasciati nell'intestino grandi quantità di poliedri virali (Ikeda et al., 2001) che conferiscono un caratteristico colore biancastro alle pareti intestinali ed alle feci delle larve infette. Come si può dedurre dal nome, durante l'infezione, l'assemblaggio dei nuovi capsidi virali avviene nel citoplasma delle cellule; diversamente per l'NPV l'assemblaggio avviene nel nucleo.

Altri virus in grado di attaccare il baco da seta e di causare gravi danni agli allevamenti, producono una sintomatologia tra loro simile e che per analogia con la flaccidezza batterica, viene chiamata flaccidezza infettiva. Tra di essi, troviamo un membro dei Picornavirus con genoma a singolo filamento positivo di RNA e privo di envelope (Hashimoto, Watanabe e Kawase, 1984) ed alcune varianti di virus appartenenti ai Densovirus. In quest'ultimo caso sono stati sviluppati dei marcatori molecolari, utilizzabili in processi di selezione guidata, per individuare gli individui resistenti. Al momento i Densovirus noti in grado di attaccare *B. mori* sono tre e sono stati denominati DNV-Z, DNV-1 e DNV-2. Per il tipo 1, i geni associati alla resistenza sono due: il gene *nsd-1* ed il gene *Nid-1* mentre per i tipi 2 e Z, i geni in grado di conferire resistenza sono l'*nsd-2* e l'*nsd-Z* rispettivamente (Hou et al., 2013).

Bibliografia del capitolo 1

- Babu, K. R. et al. (2009). «Metabolic alterations and molecular mechanism in silkworm larvae during viral infection: A review». In: *African Journal of Biotechnology* 8.6, pp. 899–907.
- Bhat, S. A., I. Bashir e A. S. Kamili (2009). «Microsporidiosis of silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera-Bombycidae): a review». In: *African Journal of Agricultural Research* 4.13, pp. 1519–1523.
- Botton, A. et al. (2005). «DNA fingerprinting sheds light on the origin of introduced mulberry (*Morus* spp.) accessions in Italy». In: *Genetic Resources and Crop Evolution* 52.2, pp. 181–192. ISSN: 0925-9864. DOI: [10.1007/s10722-003-4429-x](https://doi.org/10.1007/s10722-003-4429-x).
- Candy, S. G. e S. C. Baker (2002). «Calculating food consumption in the laboratory: A formula to adjust for natural weight loss». In: *Australian Journal of Entomology* 41.2, pp. 170–173. ISSN: 1326-6756. DOI: [10.1046/j.1440-6055.2002.00285.x](https://doi.org/10.1046/j.1440-6055.2002.00285.x).
- Cappelozza, L., S. Cappelozza e F. Miotto (1992). «Further experimental test on the damages caused by fenoxycarb on silkworm». In: *Informatore Agrario* 48.14, pp. 41–44.
- Cappelozza, S. et al. (2011). «Identification of *Enterococcus mundtii* as a pathogenic agent involved in the flacherie disease in *Bombyx mori* L. larvae reared on artificial diet». In: *Journal of invertebrate pathology* 106.3, pp. 386–93. ISSN: 1096-0805. DOI: [10.1016/j.jip.2010.12.007](https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.12.007).
- Chen, C.-H. e S.-H. Gu (2006). «Stage-dependent effects of starvation on the growth, metamorphosis, and ecdysteroidogenesis by the prothoracic glands during the last larval instar of the silkworm, < i>». In: *Journal of insect physiology* 52.9, pp. 968–974. ISSN: 00221910. DOI: [10.1016/j.jinsphys.2006.06.011](https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2006.06.011).
- Corradi, N. e P. J. Keeling (2009). «Microsporidia: a journey through radical taxonomical revisions». In: *Fungal Biology Reviews* 23.1-2, pp. 1–8. ISSN: 17494613. DOI: [10.1016/j.fbr.2009.05.001](https://doi.org/10.1016/j.fbr.2009.05.001).
- Cory, J. S. e J. H. Myers (2003). «The Ecology and Evolution of Insect Baculoviruses». In: *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34.1, pp. 239–272. ISSN: 1543-592X. DOI: [10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132402](https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132402).
- Daimon, T. et al. (2008). «Beta-fructofuranosidase genes of the silkworm, *Bombyx mori*: insights into enzymatic adaptation of *B. mori* to toxic alkaloids in mulberry latex.» In: *The Journal of biological chemistry* 283.22, pp. 15271–15279. ISSN: 0021-9258. DOI: [10.1074/jbc.M709350200](https://doi.org/10.1074/jbc.M709350200).
- DeFelice, S. L. (2002). *FIM Rationale And Proposed Guidelines For The Nutraceutical Research & Education Act - NREA*.
- Esfandarani, M. Talebi, R. Bahreini e N. Tajabadi (2002). «Effect of mulberry leaves moisture on some traits of the silkworm (*Bombyx mori* L.)» In: *Sericologia* 42.2, pp. 285–289.
- Gilbert, L. I., R. Rybczynski e J. T. Warren (2002). «Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway». en. In: *Annual review of*

- entomology* 47, pp. 883–916. ISSN: 0066-4170. DOI: [10.1146/annurev.ento.47.091201.145302](https://doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145302).
- Goldsmith, M. R., T. Shimada e H. Abe (2005). «The genetics and genomics of the silkworm, *Bombyx mori*.» In: *Annual review of entomology* 50, pp. 71–100. ISSN: 0066-4170. DOI: [10.1146/annurev.ento.50.071803.130456](https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130456).
- Grekov, D., E. Kipriotis e P. Tzenov (2005). *Sericulture Training Manual*, p. 320.
- Hamamoto, H., K. Kamura et al. (2005). «Effects of molecular mass and hydrophobicity on transport rates through non-specific pathways of the silkworm larva midgut». In: *International Journal of Antimicrobial Agents* 26.1, pp. 38–42.
- Hamamoto, H., A. Tonoike et al. (2009). «Silkworm as a model animal to evaluate drug candidate toxicity and metabolism.» In: *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP* 149.3, pp. 334–9. ISSN: 1532-0456. DOI: [10.1016/j.cbpc.2008.08.008](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.08.008).
- Hamamoto, H., M. Urai et al. (2012). «Identification of novel therapeutically effective antibiotics using silkworm infection model». In: *The Pharmaceutical Society of Japan* 132.1, pp. 79–84.
- Hamamura, Y. (2001). *Silkworm rearing on artificial diet*. English. A cura di Y. Hamamura. Science Publishers, Inc., p. 311. ISBN: 1-57808-174-2.
- Hashimoto, Y., A. Watanabe e S. Kawase (1984). «In vitro translation of infectious Flacherie virus RNA in a wheat germ and a rabbit reticulocyte system». In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 781.1, pp. 76–80.
- Hayashiya, K. (1978). «Red fluorescent protein in the digestive juice of the silkworm larvae fed on host-plant mulberry leaves». In: *Entomologia Experimentalis et Applicata* 24.3, pp. 428–436. ISSN: 00138703. DOI: [10.1111/j.1570-7458.1978.tb02803.x](https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1978.tb02803.x).
- Holland, C. et al. (2007). «Natural and unnatural silks». In: *Polymer* 48.12, pp. 3388–3392. ISSN: 00323861. DOI: [10.1016/j.polymer.2007.04.019](https://doi.org/10.1016/j.polymer.2007.04.019).
- Hou, C. X. et al. (2013). «Marker-assisted selection in breeding silkworm strains with high silk production and resistance to the densovirus». In: *Genetics and molecular research: GMR* 12.4, pp. 4171–4178. ISSN: 1676-5680. DOI: [10.4238/2013.October.7.3](https://doi.org/10.4238/2013.October.7.3).
- Hughes, D. S., R. D. Possee e L. A. King (1997). «Evidence for the presence of a low-level, persistent baculovirus infection of *Mamestra brassicae* insects.» In: *The Journal of general virology* 78, pp. 1801–1805. ISSN: 0022-1317.
- Ikeda, K. et al. (2001). «Molecular characterization of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus genome segment 4». In: *Journal of virology* 75.2, pp. 988–995. DOI: [10.1128/JVI.75.2.988](https://doi.org/10.1128/JVI.75.2.988).
- International Sericultural Commission (2013). *Global Silk Production*.
- Kaewkorn, W. et al. (2012). «Effects of silk sericin on the proliferation and apoptosis of colon cancer cells». In: *Biological Research* 45.1, pp. 45–50. ISSN: 0716-9760. DOI: [10.4067/S0716-97602012000100006](https://doi.org/10.4067/S0716-97602012000100006).

- Kalra, E. K. (2003). «Nutraceutical-Definition and introduction.» In: *The AAPS Journal* 5.3, pp. 27–28. ISSN: 1522-1059. DOI: [10.1208/ps050325](https://doi.org/10.1208/ps050325).
- Kato, T. et al. (2010). «Silkworm expression system as a platform technology in life science.» In: *Applied microbiology and biotechnology* 85.3, pp. 459–70. ISSN: 1432-0614. DOI: [10.1007/s00253-009-2267-2](https://doi.org/10.1007/s00253-009-2267-2).
- Keeling, P. J. e N. M. Fast (2002). «Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites.» In: *Annual review of microbiology* 56, pp. 93–116. ISSN: 0066-4227. DOI: [10.1146/annurev.micro.56.012302.160854](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160854).
- Keservani, R. K. et al. (2010). «Nutraceutical and functional food as future food: A review» In: *Der Pharmacia Lettre* 2.1, pp. 106–116.
- Khurad, A. M. et al. (2004). «Vertical transmission of nucleopolyhedrovirus in the silkworm, *Bombyx mori* L.» In: *Journal of invertebrate pathology* 87.1, pp. 8–15. ISSN: 0022-2011. DOI: [10.1016/j.jip.2004.05.008](https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.05.008).
- Li, G. et al. (2001). «The natural silk spinning process» In: *European Journal of Biochemistry* 268.24, pp. 6600–6606. ISSN: 00142956. DOI: [10.1046/j.0014-2956.2001.02614.x](https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02614.x).
- Limpeanchob, N. et al. (2010). «Sericin Reduces Serum Cholesterol in Rats and Cholesterol Uptake into Caco-2 Cells.» In: *Journal of agricultural and food chemistry*, pp. 12519–12522. ISSN: 1520-5118. DOI: [10.1021/jf103157w](https://doi.org/10.1021/jf103157w).
- Lu, L. et al. (2009). «The role of marginal agricultural land-based mulberry planting in biomass energy production» In: *Renewable Energy* 34.7, pp. 1789–1794. ISSN: 09601481. DOI: [10.1016/j.renene.2008.12.017](https://doi.org/10.1016/j.renene.2008.12.017).
- Marson, E. (2011). *Una pagina inedita della ricerca scientifica tra XIX e XX secolo*. CLEUP, p. 386. ISBN: 9788861295216.
- McGinnis, A. J. e R. Kasting (1964). «Comparison of gravimetric and chromic oxide methods for measuring percentage utilization and consumption of food by phytophagous insects» In: *Journal of Insect Physiology* 10.6, pp. 989–995.
- Mertens, P. P. C. e H. Attoui (2008). «Insect Reoviruses» In: *Encyclopedia of Virology (Third Edition)*. A cura di B. W. J. Mahy e M. H. V. van Regenmortel. Third edit. Academic Press, pp. 133–144. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00610-5>.
- Micheletto, M. (2005). «Le foglie di gelso nell'alimentazione dei monogastrici: studio delle caratteristiche nutrizionali». Tesi di dott. Università degli Studi di Padova.
- Monconduit, H. e B. Mauchamp (1999). «Fenoxycarb, a potent contaminant of the silkworm, *Bombyx mori* L., does not influence its juvenile hormone titer» In: *Archives of insect biochemistry and physiology* 40.3, pp. 141–149. DOI: [10.1002/\(SICI\)1520-6327\(1999\)40](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6327(1999)40).
- Nagamatsu, Y., T. Koike e K. Sasaki (1999). «The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIAa toxin» In: *FEBS letters* 460, pp. 385–390.
- Nagaraju, J. e M. R. Goldsmith (2002). «Silkworm genomics-progress and prospects» In: *Current Science* 83.4, pp. 415–425.

- Olson, P. E., J. S. Flechter e P. R. Philp (2001). «Natural attenuation/phytoremediation in the vadose zone of a former industrial sludge basin.» In: *Environmental science and pollution research international* 8.4, pp. 243–249. ISSN: 0944-1344.
- Omenetto, F. G. e D. L. Kaplan (2010). «New opportunities for an ancient material.» In: *Science (New York, N.Y.)* 329.5991, pp. 528–531. ISSN: 1095-9203. DOI: [10.1126/science.1188936](https://doi.org/10.1126/science.1188936).
- Pandian, G. N. et al. (2008). «Bombyx mori midgut membrane protein P252, which binds to Bacillus thuringiensis Cry1A, is a chlorophyllide-binding protein, and the resulting complex has antimicrobial activity.» In: *Applied and environmental microbiology* 74.5, pp. 1324–1331. ISSN: 1098-5336. DOI: [10.1128/AEM.01901-07](https://doi.org/10.1128/AEM.01901-07).
- Paul, D. C. C., G. Subba Rao e D. C. C. Deb (1992). «Impact of dietary moisture on nutritional indices and growth of Bombyx mori and concomitant larval duration». In: *Journal of insect physiology* 38.3, pp. 229–235. ISSN: 00221910. DOI: [10.1016/0022-1910\(92\)90071-K](https://doi.org/10.1016/0022-1910(92)90071-K).
- Rafati, M. et al. (2011). «Phytoremediation potential of Populus alba and Morus alba for cadmium, chromium and nickel absorption from polluted soil». In: *International Journal of Environmental Research* 5.4, pp. 961–970.
- Rahmathulla, V. K. e H. M. Suresh (2008). «Feed consumption and conversion efficiency in male and female bivoltine silkworms (Bombyx mori L.)—a comparative study». In: *Journal of the Entomological Research Society* 10.1, pp. 59–65.
- Ramesh, C., K. I. Basha e H. Lakshmi (2003). «Mulberry—an ideal resources for biotechnological products». In: *Indian Silk* 3, pp. 5–8.
- Ramesha, C., C. M. Anuradha et al. (2010). «Nutrigenetic traits analysis for identification of nutritionally efficient silkworm germplasm breeds». In: *Biotechnology* 9.2, pp. 131–140.
- Ramesha, C., H. Lakshmi et al. (2012). «Nutrigenetic screening strains of the mulberry silkworm, Bombyx mori, for nutritional efficiency». In: *Journal of insect science* 12.15, pp. 1–17.
- Rohrmann, G. F. (2011a). «Introduction to the baculoviruses, their taxonomy, and evolution». In: *Baculovirus molecular biology*. Second edi. Cap. 1.
- (2011b). «The baculovirus replication cycle: effects on cells and insects». In: *Baculovirus molecular biology*. Second edi. Cap. 3.
- Sakaguchi, B. (1978). «Morphology». English. In: *The silkworm: an important laboratory tool*. A cura di Y. Tazima. Kodansha Ltd, Japan, pp. 32–39.
- Sanchez, M. D. (2002). «Mulberry: an exceptional forage available almost worldwide». In: *Mulberry for animal production*. A cura di M. D. Sanchez. Vol. 93, pp. 271–290. ISBN: 92-5-104568-2.
- Scriber, J. M. e F. Slansky Jr. (1981). «The nutritional ecology of immature insects». In: *Annual review of entomology* 26.1, pp. 183–211. ISSN: 0066-4170. DOI: [10.1146/annurev.en.26.010181.001151](https://doi.org/10.1146/annurev.en.26.010181.001151).
- Sharma, A., R. Sharma e H. Machii (2000). «Assessment of genetic diversity in a Morus germplasm collection using fluorescence-based AFLP markers». In: *Theoretical and Applied Genetics* 101.7, pp. 1049–1055.

- Sumida, M. e H. Ueda (2007). «Dietary sucrose suppresses midgut sucrase activity in germfree, fifth instar larvae of the silkworm, *Bombyx mori*». In: *Journal of Insect Biotechnology and Sericology* 37, pp. 31–37.
- Suzuki, T. et al. (1997). «Efficient protein production using a *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus lacking the cysteine proteinase gene.» In: *The Journal of general virology* 78 (Pt 12, pp. 3073–80. ISSN: 0022-1317.
- Takaki, K. e S. Sakurai (2003). «Regulation of prothoracic gland ecdysteroidogenic activity leading to pupal metamorphosis». In: *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33.12, pp. 1189–1199. ISSN: 09651748. DOI: [10.1016/j.ibmb.2003.06.006](https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2003.06.006).
- Tamura, T. et al. (2000). «Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector.» In: *Nature biotechnology* 18.1, pp. 81–4. ISSN: 1087-0156. DOI: [10.1038/71978](https://doi.org/10.1038/71978).
- Tatemastu, K., H. Sezutsu e T. Tamura (2012). «Utilization of Transgenic Silkworms for Recombinant Protein Production». In: *Biotechnology & Biomaterials*, pp. 4–11. DOI: [10.4172/2155-952X.S9-004](https://doi.org/10.4172/2155-952X.S9-004).
- Various Authors (1978). *The silkworm: an important laboratory tool*. A cura di Y. Tazima. Kodansha Ltd., pp. 1–307.
- (2002). «Mulberry for Animal Production: Proceedings of an Electronic Conference Carried Out Between May and August 2000». In: *Mulberry for Animal Production*. A cura di M. D. Sanchez. Food e Agriculture Organization of the United Nations, pp. 1–331. ISBN: 9251045682.
- Waldbauer, G. P. (1968). «The consumption and utilization of food by insects». In: *Advances in insect physiology* 5, pp. 229–288. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2806\(08\)60230-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2806(08)60230-1).
- Wang, X. et al. (2011). «Molecular cloning of a phosphotriesterase-related protein gene of silkworm and its expression analysis in the silkworm infected with *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus». In: *Agricultural Sciences* 02.04, pp. 406–412. ISSN: 2156-8553. DOI: [10.4236/as.2011.24052](https://doi.org/10.4236/as.2011.24052).
- Wei, Z.-J. et al. (2009). «Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of silkworm pupal oil applying the response surface methodology.» In: *Bioresource technology* 100.18, pp. 4214–9. ISSN: 1873-2976. DOI: [10.1016/j.biortech.2009.04.010](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.010).
- Winitchai, S. et al. (2011). «Free Radical Scavenging Activity, Tyrosinase Inhibition Activity and Fatty Acids Composition of Oils from Pupae of Native Thai Silkworm (*Bombyx mori* L.)» In: *kasetsartjournal.ku.ac.th* 412, pp. 404–412.
- Wu, J.-H., Z. Wang e S.-Y. Xu (2007). «Preparation and characterization of sericin powder extracted from silk industry wastewater». In: *Food Chemistry* 103.4, pp. 1255–1262. ISSN: 03088146. DOI: [10.1016/j.foodchem.2006.10.042](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.042).
- Yatsunami, K. (2011). «1-Deoxynojirimycin Content and Alfa-Glucosidase Inhibitory Activity and Heat Stability of 1-Deoxynojirimycin in Silkworm Powder». In: *Food and Nutrition Sciences* 02.02, pp. 87–89. ISSN: 2157-944X. DOI: [10.4236/fns.2011.22011](https://doi.org/10.4236/fns.2011.22011).

La selezione di larve dall'accresciuta efficienza alimentare

Preambolo alla sperimentazione

ESPERIMENTI recenti sulla selezione di linee di baco da seta, caratterizzate da elevata efficienza nutrizionale, sono rari e perlopiù basati su razze tropicali caratterizzate, di per sé, da una bassa capacità di convertire le proteine assunte con la dieta in massa corporea e seta. Inoltre questi studi sono condotti in condizioni sub-ottimali ed esclusivamente su foglia di gelso perché sempre disponibile nelle regioni calde (Ramesha, Anuradha et al., 2010; Ramesha, Lakshmi et al., 2012). La sperimentazione di seguito descritta, ha pertanto lo scopo di colmare una lacuna dovuta in parte ai suddetti fattori, in parte al fatto che la valutazione di dati sull'efficienza nutrizionale, è tra le più ripetitive ed impegnative in termini di tempo impiegato nella raccolta dei dati (Scriber e Slansky Jr., 1981).

L'elemento di novità proposto nel metodo, la cui bontà trova conferma nei risultati ottenuti, è rappresentato dall'integrazione della metodologia tradizionale con uno step di selezione su dieta artificiale, assente negli altri studi e più snello nella messa in pratica. L'utilizzo della dieta sostitutiva, permette l'accelerazione del processo di selezione grazie a dei cicli di allevamento invernali, normalmente assenti nelle regioni a clima temperato dove vengono utilizzate razze diapausanti. E' inoltre importante sottolineare come, la selezione di razze monovoltine nutrizionalmente efficienti e qui impiegate, sia un obiettivo più difficile da raggiungere soprattutto - e non solo - per l'elevata efficienza che le caratterizza, se confrontate con le razze tropicali normalmente oggetto di processi selettivi simili. Per la natura stessa del metodo, i risultati ottenibili sono per di più estendibili anche all'allevamento su dieta artificiale sostitutiva e trovano, pertanto, applicabilità in tutti quei contesti dove questo substrato, risulta preferibile rispetto alla normale alimentazione su foglia.

I risultati ottenuti, sono stati elaborati ed esposti principalmente dal sottoscritto in un manoscritto inviato al **Bullettin of Insectology** nella forma di seguito riportata. Attualmente l'articolo è in fase di revisione per una eventuale pubblicazione nel nuovo numero della rivista.

2

Rearing of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) on artificial diet speeds up selection of monovoltine strains characterised by a high food conversion efficiency and silk productivity

Alessio Saviane ¹, Ludovica Toso ¹ and Silvia Cappellozza ¹

2.1 Abstract

Availability of mulberry leaf under temperate climatic conditions is restricted to the spring-summer season, which represents a limiting factor to select *Bombyx mori* L. strains. The aim of this paper was to demonstrate that the double selection for an increased efficiency in converting food to silk matter by the larva and for a high silk production can be accelerated by coupling traditional rearing on mulberry leaf (the usual food of the monophagous silkworm) and on artificial diet. Nineteen nutritional indexes were calculated on both foods by using the gravimetric method, and a computer-assisted calculation was employed to set up the minimum required production parameters. Results suggest that this strategy can be used to select high performing strains adapted to both foods and that selection

¹Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura - Honey bee and Silkworm Research Unit (CRA-API)

on artificial diet indirectly ameliorates food conversion efficiency by larvae. Obtained pure lines can also be used to produce hybrids suited to be reared on both leaves and diet.

Keywords: artificial diet, selection, *Bombyx mori*, conversion efficiency, gravimetric method.

2.2 Introduction

One of the most important characteristics of the silkworm (*Bombyx mori* L.) is its ability to convert plant proteins to produce silk. The unique natural nourishment of *B. mori* is the mulberry leaf while, under controlled laboratory conditions, larvae can be reared also on artificial diets. In 2004 an original diet recipe was developed and patented by CRA-API (L. Cappelozza et al., 2005). In contrast to mulberry leaf, artificial diet does not encounter any seasonal changing in its quality (Scriber and Slansky Jr., 1981) and it is also exploitable in germ-free rearing systems (Sumida and Ueda, 2007). However, according to the problem that artificial diet is a quite expensive production factor, its relevance is currently limited to high-tech applications. For example, when the silkworm is used as a bioreactor to obtain recombinant proteins (Kato et al., 2010; Tatemastu, Sezutsu, and Tamura, 2012) or as a biological model (Hamamoto, Tonoike, et al., 2009; Hamamoto, Kamura, et al., 2005; Kaito and Sekimizu, 2007), the diet pathogen-free background is the best rearing choice. Therefore, in order to enlarge artificial diet utilization a critical point is to obtain silkworm strains able to produce a large amount of silk with a high efficiency of food transformation into the textile fibre, so that diet rearing can be cheap enough to be affordable. On the other hand, this insect characteristic should be retained when the selected *B. mori* strains are reared again on the mulberry leaf, so that multiple-purpose silkworms can be developed through one effort of selection only.

Currently, selection processes based on nutritional indexes have been carried out on tropical polyvoltine strains (Ramesha, Anuradha, et al., 2010; Ramesha, Lakshmi, et al., 2012) while attempts into this direction have not recently been devoted to monovoltine strains, due to the progressive loss of importance of sericulture in temperate countries during the last century.

Another reason for the scarce application of this technique of selection is because this process is very time-demanding and employs a lot of manual labour, to individually and daily weigh: larvae, administered leaf or diet, remaining food, and larval excreta. In addition, the low heritability of nutritional indexes and the lack of application of appropriate statistical tool for analysis of phenotypic data are further constraints (Seidavi, 2009). In fact, sericulture key-characters are under the concerted action of several genes (polygenic or quantitative traits) and non-hereditary factors. Up-to-

date progresses into genetic marker-assisted selection have been done mostly for characters ruled by single genes (Hou et al., 2013), while for quantitative traits results are still at their very beginning (Zhan et al., 2009; Esfandiari, Gharahveysi, and Seidavi, 2011).

Therefore, we attempted a new approach, by thinking that a limited amount of food distribution (artificial diet, whose quality is standardised, with difference with respect to leaf) added to the selection for quantitative characters (silk production traits, with a high heritability as demonstrated by Gamo and Hirabayashi (1983) might result in the amelioration of the food conversion of silkworm strains. Nutritional indexes were calculated at the beginning and at the end of the experiment, to validate our study hypothesis.

2.3 Materials and methods

2.3.1 Silkworm strains

Six productive monovoltine strains belonging to the CRA-API's germplasm collection and characterized by different morphological features were chosen to be reared on mulberry leaves and artificial diet. After a preliminary experiment (data not shown) two strains, namely 129 and 124 (according to the germplasm collection progressive numeration) were chosen for selection. The former has a Japanese phenotype (larval body with markings) and it is more adaptable to artificial diet, the latter has a Chinese phenotype (plain larval body) and a lower adaptability to artificial diet.

2.3.2 Selection strategy

Larvae were repeatedly selected for silk production throughout 6 generations over a three-year period and, at the end, evaluated for their nutritional efficiency. Larvae were reared as a bulk according to the best practice procedures on both mulberry leaves and artificial diet (L. Cappelozza et al., 2005; Grekov, Kipriotis, and Tzenov, 2005) until the end of the fourth instar. After the last moult, 3 batches of 100 healthy larvae for each strain were reared until spinning of the cocoons.

2.3.3 Selection on artificial diet

Each strain and strain selection was reared thrice on artificial diet along the three years of the experiment duration, in the autumn-winter season. Acid treatment of silkworm eggs was carried out to disrupt the diapause of the spring layings. Larvae were fed with a daily fixed and weighed amount of food sufficient to achieve the wandering stage (S. Cappelozza and Saviane, 2009). This phase of selection was established to individuate the best silk producers, able to convert even a measured amount of food into silk, without wasting much food for their body metabolism.

2.3.4 Selection on leaf

Each strain and strain selection was reared thrice on mulberry leaf along the three years of the experiment duration, in the spring-summer season. Larvae were fed “ad libitum” until the wandering stage. This phase of selection was alternated to the previous one, to not weaken strains by continuous diet rearing and to permit a slow adaptation to diet rearing, to avoid a quick decrease in the silk production capacity.

2.3.5 Production assessment

Five to six days after spinning, cocoons were collected and individually weighed, then they were cut and the silk shell individually weighed after pupa extraction; eventually the silk ratio was calculated (silk ratio= weight of silk shell/weight of cocoon) according to the pupa sex (Sakaguchi, 1978). Pupae were numbered to maintain their production parameters identifiable. Obtained data were processed by designing an Excel data sheet, with a filter that fixed a threshold for the cocoon and shell weight in addition to the silk ratio. The threshold was adjusted until the identification of the ten best performing individuals for each sex, which were then backcrossed (Greiss, 2003). The highest stringency was applied to shell weight and silk ratio respectively. The remaining pupae were discarded. Eggs laid by selected moths originated the relative selections (named as 129 top 10= 129T10 and 124 top 10= 124T10). After each generation silk productivity selection was reiterated for the larvae hatched from each respective egg laying, and cocoon and shell weight and silk ratio were compared for females and males separately. On the other hand, the same strains 129 and 124 were reared on leaf and diet under the same conditions than for 129T10 and 124T10 without any selection pressure to maintain the population of origin as comparison.

2.3.6 Nutritional indexes

At the end of the experiment, after three years, the different strains were assessed for their nutritional efficiency during the fifth instar. Efficiency analysis was limited to this stage since the larvae consume 80-85% of the total amount of food in this phase (Rahmathulla and Suresh, 2008). After rearing in bulk until the end of the last moult, larvae were divided into males and females (Rahmathulla and Suresh, 2008) according to abdominal sexual markings (Sakaguchi, 1978). For each strain (129T10, 129, 124T10 and 124) 8 males and 8 females were reared individually in covered plastic cups both on mulberry leaf and artificial diet to reach cocoon spinning. Coverage of cups was done to maintain a proper humidity, fundamental for the right development of the larvae (Esfandarani, Bahreini, and Tajabadi, 2002; Paul, Subba Rao, and Deb, 1992). Once the wandering stage had initiated the larvae were left in the cups without food where they completed the spinning process. In accordance with the standard gravimetric method (Waldbauer, 1968) the fresh weight of larvae, new added food (leaf or diet), faeces and left

over food were recorded on a daily basis and used to calculate nutritional indexes (Ramesha, Anuradha, et al., 2010; Ramesha, Lakshmi, et al., 2012). Furthermore, we introduced the correction proposed by Candy and Baker (2002), which is the most appropriate, in our experimental setup, for the calculation of the ingested food. Formulae, which were utilized in index calculation for consumption traits are as follows:

$$Ingesta (I) = \frac{w_{t_0} - w_{t_1}F}{\left\{ (F - 1) [\ln(F)]^{-1} \right\}}$$

Where w_{t_0} and w_{t_1} represent the weight of freshly added food and left over food respectively; F is a weight correction factor for natural moisture loss and is calculated as the ratio between initial and final weight (after 24 hours) of an amount of control food.

$$Digesta (D) = \frac{Ingesta}{\text{fresh weight of litter}}$$

$$Excreta (E) = Ingesta - Digesta$$

$$\text{Approximate Digestibility (AD)} = \frac{Digesta}{Ingesta} * 100$$

$$\text{Reference Ratio (RR)} = \frac{Ingesta}{Excreta}$$

$$\text{Consumption Index (CI)} = \frac{Ingesta}{V^{th} \text{ instar mean fresh larval weight} * V^{th} \text{ instar duration (days)}}$$

$$\text{Relative Growth Rate (RGR)} = \frac{V^{th} \text{ instar larval weight gain}}{V^{th} \text{ instar mean fresh larval weight} * V^{th} \text{ instar duration (days)}}$$

$$\text{Respiration (R)} = Digesta - \text{larval maximum weight}$$

$$\text{Metabolic Rate (MR)} = \frac{Respiration}{V^{th} \text{ instar mean fresh larval weight} * V^{th} \text{ instar duration (days)}}$$

Formulae for conversion efficiency of *Ingesta* (*ECI*) and *Digesta* (*ECD*) are as follows:

$$\text{ECI to larva (ECI}_L\text{)} = \frac{V^{th} \text{ instar larval weight gain}}{Ingesta} * 100$$

$$\text{ECD to larva (ECD}_L\text{)} = \frac{V^{th} \text{ instar larval weight gain}}{Digesta} * 100$$

$$ECI \text{ to cocoon } (ECI_C) = \frac{\text{cocoon weight}}{\text{Ingesta}} * 100$$

$$ECD \text{ to cocoon } (ECD_C) = \frac{\text{cocoon weight}}{\text{Digesta}} * 100$$

$$ECI \text{ to shell } (ECI_S) = \frac{\text{shell weight}}{\text{Ingesta}} * 100$$

$$ECD \text{ to shell } (ECD_S) = \frac{\text{shell weight}}{\text{Digesta}} * 100$$

Formulae to calculate *Ingesta* and *Digesta* per gram of cocoon and cocoon shell are as follows:

$$\text{Ingesta per cocoon gram } \left(\frac{I}{g_C} \right) = \frac{\text{Ingesta}}{\text{cocoon weight}}$$

$$\text{Digesta per cocoon gram } \left(\frac{D}{g_C} \right) = \frac{\text{Digesta}}{\text{cocoon weight}}$$

$$\text{Ingesta per shell gram } \left(\frac{I}{g_S} \right) = \frac{\text{Ingesta}}{\text{shell weight}}$$

$$\text{Digesta per shell gram } \left(\frac{D}{g_S} \right) = \frac{\text{Digesta}}{\text{shell weight}}$$

During the experiments, a reserve batch was reared for each thesis to possibly replace larvae with abnormal development.

2.3.7 Statistical analysis

After three years and six generations of selection nutritional indexes data were analysed by means of ANOVA and significant differences explored by Tukey's post-hoc test.

2.4 Results

2.4.1 Selection for silk production

As explained in the previous chapter, selection based on main productive traits was carried out in alternation on mulberry leaf and on artificial diet; T10 sub-populations started to split themselves from the parental strains throughout generations. Our experiment, confirmed the high heritability for characters like cocoon weight (73.60%), shell weight (80.20%) and shell ratio (72.40%) (Gamo and Hirabayashi, 1983). However, some differences in heritability were observed between 129 and 124 strains, proving that gene frequencies, which differ among different populations, affect the selection process (Grekov, Kipriotis, and Tzenov, 2005). In particular strain 129 proved

Table 2.1: Data on male raw productivity recorded on mulberry leaves during the 3rd year of selection, spring-summer season. Silk ratio is calculated as the ratio between cocoon weight and shell weight in grams. Data are sorted according to descending shell weights. As the omnibus test was significant for all parameters (p -value <0.001) post-hoc test was carried out. Different letters indicate significant differences among strains according to Tukey's test.

Strain	cocoon \pm SD(g)	shell \pm SD(g)	silk ratio \pm SD(%)
129T10	1.463 \pm 0.091 ^a	0.351 \pm 0.034 ^a	23.97 \pm 1.83 ^a
129	1.337 \pm 0.108 ^b	0.321 \pm 0.027 ^b	24.03 \pm 1.52 ^a
124T10	1.303 \pm 0.099 ^b	0.309 \pm 0.034 ^{bc}	23.75 \pm 2.45 ^a
124	1.322 \pm 0.133 ^b	0.296 \pm 0.029 ^c	22.50 \pm 2.02 ^b

Table 2.2: Data on female raw productivity recorded on mulberry leaves during the 3rd year of selection, spring-summer season. Silk ratio is calculated as the ratio between cocoon weight and shell weight in grams. As in Table 2.1 different letters indicate significant differences according to ANOVA and Tukey's post-hoc test.

Strain	cocoon \pm SD(g)	shell \pm SD(g)	silk ratio \pm SD(%)
129T10	1.793 \pm 0.121 ^a	0.369 \pm 0.034 ^a	20.64 \pm 1.94 ^a
124T10	1.660 \pm 0.150 ^b	0.349 \pm 0.030 ^b	21.11 \pm 1.64 ^a
129	1.677 \pm 0.146 ^b	0.342 \pm 0.031 ^b	20.45 \pm 1.17 ^a
124	1.621 \pm 0.148 ^b	0.314 \pm 0.024 ^c	19.44 \pm 1.33 ^b

itself to be more capable than strain 124 of increasing its performances. As highlighted in Table 2.1, 129T10 males were superior to those of 129 for the shell and cocoon weights without hindering silk ratios and the same behaviour was recorded for females (Table 2.2). An identical trend was assessed when 124-124T10 male silk shells were compared (Table 2.1) even though the differences between the shells were not significant as those for the silk ratios. On the other hand, the difference was significant also for shells in the female group (Table 2.2).

2.4.2 Consumption traits

Data recorded by following the gravimetric method were used to calculate 9 indexes concerning consumption traits of the 4 strains under examination, separately for males and females, on both foods. *Ingesta (I)*, *Digesta (D)*, *Excreta (E)*, *Approximate Digestibility (AD)*, *Reference Ratio (RR)*, *Consumption Index (CI)*, *Relative Growth Rate (RGR)*, *Respiration (R)* and *Metabolic Rate (MR)* values were analysed using factorial ANOVA and post-hoc Tukey's test.

The factors were *Strain* (4 levels), *Diet* (2 levels) and *Gender* (2 levels).

2.4. RESULTS

Table 2.3: ANOVA results for consumption traits. *P*-values for main effects and interactions are reported and marked in accordance to significance; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; factors: Strain (*S*), Diet (*D*), Gender (*G*). *I*, Ingesta; *D*, Digesta; *E*, Excreta; *AD*, Approximate Digestibility; *RR*, Reference Ratio; *CI*, Consumption Index; *RGR*, Relative Growth Rate; *R*, Respiration; *MR*, Metabolic Rate.

Factor	<i>I</i> (p)	<i>D</i> (p)	<i>E</i> (p)	<i>AD</i> (p)	<i>RR</i> (p)	<i>CI</i> (p)	<i>RGR</i> (p)	<i>R</i> (p)	<i>MR</i> (p)
<i>S</i>	<0.001***	0.262	<0.001***	<0.001***	<0.001***	<0.001***	<0.001***	0.008**	<0.001***
<i>D</i>	<0.001***	<0.001***	<0.001***	<0.001***	0.092	<0.001***	<0.001***	<0.001***	0.035*
<i>G</i>	<0.001***	<0.001***	<0.001***	0.002**	0.003**	0.040*	0.251	0.397	0.576
<i>S</i> * <i>D</i>	<0.001***	<0.001***	<0.001***	0.015*	0.025*	<0.001***	<0.001***	<0.001***	<0.001***
<i>S</i> * <i>G</i>	0.035*	0.214	0.333	0.715	0.993	0.759	<0.001***	0.704	0.680
<i>D</i> * <i>G</i>	0.321	0.133	0.724	0.942	0.343	0.333	0.510	0.863	0.580
<i>S</i> * <i>D</i> * <i>G</i>	0.963	0.475	0.350	0.146	0.155	0.769	0.325	0.193	0.081

Table 2.4: ANOVA results for efficiency traits. *P*-values for main effects and interactions are reported and marked in accordance to significance; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; factors: Strain (*S*), Diet (*D*), Gender (*G*). *ECI_L* – *ECD_L*, respectively Efficiency of Conversion of Ingesta and Digesta to Larva; *ECI_C* – *ECD_C*, respectively Efficiency of Conversion of Ingesta and Digesta to Cocoon; *ECI_S* – *ECD_S*, respectively Efficiency of Conversion of Ingesta and Digesta to Shell; *I/g_C* – *D/g_C*, respectively Ingesta and Digesta per gram of Cocoon; *I/g_S* – *D/g_S*, respectively Ingesta and Digesta per gram of Shell.

Factor	<i>ECI_L</i> (p)	<i>ECD_L</i> (p)	<i>ECI_C</i> (p)	<i>ECD_C</i> (p)	<i>ECI_S</i> (p)	<i>ECD_S</i> (p)	<i>I/g_C</i> (p)	<i>D/g_C</i> (p)	<i>I/g_S</i> (p)	<i>D/g_S</i> (p)
<i>S</i>	<0.001***	<0.001***	<0.001***	0.093	<0.001***	0.053	<0.001***	0.043*	<0.001***	0.085
<i>D</i>	<0.001***	<0.001***	<0.001***	<0.001***	<0.001***	<0.001***	<0.001***	<0.001***	<0.001***	<0.001***
<i>G</i>	0.015*	0.316	<0.001***	<0.001***	<0.001***	<0.001***	<0.001***	<0.003**	<0.001***	<0.001***
<i>S</i> * <i>D</i>	0.001***	0.001***	0.194	0.285	<0.001***	<0.001***	0.122	0.178	<0.001***	<0.001***
<i>S</i> * <i>G</i>	0.188	0.135	0.448	0.633	0.004**	0.084	0.414	0.764	0.044*	0.199
<i>D</i> * <i>G</i>	0.198	0.351	0.428	0.801	0.646	0.674	0.310	0.650	0.477	0.280
<i>S</i> * <i>D</i> * <i>G</i>	0.974	0.239	0.512	0.083	0.872	0.889	0.323	0.053	0.822	0.942

Looking at Table 2.3 it is possible to see that the highest order interaction was not significant for any consumption trait index as well as the *Diet* * *Gender* interaction. The *Strain* * *Gender* interaction was significant only for *I* and *RGR* values. On the other hand, the *Strain* * *Diet* interaction was significant for all indexes, the *Gender* main effect was significant for all the indexes except for *RGR*, *R*, and *MR*, and the main effects *Strain* and *Diet* were significant for all the indexes except for *D* and *RR* respectively. On the whole, by evaluating the consumption indexes and particularly those involved in optimizing the cost-benefit ratio (Ramesha, Lakshmi, et al., 2012) as *I* and *CI*, it clearly appears that males have the lowest consumption (Table 2.5 and 2.9) and that principally occurs on mulberry leaf (Table 2.6).

Moreover, among the strains, 129T10 exhibits the best performances if compared to its origin strain (129) and to the other 2 strains (see Table 2.7), which show a significantly different behaviour in relation to their interaction with the factor *Diet* (see Table 2.8). Results of 129T10 are, on the other hand, the most consistent, independently from the food, while 124T10 is very sensitive to the kind of nutritional source, even when compared to 124, with reasonably good performances on mulberry leaf and very negative

Table 2.5: A summary of the most important indexes used to evaluate the cost-benefit ratio for males and females. Tukey post-hoc tests were carried out after significant ANOVA omnibus test. Different letters indicate significant differences among genders according to Tukey's test. *I*, Ingesta; *D*, digesta; *ECI_L* Efficiency of Conversion of Ingesta to Larva; *ECI_C* Efficiency of Conversion of Ingesta to Cocoon; *ECI_S* Efficiency of Conversion of Ingesta to Larva; *I/gC* – *D/gC*, respectively Ingesta and Digesta per gram of Cocoon; ; *I/gS* – *D/gS*, respectively Ingesta and Digesta per gram of Shell.

Gender	<i>I</i> ± SD(g)	<i>CI</i> ± SD(g)	<i>ECI_L</i> ± SD(g)	<i>ECI_C</i> ± SD(%)	<i>ECI_S</i> ± SD(%)	<i>I/gC</i> ± SD(g)	<i>I/gS</i> ± SD(g)
males	8.436 ± 1.324 ^a	0.696 ± 0.097 ^b	29.366 ± 3.736 ^b	15.501 ± 1.481 ^b	3.461 ± 0.425 ^a	6.509 ± 0.618 ^b	29.326 ± 3.626 ^a
females	9.385 ± 1.476 ^b	0.678 ± 0.090 ^a	30.411 ± 4.260 ^a	16.694 ± 1.542 ^a	3.291 ± 0.369 ^b	6.042 ± 0.584 ^a	30.775 ± 3.573 ^b

Table 2.6: A summary of the most important indexes used to evaluate the cost-benefit ratio on artificial diet and mulberry leaf. Tukey post-hoc tests were carried out after significant ANOVA omnibus test. Different letters indicate significant differences among foods. *I*, Ingesta; *D*, digesta; *ECI_L* Efficiency of Conversion of Ingesta to Larva; *ECI_C* Efficiency of Conversion of Ingesta to Cocoon; *ECI_S* Efficiency of Conversion of Ingesta to Larva; *I/gC* – *D/gC*, respectively Ingesta and Digesta per gram of Cocoon; *I/gS* – *D/gS*, respectively Ingesta and Digesta per gram of Shell.

Diet	<i>I</i> ± SD(g)	<i>CI</i> ± SD(g)	<i>ECI_L</i> ± SD(%)	<i>ECI_C</i> ± SD(%)	<i>ECI_S</i> ± SD(%)	<i>I/gC</i> ± SD(g)	<i>I/gS</i> ± SD(g)
mulberry leaf	7.970 ± 0.890 ^a	0.672 ± 0.057 ^a	27.931 ± 2.553 ^b	16.544 ± 1.388 ^a	3.514 ± 0.336 ^a	6.086 ± 0.507 ^a	28.711 ± 2.694 ^a
artificial diet	9.851 ± 1.341 ^b	0.702 ± 0.118 ^b	31.846 ± 4.284 ^a	15.651 ± 1.722 ^b	3.238 ± 0.424 ^b	6.465 ± 0.710 ^b	31.390 ± 4.009 ^b

outputs on artificial diet.

2.4.3 Efficiency traits

Efficiency of conversion of *Ingesta* (*ECI*) and *Digesta* (*ECD*) to larva, cocoon and shell for males and females were calculated on both mulberry leaves and artificial diet. The same was done for *Ingesta* and *Digesta* per gram (respectively *I/g* and *D/g*) of cocoon and silk shell.

Factorial ANOVA was carried out in the same way as for consumption traits and the results are summarized in Table 2.4. Three-way interaction is not significant for any index as well as the *Diet* * *Gender* interaction, whereas the *Strain* * *Gender* interaction is significant but only for *ECI* to shell and *I/g* of shell. The *Strain* * *Diet* interaction is significant for all indexes except for those related to the cocoon (see Table 2.4) and the *Gender* effect is significant for all indexes except for *ECI* and *ECD* to larva. The *Strain* * *Diet* interaction is significant for all indexes except for those related to the cocoon (see Table 2.4) and the *Gender* effect is significant for all indexes except for *ECI* and *ECD* to larva. The factor *Diet* is highly significant (p-level<0.001) for all indexes, while the effect *Strain* is significant for all indexes except for *ECD* to cocoon and shell and for *D/g* to shell.

As in the previously-mentioned case of the consumption traits, 129T10

2.4. RESULTS

Table 2.7: A summary of the most important indexes used to evaluate the cost-benefit ratio for parental strains and their breeds. Tukey post-hoc tests were carried out after significant ANOVA omnibus test. Different letters indicate significant differences among strains. *I*, Ingesta; *D*, digesta; ECI_L Efficiency of Conversion of Ingesta to Larva; ECI_C Efficiency of Conversion of Ingesta to Cocoon; ECI_S Efficiency of Conversion of Ingesta to Larva; $I/gC - D/gC$, respectively Ingesta and Digesta per gram of Cocoon; $I/gS - D/gS$, respectively Ingesta and Digesta per gram of Shell.

Diet	<i>I</i> ± SD(g)	<i>CI</i> ± SD(g)	ECI_L ± SD(%)	ECI_C ± SD(%)	ECI_S ± SD(%)	I/gC ± SD(g)	I/gS ± SD(g)
129T10	8.114 ± 1.056 ^a	0.579 ± 0.055 ^a	33.376 ± 4.895 ^a	17.644 ± 1.365 ^a	3.786 ± 0.335 ^a	5.702 ± 0.458 ^a	26.622 ± 2.476 ^a
129	9.657 ± 1.379 ^c	0.685 ± 0.051 ^b	27.241 ± 3.197 ^b	15.680 ± 1.166 ^b	3.148 ± 0.262 ^b	6.413 ± 0.493 ^b	31.978 ± 2.697 ^b
124T10	9.154 ± 1.856 ^b	0.747 ± 0.093 ^c	29.643 ± 2.146 ^c	15.489 ± 1.362 ^b	3.304 ± 0.431 ^b	6.507 ± 0.606 ^b	30.799 ± 4.282 ^b
124	8.715 ± 1.060 ^b	0.736 ± 0.056 ^c	29.294 ± 2.717 ^c	15.576 ± 1.540 ^b	3.265 ± 0.249 ^b	6.481 ± 0.645 ^b	30.802 ± 2.441 ^b

Table 2.8: Consumption and conversion efficiency indexes used to evaluate the cost-benefit ratio for strains on different foods. Tukey post-hoc tests were carried out after significant ANOVA omnibus test. Different letters indicate significant differences. Results are ordered according to descending ECI to shell values. *I*, Ingesta; *D*, digesta; ECI_L Efficiency of Conversion of Ingesta to Larva; ECI_C Efficiency of Conversion of Ingesta to Cocoon; ECI_S Efficiency of Conversion of Ingesta to Larva; $I/gC - D/gC$, respectively Ingesta and Digesta per gram of Cocoon; $I/gS - D/gS$, respectively Ingesta and Digesta per gram of Shell. *L*, mulberry leaf; *D*, artificial diet.

Strain * Diet	<i>I</i> ± SD(g)	<i>CI</i> ± SD(g)	ECI_L ± SD(%)	ECI_C ± SD(%)	ECI_S ± SD(%)	I/gC ± SD(g)	I/gS ± SD(g)
129T10*L	7.537 ± 0.754 ^a	0.612 ± 0.044 ^b	29.429 ± 2.388 ^{bc}	17.924 ± 1.272	3.832 ± 0.304 ^a	5.606 ± 0.404	26.253 ± 2.135 ^a
129T10*D	8.692 ± 1.012 ^{bc}	0.547 ± 0.046 ^a	37.322 ± 3.252 ^a	17.365 ± 1.438	3.740 ± 0.367 ^a	5.797 ± 0.501	26.992 ± 2.796 ^a
124T10*L	7.509 ± 0.803 ^a	0.671 ± 0.047 ^c	29.478 ± 1.745 ^{bc}	16.290 ± 0.917	3.638 ± 0.239 ^a	6.158 ± 0.357	27.602 ± 1.861 ^{ae}
124*L	8.060 ± 0.426 ^{ab}	0.704 ± 0.039 ^c	27.500 ± 1.798 ^{cd}	15.817 ± 1.320	3.337 ± 0.191 ^b	6.362 ± 0.516	30.060 ± 1.691 ^{be}
129*L	8.773 ± 0.898 ^{bc}	0.700 ± 0.047 ^c	25.315 ± 1.719 ^d	16.144 ± 1.027	3.249 ± 0.235 ^{bc}	6.219 ± 0.411	30.928 ± 2.158 ^{bc}
124*D	9.371 ± 1.107 ^c	0.769 ± 0.052 ^d	31.087 ± 2.273 ^b	15.335 ± 1.741	3.194 ± 0.284 ^{bc}	6.600 ± 0.750	31.545 ± 2.878 ^{bcd}
129*D	10.541 ± 1.207 ^d	0.670 ± 0.053 ^c	29.167 ± 3.202 ^{bc}	15.217 ± 1.139	3.048 ± 0.255 ^c	6.607 ± 0.503	33.028 ± 2.833 ^{cd}
124T10*D	10.800 ± 0.833 ^d	0.823 ± 0.058 ^e	29.809 ± 2.532 ^{bc}	14.689 ± 1.274	2.971 ± 0.298 ^c	6.857 ± 0.608	33.996 ± 3.553 ^d

selected individuals appear to be excellent performers with the highest ECI values and the lowest I/g of cocoon and shell values (Table 2.7). Females are better in converting food matter into larval mass and cocoons but inferior to males in converting it to silk shells. It is noteworthy that this result makes sense as females have to allocate resources for egg production too; however, this datum disagrees with the findings of Rahmathulla and Suresh (2008). One more time the *Food* factor shows an interaction with the *Strain* factor producing a strong effect principally on the 124-124T10 couple and particularly on the ECI to shell, which is one of the ultimate indexes in evaluating nutritional efficiency.

While 124T10 on mulberry leaf is not significantly different from 129T10 (the best on both foods; see Table 2.8), if fed with artificial diet, this selected strain has the worst ECI to shell value. Moreover, the same pattern can be found by looking at the *Ingesta* required to produce one gram of silk shell (I/g to shell; see Table 2.8) whereas this difference is less extreme by looking to ECI to cocoon and to larva.

Table 2.9: Consumption and conversion efficiency indexes used to evaluate the cost benefit-ratio for males and females of different strains. Tukey post-hoc tests were carried out after significant ANOVA omnibus test. Different letters indicate significant differences. Results are ordered according to descending *ECI* to shell values. *I*, Ingesta; *D*, digesta; *ECI_L* Efficiency of Conversion of Ingesta to Larva; *ECI_C* Efficiency of Conversion of Ingesta to Cocoon; *ECI_S* Efficiency of Conversion of Ingesta to Larva; *I/gC – D/gC*, respectively Ingesta and Digesta per gram of Cocoon; *I/gS – D/gS*, respectively Ingesta and Digesta per gram of Shell. *M*, males; *F*, females.

Strain * Diet	<i>I</i> ± SD(g)	<i>CI</i> ± SD(g)	<i>ECI_L</i> ± SD(%)	<i>ECI_C</i> ± SD(%)	<i>ECI_S</i> ± SD(%)	<i>I/gC</i> ± SD(g)	<i>I/gS</i> ± SD(g)
129T10*M	7.552 ± 0.893 ^a	0.588 ± 0.050	32.270 ± 4.447	17.053 ± 1.117	3.994 ± 0.257 ^a	5.888 ± 0.392	25.140 ± 1.695 ^a
129T10*F	8.677 ± 0.911 ^b	0.571 ± 0.060	34.481 ± 5.208	18.236 ± 1.363	3.579 ± 0.271 ^b	5.515 ± 0.454	28.104 ± 2.261 ^b
124T10*M	8.692 ± 1.824 ^b	0.763 ± 0.106	29.167 ± 2.203	14.796 ± 1.465	3.355 ± 0.394 ^{bc}	6.821 ± 0.673	30.222 ± 3.787 ^{bd}
124*F	8.879 ± 1.260 ^{bc}	0.729 ± 0.057	29.112 ± 2.944	16.346 ± 1.762	3.288 ± 0.270 ^{cd}	6.194 ± 0.759	30.605 ± 2.504 ^{bcd}
124T10*F	9.617 ± 1.826 ^{cd}	0.730 ± 0.078	30.119 ± 2.043	16.183 ± 0.812	3.254 ± 0.472 ^{cd}	6.194 ± 0.310	31.376 ± 4.779 ^{cd}
129*M	8.949 ± 1.165 ^{bc}	0.689 ± 0.052	26.551 ± 3.154	15.348 ± 1.287	3.252 ± 0.264 ^{cd}	6.559 ± 0.550	30.943 ± 2.596 ^{cd}
124*M	8.551 ± 0.823 ^b	0.743 ± 0.055	29.476 ± 2.554	14.806 ± 0.727	3.243 ± 0.232 ^{cd}	6.769 ± 0.327	31.000 ± 2.442 ^{cd}
129*F	10.366 ± 1.226 ^d	0.681 ± 0.052	27.931 ± 3.186	16.013 ± 0.958	3.044 ± 0.220 ^d	6.267 ± 0.392	33.013 ± 2.452 ^c

2.5 Discussion and conclusions

Silkworm conversion efficiency connected to a low level of food consumption is one of the chief factors in optimizing the benefit-cost ratio in the field of sericulture. Experiments and improvements have been recently performed into this direction using strains adapted to tropical climates, which are characterized by a low conversion efficiency and which, thus, obtain large benefits from selection processes based on nutritional indexes.

In the present work the same target was pursued on monovoltine strains, well-adapted to European climates, and already capable of a good conversion of proteins they get from the food. Since the goal was to enhance the silk production on both mulberry leaf and artificial diet but not on a “power component” basis (Scriber and Lederhouse, 1983) i.e., not by increasing the quantity of ingested food, our strategy was focused on consecutive rearing cycles by alternating high-low stringency.

The low stringency step was performed on mulberry leaf, when larvae were selected just according to their productivity (cocoon and shell weight and silk ratio), while the high stringency step was represented by rearing cycles on artificial diet. In this case, larvae were not fed “ad libitum” during the last instar, as they were fed on mulberry leaf, but with a fixed amount of diet; therefore, on this basis, it was possible to identify those individuals that were able “to produce more with less”. On the other hand, the artificial diet represented an additional constraint for the larvae, since adaptability to this mulberry succedaneum is not equal for all the strains, even though this trait is selectable.

After three years of selection the evaluation of nutritional indexes confirmed that the adopted strategy worked, although with variable efficacy. According to Ramesha, Lakshmi, et al. (2012), *CI* and *ECI* are the driving indexes in deciding efficiency of strains and thus, in our conditions, 129T10 expressed the best performances. On the whole, it showed the lowest *I* and

2.5. DISCUSSION AND CONCLUSIONS

CI values on both foods consistently for males and females. The conversion efficiency of *Ingesta* to larva, cocoon and shell were the highest and the grams of *Ingesta* necessary to produce one gram of cocoon and silk shell were the lowest, indicating that the larval enzymatic apparatus used to convert nutrients to body matter and, more specifically, to silk proteins was finely tuned. On the other hand, 124T10 showed opposite results on the two different foods. The *Ingesta* value was the highest on artificial diet. However, when switched to mulberry leaves, its performances clearly changed and 124T10 showed the best *I* value and results related to *CI* were very similar to those of 129T10 (Table 2.8). Moreover, *ECI* to shell had also the same pattern: similar to 129 and 124 on the diet, to 129T10 on the mulberry leaf, as pointed out in Table 2.8.

Therefore, the implemented selection strategy worked well for 129T10, which showed the best performances and an important improvement compared to its parental strain in all our conditions. Due to low values of *I* and *CI* this achievement seems to be linked to the capability of larvae to maintain their metabolism working properly in spite of a low intake of nutrients indicating a high conversion efficiency, which is confirmed by *ECI*, *ECD* and *I/g* values. In the case of 124T10, the adopted selection process seems only partly appropriate since desired results were achieved merely on mulberry leaf and were not always statistically significant. Looking at the opposite performances of the 124-124T10 couple on diet and leaf, we suppose that in our selection strategy there are two forces acting against each other: the first one to ameliorate performances, the other to increase adaptability to artificial diet. The final effect was that 124T10 enhanced a little bit its performances on leaf as a weak result of the selection process, but got worse on diet since it was not able to fully exploit this food matrix. Probably adaptation represented a stronger constraint than selection for improved performances. This led 124, which did not undergo to any imposed pressure, to be better than its selected offspring on artificial diet (see for instance *I* and *ECI* to shell even though the latter without significant differences).

On the other hand, a weak improvement of production performances of 124T10 on mulberry leaf and high values of *RGR* (data not shown) and *ECI* to larva on diet indicate that larvae are consuming a lot of food trying to reach the selection objectives, but without succeeding. This phenomenon might be due to differences in amylase activity of different strains or to the scarce development of a symbiotic intestinal flora in the diet rearing (Chatterjee et al., 1993; Manjula et al., 2010; Moon and Seol, 1983).

In conclusion, our strategy proved to work on 129 and to a certain extent also on 124, even though with a lower efficiency; these experimental data suggest that in case of strains with low adaptability to the artificial diet (for example, Chinese strains) a preliminary period of adaptation to diet should be established before starting with a strict selection process. The evaluation by means of nutritional indexes can thus be used as a measure of adaptability to diet and as a tool to decide whether selecting on both foods or just on mulberry leaves. In addition, obtained breeds can represent a starting point for the production of hybrids, whose performances can be

further improved through heterosis (T. Singh, P. K. Singh, and Sahaf, 2012).

2.6 Acknowledgements

The authors thank all the technical staff of CRA-API, which contributed to data collection and to silkworm strains conservation. This research is in partial fulfilment of the requirements for a PhD degree at the Padua University (Italy); PhD School of Crop Science.

References of chapter 2

- Candy, S. G. and S. C. Baker (2002). “Calculating food consumption in the laboratory: A formula to adjust for natural weight loss”. In: *Australian Journal of Entomology* 41.2, pp. 170–173. ISSN: 1326-6756. DOI: [10.1046/j.1440-6055.2002.00285.x](https://doi.org/10.1046/j.1440-6055.2002.00285.x).
- Cappellozza, L. et al. (2005). “Artificial diet rearing system for the silkworm *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae): effect of vitamin C deprivation on larval growth and cocoon production”. In: *Applied Entomology and Zoology* 40.3, pp. 405–412. ISSN: 0003-6862. DOI: [10.1303/aez.2005.405](https://doi.org/10.1303/aez.2005.405).
- Cappellozza, S. and A. Saviane (2009). “La dieta artificiale per il baco da seta : metodica per l ’ allevamento su piccola scala”. In: *APOidea* 6, pp. 46–57.
- Chatterjee, S. N. et al. (1993). “Correlation between yield and biochemical parameters in the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L”. In: *Theoretical and Applied Genetics* 87.3, pp. 385–391. ISSN: 0040-5752. DOI: [10.1007/BF01184928](https://doi.org/10.1007/BF01184928).
- Esfandarani, M. Talebi, R. Bahreini, and N. Tajabadi (2002). “Effect of mulberry leaves moisture on some traits of the silkworm (*Bombyx mori* L.)” In: *Sericologia* 42.2, pp. 285–289.
- Esfandiari, M., S. Gharahveysi, and A. Seidavi (2011). “Genetics, breeding and selection in silkworm: A review”. In: *Journal of Food, Agriculture & Environment* 9.3&4, pp. 932–940.
- Gamo, T. and T. Hirabayashi (1983). “Genetic analysis of growth rate, pupation rate and some quantitative characters by diallel cross in the silkworm, *Bombyx mori* L.” In: *Japanese Journal of Breeding* 33.2, pp. 178–190.
- Greiss, H. (2003). “Genetic-selection studies on silkworm *Bombyx mori* L. under different environmental conditions”. PhD Thesis. University of Sofia, pp. 1–63.
- Grekov, D., E. Kipriotis, and P. Tzenov (2005). *Sericulture Training Manual*, p. 320.
- Hamamoto, H., K. Kamura, et al. (2005). “Effects of molecular mass and hydrophobicity on transport rates through non-specific pathways of the silkworm larva midgut”. In: *International Journal of Antimicrobial Agents* 26.1, pp. 38–42.
- Hamamoto, H., A. Tonoike, et al. (2009). “Silkworm as a model animal to evaluate drug candidate toxicity and metabolism.” In: *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP* 149.3, pp. 334–9. ISSN: 1532-0456. DOI: [10.1016/j.cbpc.2008.08.008](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.08.008).
- Hou, C. X. et al. (2013). “Marker-assisted selection in breeding silkworm strains with high silk production and resistance to the denonucleosis virus.” In: *Genetics and molecular research: GMR* 12.4, pp. 4171–4178. ISSN: 1676-5680. DOI: [10.4238/2013.October.7.3](https://doi.org/10.4238/2013.October.7.3).
- Kaito, C. and K. Sekimizu (2007). “A silkworm model of pathogenic bacterial infection.” In: *Drug discoveries & therapeutics* 1.2, pp. 89–93. ISSN: 1881-7831.

- Kato, T. et al. (2010). “Silkworm expression system as a platform technology in life science.” In: *Applied microbiology and biotechnology* 85.3, pp. 459–70. ISSN: 1432-0614. DOI: [10.1007/s00253-009-2267-2](https://doi.org/10.1007/s00253-009-2267-2).
- Manjula, S. et al. (2010). “Studies on the changes in the activities of digestive enzymes in the midgut of silkworm *Bombyx mori* (L.). (Lepidoptera: Bombycidae) fed with mulberry leaves supplemented with Indian bean (*Dolichos lablab*)”. In: *International Journal of Biological & Medical Research* 1.4, pp. 168–171.
- Moon, J. Y. and G. Y. Seol (1983). “Varietal difference in amylase activity of larval digestive fluid of the silkworm *Bombyx mori*, reared on artificial diet”. In: *The sericultural journal of Korea* 24.2, pp. 73–80.
- Paul, D. C. C., G. Subba Rao, and D. C. C. Deb (1992). “Impact of dietary moisture on nutritional indices and growth of *Bombyx mori* and concomitant larval duration”. In: *Journal of insect physiology* 38.3, pp. 229–235. ISSN: 00221910. DOI: [10.1016/0022-1910\(92\)90071-K](https://doi.org/10.1016/0022-1910(92)90071-K).
- Rahmathulla, V. K. and H. M. Suresh (2008). “Feed consumption and conversion efficiency in male and female bivoltine silkworms (*Bombyx mori* L.)—a comparative study”. In: *Journal of the Entomological Research Society* 10.1, pp. 59–65.
- Ramesha, C., C. M. Anuradha, et al. (2010). “Nutrigenetic traits analysis for identification of nutritionally efficient silkworm germplasm breeds”. In: *Biotechnology* 9.2, pp. 131–140.
- Ramesha, C., H. Lakshmi, et al. (2012). “Nutrigenetic screening strains of the mulberry silkworm, *Bombyx mori*, for nutritional efficiency”. In: *Journal of insect science* 12.15, pp. 1–17.
- Sakaguchi, B. (1978). “Morphology”. English. In: *The silkworm: an important laboratory tool*. Ed. by Y. Tazima. Kodansha Ltd, Japan, pp. 32–39.
- Scriber, J. M. and R. C. Lederhouse (1983). “Temperature as a factor in the development and feeding ecology of tiger swallowtail caterpillars, *Papilio glaucus* (Lepidoptera)”. In: *Oikos* 40, pp. 95–102.
- Scriber, J. M. and F. Slansky Jr. (1981). “The nutritional ecology of immature insects”. In: *Annual review of entomology* 26.1, pp. 183–211. ISSN: 0066-4170. DOI: [10.1146/annurev.en.26.010181.001151](https://doi.org/10.1146/annurev.en.26.010181.001151).
- Seidavi, A. (2009). “Determination and comparison of nutritional indices in commercial silkworm hybrids during various instars”. In: *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 4.3, pp. 104–113.
- Singh, T., P. K. Singh, and K. A. Sahaf (2012). “The Heterosis Phenomenon in Mulberry Silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae)”. In: *Annals of Biological Research* 3.9, pp. 4330–4336.
- Sumida, M. and H. Ueda (2007). “Dietary sucrose suppresses midgut sucrase activity in germfree, fifth instar larvae of the silkworm, *Bombyx mori*”. In: *Journal of Insect Biotechnology and Sericology* 37, pp. 31–37.
- Tatemastu, K., H. Sezutsu, and T. Tamura (2012). “Utilization of Transgenic Silkworms for Recombinant Protein Production”. In: *Biotechnology & Biomaterials*, pp. 4–11. DOI: [10.4172/2155-952X.S9-004](https://doi.org/10.4172/2155-952X.S9-004).

- Waldbauer, G. P. (1968). “The consumption and utilization of food by insects”. In: *Advances in insect physiology* 5, pp. 229–288. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2806\(08\)60230-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2806(08)60230-1).
- Zhan, S. et al. (2009). “An integrated genetic linkage map for silkworms with three parental combinations and its application to the mapping of single genes and QTL.” In: *BMC genomics* 10, p. 389. ISSN: 1471-2164. DOI: [10.1186/1471-2164-10-389](https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-389).

La conservazione delle uova polivoltine in *Bombyx mori*

Preambolo alla sperimentazione

COME già evidenziato nell'introduzione generale, il numero di generazioni di baco da seta, allevabili per anno, è - in parte - geneticamente determinato. Il corredo genetico di ogni individuo, interagisce con i fattori ambientali in grado di incidere sulla schiusa delle uova determinando quindi, in ultima istanza, il voltinismo nelle razze bivoltine. Al contrario, le razze di origine tropicale, aventi un habitus tipicamente polivoltino non si scostano in maniera naturale da questo tipo di riproduzione ciclica continua e richiedono, perciò, un costante impegno lavorativo, dovuto alla necessità di allevare le larve lungo tutto l'arco dell'anno per il loro mantenimento. Per contro, la disponibilità di uova pressoché sempre pronte alla schiusa, consente di disporre in continuo di larve; non si presenta quindi, la necessità di dover esporre le uova al trattamento con calore ed acido cloridrico per ottenere la schiusa estemporanea delle razze diapausanti.

Sfruttando la presenza di una razza polivoltina all'interno della banca di germoplasma del CRA-API, si è pensato di fare alcuni esperimenti preparatori, in vista della raccolta dati prevista per il calcolo degli indici alimentari riportati nel capitolo precedente. L'idea è nata per evitare eventuali errori non rimediabili durante l'applicazione del metodo gravimetrico, tali da rendere inutili la sperimentazione ed i dati prodotti, nonostante il grande impegno di risorse comunque necessario per questo tipo di attività. La sperimentazione appena menzionata, unitamente alla necessità di migliorare la gestione temporale dei cicli e, quindi, delle risorse, necessarie per l'allevamento della razza polivoltina Nistari, ci ha indotto ad esplorare la conservabilità delle uova a bassa temperatura. In aggiunta ad esperimenti di frigo-conservazione delle uova e della vitalità degli embrioni in seguito ad essa, sono state anche fatte misurazioni sulla resistenza delle uova al freddo mediante calorimetria a scansione.

Gli esperimenti sulla vitalità degli embrioni in seguito all'esposizione degli stessi alle basse temperature, sono stati eseguiti dal sottoscritto presso il CRA-API di Padova insieme ai colleghi di laboratorio. Le misurazioni con il calorimetro a scansione sono state invece eseguite dai colleghi del CRA-ABP (CRA-ABP: Centro di ricerca per l'agrobiologia e la pedologia di Firenze).

I dati ottenuti hanno portato alla stesura di un articolo scientifico cui ha contribuito anche il sottoscritto. Il manoscritto è stato inviato alla rivista **CryoLetters** nella forma di seguito riportata ed è in fase di revisione.

3

Assessment of embryo viability in a polyvoltine strain of *Bombyx mori* L. (Lepidoptera, Bombycidae) exposed to low temperature

Pio Federico Roversi¹, Muhammed Abidalla¹, Silvia Cappelozza² and Alessio Saviane²

3.1 Abstract

The *Bombyx mori* L. germplasm consists of ca. 4000 genotypes. Strains adapted to tropical conditions are non-diapausing, while strains adapted to temperate climates undergo embryonic diapause. To assess egg resistance of the polyvoltine Nistari strain to low temperature, we exposed embryos of 13 different ages, from two hours to 192-h-old, for 3 hours to 5 °C, 0 °C, –18 °C and –30 °C. While 100% mortality was observed at –30 °C, there was a strong resistance to chilling at 5 °C and 0 °C. Twenty-four-h-old Nistari eggs showed high cold tolerance when stored for 1-3 months at 5 °C and for one month at 0 °C. Resistance of the polyvoltine eggs to 0 °C and –18 °C was remarkable and it is also interesting that most of the eggs treated in late developmental stages were able to continue their growth and attain the head or body pigmentation stage.

¹Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura - Agrobiology and Pedology Research Centre (CRA-ABP)

²Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura - Honey bee and Silkworm Research Unit (CRA-API)

Keywords: Silkworm, polyvoltine strains, embryonic development, cold hardiness, supercooling point, short and long-term preservation.

3.2 Introduction

The domesticated silkworm *Bombyx mori* L. (Lepidoptera, Bombycidae), the most common Lepidopteran species reared for commercial purposes, originated around 4600 years ago from its wild relative *B. mandarina* Moore, native to China and the Palaearctic region (Hampson, 1896; Hirobe, 1968). At present, the global silkworm germplasm consists of about 4000 genotypes; strains adapted to tropical conditions are non-diapausing, while strains adapted to temperate climates undergo embryonic diapause (Nagaraju and Goldsmith, 2002).

Egg cold hardiness of diapausing silkworm strains during winter was investigated in the 19th century to obtain good larval hatching in the subsequent spring (Bonafous, 1842; Loiseleur-Deslongchamps, 1839). At that time, silkworm eggs were not preserved in refrigerators, but had to survive winter temperatures that could drop many degrees below 0 °C. The first methodical study was performed by Verson and Quajat (1896), pioneering scientists of the Royal Sericulture Experimental Station of Padua (Italy), who tested the effects of exposure to –10 °C and –20 °C during egg diapause in monovoltine strains.

Diapausing silkworm eggs have many strategies to withstand cold winters. A half century ago, Chino (1957) showed that the glycogen content in eggs increases after oviposition; when the egg enters diapause, it is nearly all converted into polyols (glycerine and sorbitol through trehalose). More recent research on the biochemical aspects of diapause mechanisms demonstrated that a diapause hormone probably acts to regulate the initial step of the metabolic pathway leading to glycogen accumulation when the eggs are still inside the female (Denlinger, 2002; Yamashita and Yaginuma, 1991).

Cold endurance is not required by tropical polyvoltine silkworm strains because they do not face temperatures below 0 °C in their native environment. Nevertheless, some attempts to interrupt the continuous life cycle have been made to obtain better management of rearing and a more rational organization of egg production (Chuprayoon, Sopha, and Kongpun, 2002; Tzenov, Nacheva, and Lazarov, 2001).

The development of storage techniques to increase the shelf-life of non-diapausing silkworm strains is of great practical value for researchers and for mass-rearing. Because insect embryos are extremely sensitive to chilling and their susceptibility varies with the species and developmental stage (Cosi, Abidalla, and Roversi, 2010; Heacox, R. A. Leopold, and Brammer, 1985; P. Mazur, Schneider, and Mahowald, 1992; Miles and Bale, 1995; Myers et al., 1988; Roversi, Cosi, and Irdani, 2008; Strong-Gunderson and R. A. Leopold, 1989), identification of the most tolerant embryonic stages is crucial (R. D. Leopold and Rinehart, 2010). In the present study, we examined cold tolerance in embryos of the Nistari strain of *B. mori* and the supercooling

points 24 hours post-oviposition. Effects of embryo cold storage during subsequent development were also studied to highlight debilitating effects on larval and pupal stages (R. A. Leopold, 2000).

3.3 Materials and methods

Rearing of larvae/individuals of the polyvoltine Nistari strain and a diapausing strain of *B. mori* was conducted in a climatic chamber (Binder KBWF with L:D period control, Essex, England). The 5, 0 and -18 °C temperatures were achieved with a freezer-refrigerator (KW KRFDE 2711 NIA, Siena, Italy). The -30 °C temperature was achieved with a temperature test chamber (CTS GmbH, Hechingen, Germany). The effects of exposure to low temperatures on the survival of *B. mori* embryos were quantified as hatching percentage. White shells of eggs from which larvae had hatched were easily distinguished from yellow desiccated non-fertilized eggs and from pigmented eggs with dead embryos inside. Thirteen successive embryonic stages were tested, corresponding to most of the critical phases of embryonic development described by Sakaguchi (1978). Direct observations were made with a Nikon SMZ-1500 stereo-microscope equipped with a cold light source.

3.3.1 Rearing and staging of eggs

B. mori larvae were fed an artificial diet containing 40% mulberry leaves on a dry weight basis (Cappelozza et al., 2005) and reared until spinning at 25 ± 0.5 °C under an 8L:16D photo-period. Cocoon formation occurred on plastic frames. After 4-5 days of spinning, cocoons were removed and cut to separate the pupae from their silk shells. At moth emergence, which started at lightening about 10 days after spinning, male and female adults were mated for two hours. The females were then separated and put on a paper sheet in a wooden box with a perforated metallic lid where they laid their eggs. Egg batches were collected every two hours from 4 p.m. to 12 p.m.; the moths were transferred in the dark to a new paper sheet to obtain different egg batches. Egg batches still adhering to the paper sheet were incubated at 25 ± 0.5 °C, a temperature that usually allows complete development in about 10 days (Ito and Kobayashi, 1978).

3.3.2 Embryo survival after short and long cold storage

One-eight-day-old Nistari egg batches (2-192-h-old) were placed in plastic Petri dishes (60 mm \varnothing) closed with parafilm to prevent dehydration and then incubated at four temperatures: 5 ± 0.5 °C, 0 ± 0.5 °C, -18 ± 0.5 °C and -30 ± 0.5 °C. After three hours, the Petri dishes were transferred to the climatic chamber at 25 ± 1 °C, $75 \pm 5\%$ R.H. and 6L:16D). A further test was carried out by storing egg batches in sealed Petri dishes for 4-14 hours at -18 °C and then transferring them to a climatic chamber in the

previously described conditions. To investigate the resistance of the Nistari strain to longer periods of storage at low temperatures, 40-h-old egg batches were kept at 5 and 0 °C for 30, 60 and 90 days. In all tests, control eggs were continuously maintained at 25 ± 1 °C, $80 \pm 5\%$ R.H. and 8L:16D.

3.3.3 Effects of embryo cold storage on larval and pupal stages

The effects of embryo cold storage during subsequent development were also studied to highlight debilitating effects of cold storage on larval and pupal stages (R. A. Leopold, 2000). Larvae hatched from 24-h-old and 40-h-old eggs, stored at 0 ± 0.5 °C and 5 ± 0.5 °C for 30 and 90 days were reared in a climatic chamber at 25 ± 1 °C, instar dependent R.H. (Cappellozza et al., 2005) and 8L:16D until adult emergence. The survival rate was recorded for each larval stage and the pupal phase.

3.3.4 Supercooling point

The supercooling point (SCP), the last temperature recorded before release of the latent heat of fusion (Denlinger et al., 1992), was determined using a differential scanning calorimeter (DSC) (Perkin-Elmer DSC 8000) equipped with a standard liquid nitrogen cooling accessory.

The DSC was calibrated using standard procedures (Perkin-Elmer Corporation, User's Manual: 7 Series/UNIX DSC-7 Differential Scanning Calorimeter, Revision B, 1992) to an accuracy of ± 0.25 °C and ± 0.15 J g⁻¹ at a cooling/warming rate of 10 °C/min. The calibration was performed by the melting of indium (melting point, 156.60 °C; transition energy, 28.45 J g⁻¹) and the crystalline transition of heptane (-90.56 °C). The calibration was checked by the melting of double-distilled water. The eggs were mechanically removed from the adhering paper, where they were laid, to prevent any extracellular water and sealed in aluminium pans (BO14-3017). The thermogram was followed during cooling and warming between 20 °C and -50 °C at 2.5 °C/min.

The percentage of water of a single egg was calculated using the area under the latent heat of fusion curve and the transition energy of water 333.88 J g⁻¹ (Rinehart et al., 2009).

The SCP was determined with 24-h-old eggs, since this parameter reaches its lowest value about 1 day after deposition in intact non-diapausing silk-worm eggs (Suzuki, Fujita, and Miya, 1983).

3.3.5 Statistical analysis

Three different egg batches represented three replications for each test condition (*temperature * embryonic stage*). A minimum number of 20 eggs per replicate was tested. Percentages of hatched larvae were calculated for treated and control repetitions. Data were tested for normality and homoscedasticity and, if necessary, normalized by arcsine transformation.

Table 3.1: *Survival of Nistari embryos after storage at 5 °C, 0 °C and –18 °C for three hours. Data in the same column followed by different lower case letters are significantly different ($p < 0.05$). Capital letters indicate significant differences in rows. Mean values are reported with \pm Standard Error (SE). Hatching percentage for control eggs was $94.86 \pm 1.95\%$.*

Hours from oviposition	temperature			p-value
	5 °C	0 °C	–18 °C	
2	62.98 \pm 12.90 ^{a, A}	73.29 \pm 6.93 ^{a, A}	0.61 \pm 0.58 ^{b, B}	0.000
12	96.91 \pm 4.57 ^{a, B}	92.19 \pm 5.82 ^{a, AB}	54.15 \pm 5.82 ^{a, AB}	0.002
24	95.69 \pm 3.20 ^{a, B}	94.12 \pm 2.42 ^{a, B}	94.66 \pm 2.58 ^{a, C}	0.719
34	100.00 \pm 0.00 ^{a, B}	94.08 \pm 6.28 ^{a, B}	91.23 \pm 15.19 ^{a, C}	0.447
40	97.36 \pm 0.61 ^{a, B}	95.42 \pm 1.18 ^{a, B}	95.50 \pm 1.16 ^{a, C}	0.071
48	92.31 \pm 2.66 ^{a, B}	89.50 \pm 3.40 ^{a, AB}	89.85 \pm 3.84 ^{a, C}	0.482
60	98.41 \pm 2.75 ^{a, B}	94.27 \pm 6.86 ^{a, B}	92.47 \pm 13.04 ^{a, C}	0.564
72	95.70 \pm 3.01 ^{a, B}	89.89 \pm 3.70 ^{a, AB}	95.96 \pm 1.93 ^{a, C}	0.105
96	96.64 \pm 0.10 ^{a, B}	94.70 \pm 2.70 ^{a, B}	95.28 \pm 3.40 ^{a, C}	0.689
120	96.93 \pm 0.52 ^{a, B}	93.93 \pm 3.55 ^{a, AB}	89.95 \pm 7.39 ^{a, C}	0.244
144	94.81 \pm 2.75 ^{a, B}	94.87 \pm 8.88 ^{a, B}	0.00 \pm 0.00 ^{b, A}	0.000
168	94.98 \pm 2.45 ^{a, B}	84.75 \pm 13.05 ^{a, AB}	0.00 \pm 0.00 ^{b, A}	0.000
192	94.85 \pm 0.79 ^{a, B}	97.11 \pm 1.13 ^{a, B}	0.00 \pm 0.00 ^{b, AB}	0.000

Effects of temperatures and developmental stages were analysed by two-way ANOVA and differences among means were evaluated by the Tukey post-hoc test. $P < 0.05$ was accepted as statistically significant. The data were analysed with SPSS 10.0 software (1999).

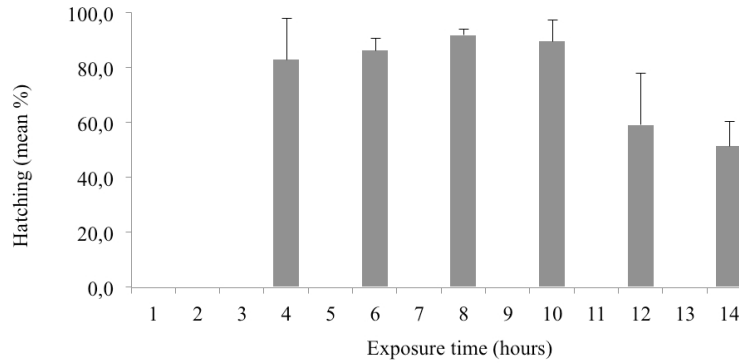
3.3.6 Results

Embryo survival after short storage

The mean hatching percentage of control eggs exposed to 25 °C was $94.86 \pm 1.95\%$. Two-way ANOVA revealed significant effects of different temperatures ($F_{2,78} = 779.42$; $p < 0.05$) and developmental stages ($F_{12,78} = 152.29$; $p < 0.05$); the interaction temperature-developmental stage was also significant ($F_{24,78} = 116.52$; $P < 0.05$).

Exposure to –30 °C for three hours resulted in 100% mortality at all stages of embryogenesis. In contrast, high individual survival was observed for eggs cooled at 5 °C and 0 °C, with significantly lower hatching only for 2-h-old eggs, with survival rates of $62.98 \pm 7.45\%$ and $73.29\% \pm 4.00\%$ respectively (Table 3.1). When embryos were stored at –18 °C, high survival was obtained for 12-120-h-old eggs, with a maximum value of $95.96 \pm 1.93\%$. 2-h-old Nistari embryos were very sensitive to –18 °C and 100% mortality was recorded from the stage when external characters become clearly visible (144-h-old). At –18 °C, there was also a fall of around 50% of hatching for 12-h-old embryos, corresponding to formation of the syncytial blastoderm. The highest hatching percentages for silkworm embryos exposed to –18 °C were observed in the 40-h-old and 72-h-old eggs, with very low variability of

Figure 3.1: Survival of 40-h-old *Nistari* embryos stored at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 4–15 hours. Vertical bars indicate \pm SE.



the data in both cases. The 34-h-old embryos stored at $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ had the highest overall survival of all groups tested.

The mechanism of death was different at the beginning or at the end of development; eggs dead at the 2nd hour of development did not show pigmentation and became desiccated as incubation proceeded; eggs undergoing late exposure to $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ continued their development until the “blue egg” stage (just before hatching, when embryos can be seen through the shells of the eggs) but were unable to hatch. After exposure to $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ for more than 3 hours, the proportion of 40-h-old *Nistari* eggs (before differentiation of the appendages in the abdominal region) that regularly hatched was over 50%, even when the egg batches were left in the freezer-refrigerator for 14 hours (Figure 3.1). There was no significant effect of storage time on the percentage of embryos that regularly completed development until hatching of the larvae ($F_{5,12} = 2.325$; $p = 0.107$).

3.3.7 Embryo survival after long storage

Effects of long-term storage (30, 60 and 90 days) for 24-h-old and 40-h-old embryos are shown in Figures 3.2 and 3.3. Storage at $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ had a significant effect on egg hatching ($F_{2,17} = 16.535$, $P < 0.05$) compared with the control, but there was no significant difference between embryos stored for one month and those stored for 3 months (Figure 3.2). At $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, there was a significant decrease of egg hatching ($F_{2,17} = 54.479$, $P < 0.05$) after one month of storage, while after 3 months no eggs hatched in both the 24-h-old and 40-h-old embryos (Figure 3.2).

Effects of embryo cold storage on larval and pupal stages

The control larvae showed no significant differences in survival of the different instars ($F_{4,10} = 1.165$; $P = 0.382$), and at the end of the test there was regular emergence of over 80% of adults. The larvae from 24-h-old *Nistari* embryos exposed for 30 days to $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ showed high survival levels in all instars and pupal development up to adult emergence; as seen in Figure 4, over 75% of the larvae regularly completed post-embryonic development and gave rise to adults, without significant differences for any of the developmental instars ($F_{4,10} = 2.394$; $P = 0.120$). In contrast, storage of eggs for 90 days

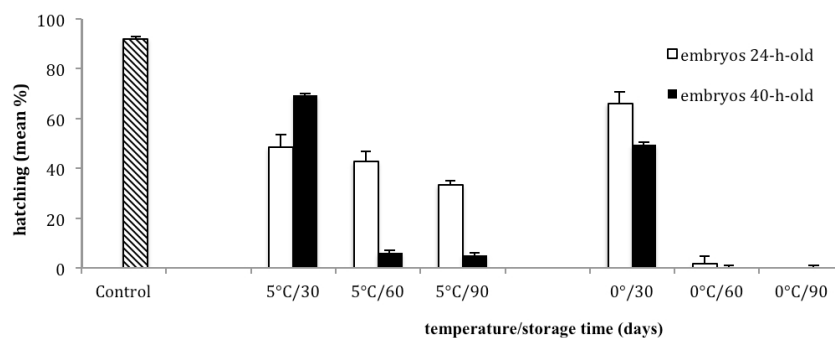


Figure 3.2: Survival of 24-h-old and 40-h-old *Nistari* embryos stored at 5 °C and 0 °C for 30, 60 and 90 days. Vertical bars indicate \pm SE.

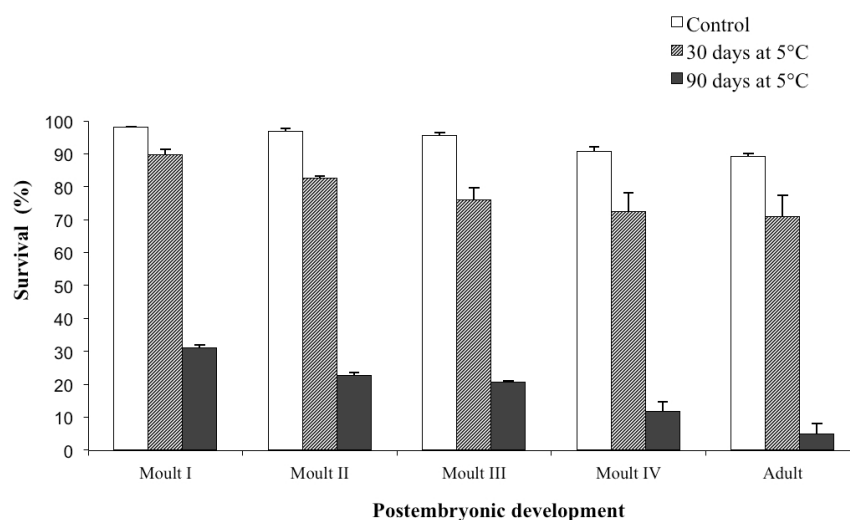


Figure 3.3: Survival percentage during larval development until adult emergence of 24-h-old embryos hatched after different storage periods (0, 30 and 90 days) at 5 °C. Vertical error bars indicate \pm SE.

at 5 °C led to a dramatic increase of mortality in the first larval instar, in which only a little over 30% of individuals completed the first moult (Fig. 3.3) ($F_{4,10} = 3.835$; $P = 0.039$). The mortality recorded in the subsequent stages was lower than in the first instar larvae but still led to less than 5% emergence of *Nistari* adults.

3.3.8 Discussion

As shown for various insects, including Lepidoptera, identification of the embryonic stages to be used for storage is a key aspect for the development of protocols of both short- and long-term germplasm conservation (Collins and Peter Mazur, 2006; Roversi, Cosi, and Irdani, 2008). The results of the present study are consistent with findings for other insects (R. A. Leopold, 2000; P. Mazur, Schneider, and Mahowald, 1992; Miles and Bale, 1995). They indicate that very young embryos of the *Nistari* strain are very sensitive to low temperatures. The 2nd hour after laying is a critical point with regard

3.3. MATERIALS AND METHODS

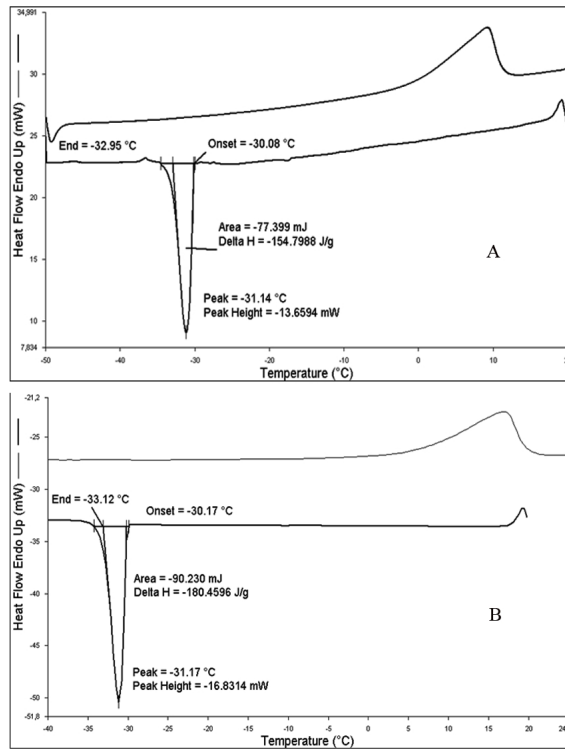


Figure 3.4: Supercooling point of 24-h-old polyvoltine *Nistari* (A) and diapausing (B) *B. mori* eggs. Scanning rate 2.5 °C/min. (6 replicates).

to cold hardiness. The sperm enters the egg through the micropyle just before oviposition, but mixis takes place about two hours after oviposition with fusion of the pronuclei and immediate initiation of mitosis, which is repeated about 10 times in the first 10 hours after oviposition (Ohtsuki and Murakami, 1968).

The mortality of both 2-h-old and 12-h-old eggs exposed to low temperatures for 3 hours became significantly lower as progressively lower temperatures were used, with a minimum survival rate of less than 1% for 2-h-old eggs exposed to -18 °C. However, the resistance of eggs of the polyvoltine strain after short storage at 0 °C and -18 °C was remarkable and for most of the embryonic stages tested was comparable to that of control eggs kept at 25 °C. Indeed, the hatching rates of eggs exposed to -18 °C for periods between 4 and 14 hours are quite surprising for a polyvoltine *B. mori* strain adapted to a warm environment.

At least until 24 hours after oviposition, the silkworm embryo developmental rate is quite similar in diapausing and non-diapausing eggs, and differences are detectable only in yolk granule distribution, which shows a remarkable change before the formation of yolk cells (Takesue, Keino, and Endo, 1976). At around 30-40 hours, however, the eggs of monovoltine strains enter pre-diapause and the metabolic pathway differs from that of polyvoltine eggs because of the need to survive low winter temperatures. Hence, the fact that the supercooling points were almost identical in the 24-h-old *Nistari* and diapausing eggs is not surprising. The resistance shown by the embryos of the polyvoltine strain, enduring long periods at 5 °C with regular hatching of about 40% of the larvae after 90 days of storage, is of practical importance. Also important in this regard are the findings

regarding possible delayed debilitating effects of prolonged exposure of the embryos to low temperatures: storage of the 24-h-old Nistari embryos for 30 days resulted in the regular development of a percentage of larvae not significantly different from that of the controls not exposed to a period of cooling. The resistance of the Nistari eggs to 5 °C is not surprising; in fact, when the expected date of hatching must be postponed, experienced silkworm rearers cold-store the eggs at 5 °C (Narasimhanna, 1988). The best period for storage is generally considered to be 2–3 days after oviposition and before the reversal stage. After blastokinesis, cold preservation is not recommended until the “blue egg” stage, which is indicated as another cold-resistant stage. Chaturvedi and Upadhyay (1990) found that the hatchability of eggs at various embryonic stages from 48 hours after oviposition gradually decreased when cold-stored for more than five days.

It is interesting that the polyvoltine eggs treated at late developmental stages were generally able to continue growing until the head or body pigmentation stage, and their death occurred only after completion of these embryonic steps. Thus, even though the mechanisms involved in rapid cold hardening are still partly unknown (Bale, 2002), the negative effects at the later stages of embryogenesis seem to be induced by weakening of the embryos rather than specific freezing damage to their tissues and organs. Therefore, data on cold tolerance based on egg hatchability might not be sufficient for a precise understanding of the phenomenon, and further research on embryonic development under temperature stress should be conducted.

3.4 Acknowledgements

This study was supported by a grant from the Italian Ministry of Agricultural and Forestry Policy (MIPAAF), National Research Project “PREVENTO”. The authors are grateful to INRA, France for the *B. mori* Nistari polyvoltine strain, which was received through the Deposit Agreement (2009), and to J. de Silva CRA-ABP Florence for statistical assistance.

References of chapter 3

- Bale, J. S. (2002). "Insects and low temperatures: from molecular biology to distributions and abundance." In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 357.1423, pp. 849–862. ISSN: 0962-8436. DOI: [10.1098/rstb.2002.1074](https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1074).
- Bonafous, M. (1842). *Trattato e scritti varii, intorno all'educazione dei bachi da seta ed alla coltavazione dei gelsi*. G. Sivestri, pp. 849–862.
- Cappelozza, L. et al. (2005). "Artificial diet rearing system for the silkworm *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae): effect of vitamin C deprivation on larval growth and cocoon production". In: *Applied Entomology and Zoology* 40.3, pp. 405–412. ISSN: 0003-6862. DOI: [10.1303/aez.2005.405](https://doi.org/10.1303/aez.2005.405).
- Chaturvedi, M. L. and V. B. Upadhyay (1990). "Effect of cold storage on the hatchability of silkworm (*Bombyx mori*) eggs." English. In: *Journal of Advanced Zoology* 11.1, pp. 63–65. ISSN: 0253-7214.
- Chino, H. (1957). "Conversion of Glycogen to Sorbitol and Glycerol in the Diapause Egg of the *Bombyx* Silkworm". In: *Nature* 180.4586, pp. 606–607. ISSN: 0028-0836. DOI: [10.1038/180606b0](https://doi.org/10.1038/180606b0).
- Chuprayoon, S., S. Sopha, and N. Kongpun (2002). "Influence of low temperature egg preservation at early development stages on hatching ability of multivoltine silkworm, *Bombyx mori* L." In: *Proceedings XIX International Congress of the International Sericultural Commission*. Bangkok (Thailand), pp. 143–147.
- Collins, Anita M. and Peter Mazur (2006). "Chill sensitivity of honey bee, *Apis mellifera*, embryos". In: *Cryobiology* 53.1, pp. 22–27.
- Cosi, E., M. T. Abidalla, and P. F. Roversi (2010). "The effect of Tween 80 on eggshell permeabilization in *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera, Pyralidae)." In: *Cryo letters* 31.4, pp. 291–300. ISSN: 0143-2044.
- Denlinger, D. L. (2002). "Regulation of diapause". In: *Annual review of entomology* 47, pp. 93–122.
- Denlinger, D. L. et al. (1992). "Role of chilling in the acquisition of cold tolerance and the capacitation to express stress proteins in diapausing pharate larvae of the gypsy moth, *Lymantria dispar*". In: *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 21.4, pp. 271–280. ISSN: 0739-4462. DOI: [10.1002/arch.940210404](https://doi.org/10.1002/arch.940210404).
- Hampson, G. F. (1896). *Moths*. Vol. 4. Blanford, Taylor & Francis, p. 546.
- Heacox, A. E., R. A. Leopold, and J. D. Brammer (1985). "Survival of house fly embryos cooled in the presence of dimethyl sulfoxide". In: *CryoLetters* 6, pp. 305–312.
- Hirobe, T. (1968). "Characterization of silkworm races". In: *International Congress of Genetics*. Tokyo, pp. 25–36.
- Ito, T. and M. Kobayashi (1978). "Rearing of the Silkworm". In: *The silkworm: an important laboratory tool*. Ed. by Y. Tazima. Kodansha Ltd, Japan, pp. 83–102.
- Leopold, R. A. (2000). "Short-Term Cold Storage of House Fly (Diptera: Muscidae) Embryos: Survival and Quality of Subsequent Stages". In: *Annals of the Entomological Society of America* 93.4, pp. 884–889. ISSN:

00138746. DOI: [10.1603/0013-8746\(2000\)093\[0884:STCSOH\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2000)093[0884:STCSOH]2.0.CO;2).
- Leopold, R. D. and J. P. Rinehart (2010). “A template for insect Cryopreservation”. In: *Low Temperature Biology of Insects*. Ed. by D. L. Denlinger and E. Lee Jr. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 325–341. ISBN: 9780511675997. DOI: [10.1017/CB09780511675997](https://doi.org/10.1017/CB09780511675997).
- Loiseleur-Deslongchamps, J. (1839). *Nouvelles Considérations Sur Les Vers À Soie: Pour Servir À L'histoire Des Insectes...* Nabu Press, p. 232. ISBN: 1271816016.
- Mazur, P., U. Schneider, and A. P. Mahowald (1992). “Characteristics and kinetics of subzero chilling injury in *Drosophila* embryos”. In: *Cryobiology* 29.1, pp. 39–68.
- Miles, J. E. and J. S. Bale (1995). “Analysis of Chilling Injury in the Biological Control Agent *Aphidoletes aphidimyza*”. In: *Cryobiology* 32.5, pp. 436–443.
- Myers, S. P. et al. (1988). “Low-temperature sensitivity of *Drosophila melanogaster* embryos”. In: *Cryobiology* 25.6, pp. 544–545.
- Nagaraju, J. and M. R. Goldsmith (2002). “Silkworm genomics-progress and prospects”. In: *Current Science* 83.4, pp. 415–425.
- Narasimhanna, M. N. (1988). “Stock maintenance”. In: *Manual on Silkworm Egg Production*. Central Silk Board, pp. 16–21.
- Ohtsuki, Y. and A. Murakami (1968). “Nuclear division in the early embryonic development of the silkworm, *Bombyx mori* L.” In: *Zoological Magazine* 77, pp. 383–387.
- Rinehart, J. P. et al. (2009). “Supercooling point plasticity during cold storage in the freeze-tolerant sugarbeet root maggot *Tetanops myopaeformis*”. In: *Physiological Entomology* 34.3, pp. 224–230. ISSN: 03076962. DOI: [10.1111/j.1365-3032.2009.00678.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2009.00678.x).
- Roversi, P. F., E. Cosi, and T. Irdani (2008). “Chill sensitivity and cryopreservation of eggs of the greater wax moth *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae)”. In: *Cryobiology* 56.1, pp. 1–7.
- Sakaguchi, B. (1978). “Gametogenesis, fertilization and embryogenesis of the silkworm”. In: *The silkworm: an important laboratory tool*. Ed. by Y. Tazima. Kodansha Ltd, Japan, p. 16.
- Strong-Gunderson, J. M. and R. A. Leopold (1989). “Cryobiology of *Musca domestica*: Supercooling Capacity and Low-Temperature Tolerance”. In: *Environmental Entomology* 18.5, pp. 756–762.
- Suzuki, K., M. Fujita, and K. Miya (1983). “Changes in supercooling point of silkworm eggs”. English. In: *Journal of Sericultural Science of Japan* 52.3, pp. 185–190. ISSN: 0037-2455.
- Takesue, S., H. Keino, and K. Endo (1976). “Studies on the yolk granules of the silkworm, *Bombyx mori* L.: The morphology of diapause and non-diapause eggs during early developmental stages”. In: *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology* 180.2, pp. 93–105. ISSN: 0340-0794. DOI: [10.1007/BF00848100](https://doi.org/10.1007/BF00848100).
- Tzenov, P., Y. Nacheva, and Y. Lazarov (2001). “Study on the Preservation Terms of Nondiapausing Silkworm (*Bombyx mori* L.) Eggs at Low Tem-

perature”. In: *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 7.4-5, pp. 467–470.

Verson, E. and E. Quajat (1896). *Il filugello e l'arte sericola: trattato teorico-pratico*. Fratelli Drucker.

Yamashita, O. and T. Yaginuma (1991). “Silkworm Eggs at Low Temperatures: Implications for Sericulture”. In: *Insects at Low Temperature*. Ed. by Richard E. Lee and David L. Denlinger. Boston, MA: Springer US, pp. 424–445. ISBN: 978-1-4757-0192-0. DOI: [10.1007/978-1-4757-0190-6](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0190-6).

Enterococcus mundtii: un nuovo patogeno per *Bombyx mori*

Preambolo alla sperimentazione

DURANTE gli esperimenti finalizzati alla selezione di individui caratterizzati da una migliorata efficienza nutrizionale, le razze prescelte per l'esperimento venivano allevate in due modalità. Un primo step, durante la stagione calda, prevedeva l'allevamento delle larve su foglia, con alimentazione sovrabbondante e la selezione di individui ad alte performance produttive da usare per il re-incrocio. Durante la stagione fredda, non essendo disponibile la foglia di gelso, l'allevamento è stato eseguito su dieta artificiale, alimentando i vari lotti in maniera contingentata e poi selezionando nuovamente gli individui più performanti da usare per generare una nuova sub-popolazione. In quest'ultimo step, la maggior stringenza rappresentata dall'alimentazione contingentata, ha permesso di isolare gli individui in grado di mantenere elevati livelli di sintesi proteica pur con un'assunzione di cibo limitata.

Mentre l'allevamento su foglia non ha presentato problemi particolari poiché le metodiche per tale pratica sono ben standardizzate, l'alimentazione su dieta di ampi quantitativi di larve, necessari per avere una base sufficiente per procedere in maniera efficace nella selezione, ha invece evidenziato la maggiore fragilità delle larve allevate su dieta artificiale. Come è stato sottolineato già nell'introduzione generale, quando alimentate su substrati sostitutivi, le larve hanno profili d'espressione genica diversi e mancano di una proteina dalla dimostrata funzionalità immunitaria come la Red Fluorescent Protein che, derivando dalla clorofilla del gelso, non può essere più presente nella dieta artificiale in cui il trattamento termico della foglia, degrada parte dei pigmenti naturali.

Questo, insieme alla condizione di stress collegata all'alta densità, ha fatto sì che nelle nostre condizioni sperimentali si manifestasse una nuova patologia con sintomi, invece, assimilabili ad altre condizioni allevatorie. Per individuare l'agente eziologico, in modo da poter prendere le opportune contromisure e poter procedere con la sperimentazione allora in atto, si sono fatti una serie di esperimenti appositamente pianificati. A sperimentazione conclusa, i dati ottenuti, relativi all'isolamento di un nuovo patogeno per il

baco da seta allevato su dieta artificiale, sono stati pubblicati nella rivista **Journal of Invertebrate Pathology**.

Il sottoscritto ha eseguito buona parte degli esperimenti sul materiale vivo e di inoculo e re-inoculo delle larve condotti presso il CRA-API ed ha inoltre contribuito alla revisione del materiale prima dell'invio alla rivista. A seguire la versione definitiva dell'articolo.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Invertebrate Pathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jip

Identification of *Enterococcus mundtii* as a pathogenic agent involved in the “flacherie” disease in *Bombyx mori* L. larvae reared on artificial diet

Silvia Cappellozza^{a,*}, Alessio Saviane^{a,1}, Gianluca Tettamanti^{b,2}, Marta Squadrin^{c,3}, Elena Vendramin^{c,3}, Paolo Paolucci^{d,4}, Eleonora Franzetti^{b,2}, Andrea Squartini^{c,3}

^a CRA – Apiculture and Sericulture Research Unit, Padua seat, via Eulero, 6a, 35143 Padova, Italy

^b Department of Biotechnology and Molecular Sciences, University of Insubria, via J.H. Dunant, 3, 21100 Varese, Italy

^c Department of Agricultural Biotechnologies, University of Padova, via Romea, 16, 35020 Legnaro (Padova), Italy

^d Department of Environmental Agronomy and Crop Production, University of Padua, viale dell'Università, 16, 35020 Legnaro (Padova), Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 September 2010

Accepted 9 December 2010

Available online 15 December 2010

Keywords:

Acridine

ARDRA

Artificial diet

Bacterial disease

Bombyx mori

Chloramphenicol

DAPI

Enterococcus mundtii

Germfree rearing

Mulberry silkworm

Pyronin

TEM

ABSTRACT

Enterococcus mundtii was shown to be directly correlated with flacherie disease of the silkworm larvae reared on artificial diet supplemented with chloramphenicol. Its identification was carried out by means of light and electron microscopy and nucleotide sequencing of 16S gene. The bacterium is capable of rapidly multiplying in the silkworm gut and of invading other body tissues, as demonstrated by deliberate infection of germfree larvae and by subsequent TEM observations. *E. mundtii* can endure alkaline pH of the silkworm gut and it has been proved to adapt *in vitro* to commonly applied doses of chloramphenicol, whose use can further contribute to reduce competition by other bacteria in *Bombyx mori* alimentary canal.

The modality of transmission of the infection to the larvae was among the objectives of the present research. Since contamination of the progeny by mother moths can be avoided through routine egg shell disinfection, a trans-ovarian vertical transmission can be ruled out. On the other hand the bacterium was for the first time identified on mulberry leaves, and therefore artificial diet based on leaf powder could be a source of infection. We showed that while microwaved diet could contain live *E. mundtii* cells, the autoclaved diet is safe in this respect. Being *E. mundtii* also part of the human-associated microbiota, and since *B. mori* is totally domestic species, a possible role of man in its epidemiology can be postulated.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Rapid advances in biotechnology and realization of transgenic silkworms to create new materials for pharmaceutical or bio-medical applications have highlighted the importance of artificial diets for silkworm larvae. Traditional rearing on mulberry leaves is largely dependent on natural environmental conditions and demanding extensive workers' labor, it does not warrant efficient and predictable production.

In mass-rearing of silkworms on artificial diet, diseases from bacterial infections are frequent causes of total loss of cocoon harvest.

Two major strategies have been developed so far; the first involves rearing under germfree conditions, and the second, supplementation of artificial diet with antibiotics. For the latter, one of the most used antibiotics which can be added to artificial diet is chloramphenicol; the chemical has qualities of a good candidate as an additive for the diet: (1) it is not inactivated in the silkworm gut, despite very alkaline pH of the digestive fluid; (2) it is able to stand high temperatures during autoclave sterilization; (3) it is active on wide groups of bacteria (Gram positive and Gram negative) (Kodama, 2001). For these reasons, it has been used for many years in sericulture, both in rearings on the leaves and on the diet to counteract epidemic outbreaks.

The CRA – Unit of Research of Apiculture and Sericulture, Padua, Italy (CRA-API) is one of the most important silkworm germplasm banks in Europe, comprising around 200 *Bombyx mori* strains. Every year part of rearing for strain reproduction is performed with locally-produced artificial diet (CRA-API's patent) (Cappellozza et al., 2005). Furthermore, CRA-API supplies artificial diet to many European laboratories dealing with the silkworm as experimental tool. After repeated encountering of flabby larvae in artificial diet rearing, using CRA-API's diet containing chloramphenicol, which

* Corresponding author. Tel.: +39 049 620205; fax: +39 049 623119.

E-mail addresses: silvia.cappellozza@entecra.it (S. Cappellozza), gianluca.tettamanti@uninsubria.it (G. Tettamanti), paolo.paolucci@unipd.it (P. Paolucci), squart@unipd.it (A. Squartini).

¹ Tel.: +39 049 620205; fax: +39 049 623119.

² Tel.: +39 0332 421312; fax: +39 0332 421300.

³ Tel.: +39 049 8272923; fax: +39 049 8272929.

⁴ Tel.: +39 049 827 2809; fax: +39 049 827 2839.

occurred both in Padua and in other European labs, we focused our efforts on isolation of possible etiological agent for the so-called “flacherie” disease. Larvae showing symptoms of retarded growth, cessation of feeding, flaccidity, loss of body lustre, sluggishness and dysentery can be affected by bacteria or viruses (Aizawa et al., 1964; Tanada and Kaya, 1993; Lysenko, 1958) or even by two microbial agents (Manimegalai, 2009; Deseő Kovács and Rovesti, 1992).

The research in the current paper aimed at identifying unambiguously the cause of the pathology and its epidemiological boundary conditions to establish sound remedies.

2. Material and methods

2.1. . Experimental animals

Polyhybrid larvae (126 × 57) (70 × 79) produced at CRA-API were used. Eggs were surface sterilized following the method of Matsubara et al. (1988) for germfree rearing. Larvae were fed from egg hatching on artificial diet or mulberry leaves, *Morus alba*, cultivated varieties Florio and Morettiana. Larvae were sacrificed for gut analysis between 72 and 120 h from the beginning of the last instar. Before sacrificing larvae, a disinfection test on the surface of larval body was carried out: larvae were anaesthetized with ethyl acetate, dipped in 95% ethanol for 10 s, then in 5% sodium hypochlorite for 1 min and rinsed four times in distilled water.

2.2. . Artificial diet

Composition of artificial diet is described in Cappellozza et al. (2005) and chloramphenicol (Sigma–Aldrich) was added before autoclaving (117 °C for 40 min) or microwave cooking (10 min at 850 W) at the dosage of 0.1 µg/g. Diet was prepared in a thin layer of around 2.5 cm of thickness, in a plastic container covered with a plastic wrap.

2.3. . Bacteria isolation from silkworm gut

Extraction was carried out from 5th instar healthy and diseased larvae reared under non-germfree conditions, from 5th instar healthy and purposely infected larvae reared under germfree conditions (Sumida and Ueda, 2007), and from 5th instar larvae reared on mulberry leaves. For extraction from the intestine, larvae were placed on a polystyrene layer, and fixed at both ends with two pins. The support and cutting instruments were previously disinfected by immersion in 95% ethanol. The larvae were cut with scissors making a cut along the back and pulling with tweezers the digestive tract that was shredded and deposited in an eppendorf tube containing 200 µl of sterile saline solution. For each sample serial dilutions of up to 10⁻⁶ were made, and for each dilution two plates of Plate Count Agar (PCA Difco) were seeded by plating 40 µl of suspension. Plates were sealed with parafilm and incubated at 22 °C.

2.4. . Fluorescence microscopy analysis of bacterial isolates

Aliquots of 20 µl of suspensions from gut isolation obtained as described above were placed on glass slides. Slides were fixed on the flame, and stained with 0.1% acridine orange in deionized water for 1 min, rinsed four times with distilled water and air dried. The slides were observed with epifluorescence Olympus microscope with a 100× objective and images were acquired with Olympus Camedia digital camera.

2.5. . Bacterial species identification with molecular methods

To characterize isolated bacteria taxonomically, cell lysis and DNA amplification were performed. Single colonies were picked from plates and resuspended in 50 µl of lysis solution (0.25% sodium dodecylsulphate and 0.05 M NaOH) in a 0.5 ml eppendorf tube. Tubes were vortexed for 1 min, heated at 94 °C for 20 min. Samples were centrifuged for 10 min at 13,200g and 10 µl of supernatant were withdrawn and added to 90 µl sterile water. For 16S rDNA PCR amplification the following reagents were used per reaction: 1 µl of lysate template, 12.3 µl of milliQ sterile water, 2.5 µl 10× buffer; 4 µl of dNTPs at a concentration of 1.25 mM each, 2.5 µl of primer 63F (Marchesi et al., 1998) and 2.5 µl of primer 1389R (Osborn et al., 2000) both at a concentration 2.5 µM; 0.2 µl of Taq enzyme at a concentration of 5 units/µl.

PCR was achieved in I-Cycler BioRad thermal cycler, set with the following program: DNA denaturation at 94 °C for 2 min; annealing at 54 °C for 30 s; extension at 72 °C for 2 min and 30 s, repeated 35 cycles, and a final extension at 72 °C for 5 min. Amplicon DNA was checked by 1% agarose gel electrophoresis and photographed with Kodak digital apparatus EDAS290. The same method applied to the colonies was also used for lysis and amplification directly from suspension-dilutions of the intestinal suspensions from *B. mori* or from artificial diet.

An ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) was used to pre-screen taxonomically the amplicons digesting a 5 µl aliquot of amplified DNA with the *HinfI* enzyme at 37 °C for 2 h. The cut DNA fragments were separated by 1.5% agarose gel. Dideoxynucleotide sequencing of 16S rDNA amplicons was carried out in ABI Prism (Applied Biosystems) automatic sequencer using separately the forward or reverse of the above primers. Chromatograms were subjected to BLAST analysis using the online platform NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.6. Histochemistry

Midgut of diseased larvae underwent a specific histochemical staining for flacherie virus (Veda et al., 1997). Ten larvae at the fifth day of the 5th instar were analyzed. Anesthetized larvae were cut dorsally, and the midgut was dissected and cut in small pieces. For whole mount staining, specimens were incubated with the following solution: 0.6% pyronin Y, 0.3% methyl green, 20% chloroform (v/v) in phosphate buffer solution (0.05 M, pH 4.0). Although in preliminary tests different times of incubations with the staining solution were evaluated (15–90 min), no difference was seen among the processed samples, therefore 60 min-incubation time was chosen for subsequent experiments. Samples were mounted in Citifluor, covered with a coverslip, and examined with an Olympus BH2 microscope. Images were acquired with a Nikon DS-5M-L1 digital camera system.

2.7. DAPI staining

Midgut samples were obtained as described in Section 2.6, immediately embedded in poly-freeze cryostat embedding medium (Polyscience), and stored in liquid nitrogen until use. Cryosections (8 µm thick) were rinsed with PBS for 5 min and subsequently incubated for 20 min with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 100 ng/ml) to detect DNA. Coverslips were mounted with Citifluor, and slides were examined with an Olympus BH2 microscope.

2.8. Light microscopy and transmission electron microscopy (TEM)

Larval midgut. Midguts of ten diseased larvae were processed for TEM analysis according to Tettamanti et al. (2007). Briefly, after

dissection of larvae, excised midguts were fixed in 4% glutaraldehyde overnight at +4 °C. Specimens were postfixed in 1% osmic acid for 1 h at room temperature, and after dehydration in an ethanol series, were embedded in an Epon/Araldite 812 mixture. Semithin sections were stained with crystal violet and basic fuchsin and observed with an Olympus BH2 microscope. Thin sections, stained with uranyl acetate and lead citrate, were observed with a Jeol 1010 EX electron microscope. Images were acquired with an Olympus Morada TEM CCD camera.

E. mundtii Bacteria were fixed in 2% glutaraldehyde for 1 h at room temperature and subsequently processed for electron microscopy observations according to Tettamanti and Malagoli (2008).

2.9. Microbial analysis of artificial diet processed under different physical methods

For each preparation either of autoclaved or microwave cooked, 3 g of material were transferred to 50 ml falcon tubes containing 27 ml of saline solution. Tubes were vortexed for 30 s and placed in a horizontal shaker for 30 min. Serial dilutions were made and 100 µl aliquots plated on PCA medium in petri dishes incubated at 22 °C.

2.10. Analysis of epiphytic and endophytic microflora of mulberry leaves

For colony isolation, 15 g of mulberry leaves picked from plants were placed in a 50 ml falcon tube with 13.3 ml of sterile saline solution. Tubes were vortexed for 2 min. Serial dilutions were made and 100 µl aliquots plated on PCA medium in petri dishes incubated at 30 °C.

For culture-independent DNA extraction from microbial endophytes, mulberry leaves were surface sterilized by immersion for 10 s in 95% ethanol, 30 s in 5% sodium hypochlorite followed by two rinses in sterile saline solution. After this treatment, the leaves were cut aseptically into small pieces and transferred to pre-weighed eppendorf tubes. For comparison of epiphytic with endophytic microbiota, other leaves were not sterilized, but only immersed in saline to obtain weights comparable to those of the sterilization treatment and were then cut into small pieces and transferred to eppendorf tubes. Tubes were subjected to centrifugation for 1 min to drain excess fluid and plated onto PCA as sterilization control. Tubes were put in liquid nitrogen for 3 min and 100 µl of lysis solution were added and each sample was mashed with a pestle. Samples were heated to 94 °C for 20 min, centrifuged for 10 min at 13,200g. Ten microliters of supernatant were added to 90 µl of sterile water. DNA amplification and subsequent treatments were performed as described.

2.11. Extraction of bacteria and DNA from eggs or first-instar larvae of *B. mori*

Eggs were detached from the paper for oviposition of the moths, by dipping into water and gentle shaking. Twenty eggs or 20 newly-hatched first-instar larvae were transferred using tweezers into an eppendorf tube, to which 50 µl of lysis solution were added. Eggs or larvae were pestled with sterile forceps. Each eppendorf tube was then subjected to vortex for 1 min and heated to 94 °C for 20 min. Samples were centrifuged for 10 min at 13,200g. Ten microliters of supernatant were added to 90 µl of sterile water. DNA amplification and subsequent treatments were performed as described. For live bacteria isolation, 10 eggs were either touched and streaked on plates of PCA or vortexed in 100 µl of sterile distilled water and subsequently plated. Surface sterilization of eggs to test effect on bacterial rescue involved, a brief immersion in

75% ethanol, followed by dipping for 20 min in 3% formalin, and rinsing in 90% ethanol for rapid egg surface drying.

2.12. Infection of larvae reared under germfree conditions

Larvae were reared according to Sumida and Ueda (2007) and infected at the hatching, and at the beginning of the fourth and the fifth instar. Under the clean bench, dilutions (10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4}) of an overnight liquid pure culture of *E. mundtii* in nutrient broth were sprinkled directly on the diet. Twenty microliters of a 10^{-4} dilution was enough to produce the disease symptoms on the larvae, which was used in all the subsequent tests.

All the experiments were carried out in triplicate with respective germfree control larvae. Nutrient broth devoid of *E. mundtii* was sprinkled on the control diet.

Plating and colonies counting were performed from infected and healthy larvae after gut dissection, and from their faeces, collected before spinning.

2.13. Assay of in vitro bacterial tolerance to chloramphenicol

The ability of *E. mundtii* to grow in the presence of different concentrations of chloramphenicol (5 µg/ml, 25 µg/ml and 50 µg/ml obtained from a 50 mg/ml stock in ethanol) was tested. *E. mundtii* to be tested for growth under these different conditions was inoculated in 10 ml of liquid media (Nutrient Broth) and incubated at 30 °C with shaking. Growth was assessed spectrophotometrically as absorbance at wavelength of 600 nm.

2.14. Statistic analysis

Two-ways ANOVA analysis was performed on the mortality percentages (after transforming them in arcsin) shown in Table 2; post hoc test (Tukey's test) was carried out on the same data. Statistica 7 software was employed.

3. Results

3.1. Larvae from non-germfree rearing on artificial diet with chloramphenicol

3.1.1. Microbial isolation

Larvae reared on artificial diet containing chloramphenicol cooked in microwave were first examined. Plating suspensions of intestine from surface-disinfected larvae yielded $6.62 \times 10^3 \pm 1.38 \times 10^3$ (mean \pm SD) colony forming units (cfu) per intestine. Intestines from larvae not treated with surface disinfectants gave rise to values of $1.60 \times 10^7 \pm 5.89 \times 10^6$ cfu per intestine.

Surface disinfection appeared to considerably reduce the number of bacterial colonies isolatable from larval gut. The likely reason, rather than residual external bacteria, is partial ingestion of liquids, ethanol and sodium hypochlorite, by the larvae during disinfection. In both cases the colonies, despite the difference in number, belonged to a single and very characteristic morphological type, forming round, whitish colonies, of about 1 mm of diameter after 24 h of growth. Such monoxenic situation was judged indicative of no contamination from epidermal microbiota residing on live larvae which would give several different colony types in low numbers (data not shown).

Due to the consistency in morphology between the treated and untreated larvae, surface disinfection was omitted in the subsequent experiments.

The inner and outer microbiota of these insects are indeed reported to be rather apart; the epidemiological importance of the silkworm body in preserving contamination by *B. mori* Nuclear

Polyhedrosis virus was demonstrated by Arakawa (2008). Besides, the alkaline reaction of the hindgut renders such inner environment highly selective for bacteria. Aliquots of the same bacterial suspensions used for plating were diluted and used to prepare microscopy slides, which were stained with acridine orange and observed in epifluorescence. Consistently with the plate results a single morphology was observed (Fig. 1A). Bacteria were cocci occasionally occurring in small chains of 2–3 cells.

Electron microscopic observations confirmed that the isolated bacteria were round-shaped, with a diameter around 600–700 nm (Fig. 1B). The cell wall was clearly-identifiable, with a thickness of 50 nm (Fig. 1C).

3.1.2. DNA-based analyses of bacteria

The microbial colonies were analyzed by molecular techniques. Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) is a methodology based on restriction endonuclease digestion of amplified bacterial 16S rDNA. The pattern of ARDRA *Hinf*I digestion of 16S amplicons obtained from a number of randomly chosen different colonies, resulted in the same profile supporting the occurrence of a single bacterial species.

From two random-chosen colonies and by utilizing the forward primer two identical sequences of about 700 nucleotides were obtained, which were analyzed by BLAST analysis against GenBank database and showed 100% identity with bacteria classified into the taxon *E. mundtii* (EF428246).

3.2. Larvae from germfree rearing on artificial diet

3.2.1. Microbial isolation

When bacteria were isolated from hindguts of larvae reared in microbiologically controlled conditions, we recorded a very low and sporadic bacterial presence. Plates could yield no colonies at all or occasional ones, yielding an average of $3.33 \times 10^1 \pm 2.89 \times 10^1$ cfu. The observed morphotypes included white-yellowish large and uneven colonies none of which resembled *E. mundtii*'s morphology which was recorded in non-germfree larvae.

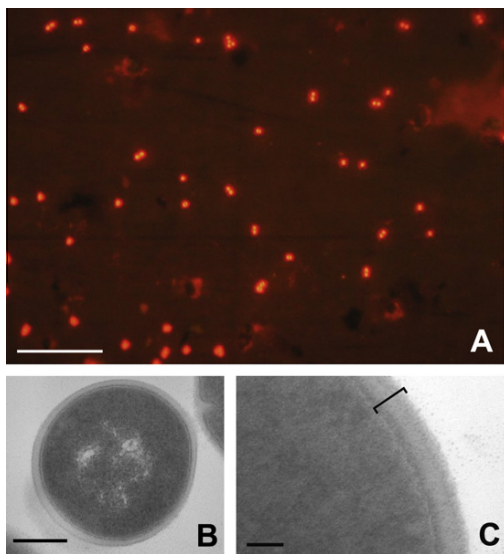


Fig. 1. Morphological characterization of *Enterococcus mundtii*. Acridine orange staining of bacterial suspensions shows that bacteria have a coccal morphology and can be organized in small chains of cells (A). TEM analysis confirms that bacteria are round-shaped, with a diameter around 600–700 nm (B) and a cell wall with a thickness of 50 nm (C, bracket). Scale bars: 10 μ m (A); 200 nm (B); 50 nm (C).

The microscopy observation of acridine orange-stained slides confirmed nearly axenic situation as no cells could be spotted.

3.2.2. DNA-based analyses of bacteria

Lysis and PCR amplification of the colonies isolated on the plates, followed by DNA digestion for ARDRA analysis confirmed absence of *E. mundtii* from germfree larvae. The occasional colonies instead were represented by a prevailing species which was identified upon sequencing as *Bacillus licheniformis* (100% identical to GenBank EU626409).

3.3. Larvae from leaf rearing

Very few bacteria were isolated from the alimentary canals of larvae reared on the leaves. Plates yielded no colonies or some occasional ones. Morphotype and DNA-based analyses confirmed the sporadic presence of *E. mundtii* and of some epiphytic and endophytic bacteria whose profile was found in the leaf analysis too.

3.4. Microbiological analyses of artificial diet

Artificial diet processed by two different sanitization methods was tested by plating resuspension dilutions to assess its culturable microbial load. None of the two methods proved to produce sterile material. Colony counts were overall rather low. The autoclaved diet yielded $1.13 \times 10^2 \pm 6.41 \times 10^1$ cfu per gram of diet fresh weight, while the one treated in microwave gave rise to higher values but in highly variable ratios, resulting in $2.4 \times 10^3 \pm 1.34 \times 10^3$ cfu per gram of fresh weight. Colony identities from several isolates were assessed by molecular methods. The majority of cases, in both preparations, belonged to *B. licheniformis* species. *B. licheniformis* is a spore-forming bacterium, known for its occurrence in food-related habitats. The relative heat-resistant nature of its spore can warrant a certain degree of survival in artificial diet in spite of the microwave oven or autoclave treatment.

One single colony of *E. mundtii* was found in one of the plates from the microwave processed diet. These results indicate that although *E. mundtii* can be present in the *B. mori* pabulum, it does not appear to abund or multiply in such *ex situ* context. Its sporadicity was confirmed by the failure of attempts to detect it by direct PCR amplification straight from aliquots of lysed diet (data not shown). This allows to rule out its possible presence in high titers in viable but not culturable state in the diet and supports the idea that its proliferation could occur within the insect gut.

3.5. Natural microbiota of mulberry leaves

The culturable epiphytic population yielded colony counts of $3.2 \times 10^4 \pm 1.3 \times 10^4$ cfu per gram of leaf fresh weight. The morphotypes belonged to a dozen of different kinds which were analyzed by ARDRA. Among these, the profile of *E. mundtii* was identified and its identity confirmed by 16S nucleotide sequencing. Its quantitative presence, extrapolated by the proportion of its ARDRA profile and colony type amounts to about 1.7×10^3 cfu per gram of leaf fresh weight. This confirms that the bacterium can occur in the natural food source of *B. mori*, but again its numbers are low compared to the quantities that we observed within guts of larvae, consistent with a post-ingestion multiplication within the insect.

3.6. Intrinsic chloramphenicol resistance assays

The effects of this antibiotic which is added to artificial diet was assessed on *in vitro* growth of *E. mundtii* to verify the possibility of controlling its multiplication. Increasing values were

Table 1
Gut microflora contents in apparently infected and non-infected larvae.

Dilution					
Apparently infected larvae (cfu ^a)	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
	N.C. ^b	N.C.	N.C.	>300	>300
	N.C.	N.C.	N.C.	>300	247 ± 6
	N.C.	N.C.	N.C.	>300	166 ± 5
Apparently non-infected larvae (cfu)	1 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	N.C.	N.C.	178 ± 21	18 ± 4	1 ± 1
	N.C.	N.C.	178 ± 21	18 ± 4	1 ± 1

Two repetitions for each dilution were performed.

Differences in bacterial colony numbers (averages and standard deviations) recorded among larvae, apparently healthy or showing the disease symptoms, which were grown under non-germfree conditions.

^a Colony forming units.

^b Non countable.

tested up to 50 µg/ml which is the dosage normally used in microbiology to prevent growth of chloramphenicol-sensitive species. *E. mundtii* tolerated doses up to 25 µg/ml with minimal reductions of its growth rate, while its growth was completely prevented at 50 µg/ml. However, after 48 h of incubation at this dosage, in about half of the cultures we recorded the phenomenon of growth resumption and the cultures eventually attained regular stationary phase biomass values, testifying the frequent occurrence of spontaneous mutations allowing to tolerate chloramphenicol.

3.7. Microbiological analyses of diseased larvae

During routine rearing on artificial diet in non-germfree conditions, occasional infection of larvae with flacherie symptoms occurred.

Diseased larvae were isolated from different rearing boxes and compared with apparently healthy larvae.

The first result from larval dissection was that the guts were rather empty in the diseased larvae. This finding complies with observations that larvae affected from flacherie lose their appetite and show diarrhoea symptoms.

From different dilutions of the gut content and plate counting, the results shown in Table 1 were obtained.

Colonies from agar plates were morphologically and microscopically identified as *E. mundtii*, and DNA analysis confirmed such datum.

Colony counting demonstrated that *E. mundtii* sporadically occurred even in apparently healthy larvae from non-germfree rearing on artificial diet with chloramphenicol. However, the number of colonies was much lower in healthy larvae with respect to diseased ones. It is possible that a minimum number of bacteria is necessary in order for larvae to reveal disease symptoms; consequently, “apparently non-infected” larvae could have come into contact with the bacterium at a later stage and they could have eventually developed the disease if their cycle had not been terminated by the analysis process.

Table 2
Mortality recorded under germfree conditions on artificially-infected silkworms.^a

Time of larval treatment	Larval mortality (%)	Spinning mortality (%)	Cocoon mortality (%)	Adult mortality (%)
Beginning of the fourth instar	45 a ^b ± 10	30 a ± 5	12 a ± 12	5 a ± 8
Beginning of the fifth instar	0 b ± 0	40 a ± 20	16 a ± 10	13 a ± 3
No treatment (control)	0 b ± 0	0 b ± 0	0 b ± 0	0 b ± 0

Differences in the mortality rates shown by germfree individuals purposely infected at various stages of their larval development (averages and standard deviations).

^a Larvae were reared on the diet treated with 20 µl of a 10⁻⁴ dilution of *E. mundtii* liquid culture in comparison to control which received plain uninoculated bacterial culture medium.

^b ANOVA analysis showed significant differences among these. Values reported in the same column and which are followed by different letters are different at $P < 0.05$ according to Tukey's test.

3.8. Histochemical analysis of diseased larvae

To evaluate the occurrence of a virus in gut tissues and to verify whether it could contribute to the insurgence of flacherie in silkworms, midgut of diseased larvae underwent a specific histochemical staining with pyronin. No evidence of pyronin-positive globules, indicative of degenerated goblet cells affected by the virus, was observed, thus arguing against a viral intervention in this disease (Fig. 2A).

3.9. DAPI staining of diseased larvae

DAPI staining performed on midgut sections showed presence of bacteria within the midgut epithelium and in the adjacent hemocoelic region (Fig. 2B). Moreover a positivity was found in the midgut lumen (Fig. 2B), where bacteria were occasionally organized in small chains (Fig. 2C) or groups (Fig. 2D).

3.10. Light and electron microscopy of diseased larvae

TEM analysis confirmed the results obtained by pyronin staining since no virus was detected in silkworm tissues. On the contrary, *E. mundtii* was found both in the midgut lumen, among the microvilli of columnar cells (Fig. 2E), and in the hemocoelic compartment, just beneath the gut epithelium and among the muscles (Figs. 2F, G). In addition, bodies of comparable size were also found within the cytoplasm of midgut cells. They showed a partially degraded structure and were surrounded by abundant rough endoplasmic reticulum (Fig. 2H).

3.11. Infection of germfree larvae

Germfree larvae showed typical symptoms of bacterial infection after some days, which was variable according to the quantity and concentration of the inoculum. Larvae were infected at the begin of the 1st, 4th and 5th instars. The deliberate experimental infection of larvae at the beginning of the fourth instar with 20 µl of a 10⁻⁴ dilution of *E. mundtii* culture produced appearance of the first symptoms at the last moulting. Mortality continued to increase during the fifth instar with rather a complete spinning failure. On the other hand, the same amount and dilution of the bacterium administered at the beginning of the fifth instar resulted in the appearance of the first symptoms just at the onset of spinning (6–7th day of the fifth instar). In Table 2 the results of mortality rate until eclosion of adults are presented for larvae treated at the end of the fourth or at the beginning of the fifth instar.

In the last instar, it was possible to isolate *E. mundtii* both from the guts of infected larvae and from their faeces which resulted very rich in bacteria, according to colony plate counting.

On the contrary, quite unexpectedly, administration of *E. mundtii* performed in the first instar did not give any symptom appearance even though the rearing was continued until the onset of spinning, followed by pupation and adult eclosion; the experiment was repeated twice and confirmed the same result.

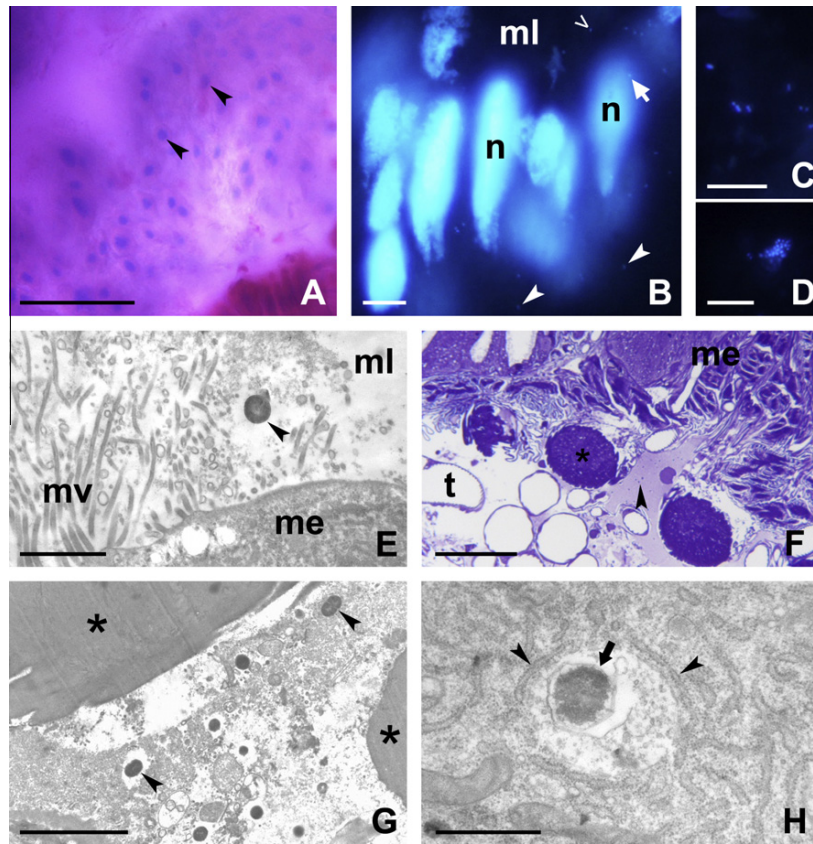


Fig. 2. Analysis of midgut tissues in diseased larvae. (A) Whole-mount specimen. Staining with pyronin and methyl green does not show any pyronin-positive globules, typical of degenerated goblet cells affected by a virus. Arrowheads indicate nuclei of midgut epithelial cells. (B–D) Cross-sections of midgut epithelium. DAPI staining reveals the presence of bacteria within the midgut epithelium (B, arrow), in the adjacent hemocoelic region (B, arrowheads) and in the midgut lumen (B, ^). In the midgut lumen, bacteria are sometimes organized in small chains (C) or groups (D). (E–H) Light and electron microscopy observations confirm the localization of *E. mundtii* in silkworm tissues. Bacteria are visible in the midgut lumen (E, arrowhead) among the microvilli (E, mv) and in the hemocoel (F, G, arrowheads). Degraded bodies similar to *E. mundtii* can be observed within the cytoplasm of midgut cells (H, arrow): they are surrounded by abundant rough endoplasmic reticulum (H, arrowheads). me: midgut epithelium; ml: midgut lumen; n: nuclei of midgut cells; t: tracheae; asterisks: muscles. Scale bars: 100 µm (A); 10 µm (B–D); 2 µm (E); 50 µm (F); 5 µm (G); 1 µm (H).

3.12. Microbial analyses of eggs

Eggs laid from moths originated from larvae reared in control conditions or from those purposely infected with *E. mundtii* were tested for the possibility of carrying internally or externally bacteria related to their conditions of previous generation. DNA-based methods and plate culturing of colonies were used. In order to ascertain the location of bacteria, aliquots of eggs of both types were previously surface sterilized. For plate culturing intact eggs were compared with eggs broken in sterile conditions in water. Eggs from previously infected moths contained a fair amount of externally-borne *E. mundtii* at loads of >100 cfu per egg. On the contrary, eggs from originally uninfected *B. mori* cultures, had very few bacteria on them and these belonged to two morphological types unrelated to *E. mundtii*. Surface sterilized of any kind did not give rise to colony development neither for intact nor for crushed egg plating, suggesting that transmission of bacteria is an event relying on external carry over. The fact that *E. mundtii* can be found abundantly in *B. mori* faeces is in line with these observations.

4. Discussion

The most remarkable finding of the current research was to unequivocally identify *E. mundtii* as clearly correlated with infectious flacherie recorded in non-germfree rearing of *B. mori* larvae

on artificial diet. The Koch's postulates were fulfilled by the experimental setup suggesting that the bacterium could be the etiological agent of silkworm flacherie. In fact, our experiments demonstrated presence of the bacterium in diseased larvae, and in every case where the symptoms were observed. It was possible to isolate the bacterium from the flabby larvae (Table 1), to cultivate it into a growth medium and to inoculate it in healthy larvae by obtaining the disease outbreak again in the deliberately-infected silkworms (Table 2). Furthermore, *E. mundtii* was identified by acridine orange and DAPI stainings and by electron microscopy observations. DNA analysis unambiguously proved the bacterium attribution to its taxonomic position.

On the basis of histochemical analysis of the gut tissue dyed with pyronin (Fig. 2A) and observations under the electron microscope in our experimental conditions we could not observe hints of possible infection caused by picorna viruses or densovirus that are hypothesized to be causes or co-causes of the disease (Tanada and Kaya, 1993). Different authors (Aizawa et al., 1964; Ishikawa and Miyajima, 1968) reported a synergistic effect of bacteria and viruses. We cannot exclude that *E. mundtii* could act as a vector for possibly co-infecting viruses involved in the disease but we can affirm that the presence of the bacterium appears necessary to observe flacherie.

In general, it is not surprising that Gram positive cocci are pathogenic microorganisms to *B. mori*: Pasteur (1870) first reported about flacherie caused by this kind of bacteria. In the present paper

we define the taxonomical identity of these Enterococci, and point towards the understanding that one single species is responsible for the disease in the silkworm larvae reared with artificial diet. The involvement of coccal forms was also mentioned in Kodama's work, carried out in the 1970s and later published in English version (Kodama, 2001), while the definition of *E. mundtii* as novel species was published by Collins et al. (1986). Possibly the species has been confused with *Streptococcus faecalis* or *faecium*, nowadays *E. faecalis* and *faecium*. In fact, the mechanism described by Kodama resembles very much the behavior of *E. mundtii* in our experiments: (1) the infection outbreaks even in the presence of very low concentration of bacteria added to the diet; (2) bacteria multiplies very rapidly in the host's gut irrespectively on the alkaline pH they are able to endure; (3) bacteria can enter the body cavity after multiplying in the gut.

On the one hand, multiplication at very low concentrations of inoculum was proved in our tests as well as the quick effect on the mortality rate in the treated larvae (Table 2); on the other hand, bacterial presence in the gut and body tissues was demonstrated by electron microscopy observations, and by the fact it was found very abundantly in the larval faeces. The cytoplasm of midgut epithelial cells in infected larvae contained degraded bodies similar to bacteria, within vacuoles that evoked autophagic compartments, and surrounded by abundant RER. In other insect models it has been demonstrated that migration of bacteria from the midgut lumen, through the midgut epithelium and its basal lamina, to haemocoel with consequent infection of other organs is accompanied by midgut cell degeneration. This is a first line defence system to counteract pathogens. In this context, enclosing of bacteria by the reticulum and activation of autophagy are necessary to maintain midgut homeostasis (Nehme et al., 2007; Rost-Roszkowska et al., 2010).

Although this preliminary evidence about the mechanisms that silkworm midgut cells undertake to cope with *E. mundtii* invasion seems plausible, it is just a hypothesis that will need further investigation. Also the way of infection followed by the bacteria from midgut lumen toward other tissues is not clear yet.

E. mundtii belongs to Lactobacillaceae, therefore it produces lactic acid and acetic acid that could cause a decline in the otherwise alkaline pH of the contents of the silkworm alimentary canal. As a result an enteric disease occurs, with diarrhoea as a chief symptom and the larval body increasingly shrinks. The production of lactic acid and acetic acid in diseased larvae was really easy to detect in our tests, due to the characteristic smell of the infected batches of larvae.

Bacteria, referred at the time as *Streptococcus bombycis*, that could coincide with *E. mundtii* were reported by Lysenko (1958) as a facultative pathogen for the silkworm. However, it is rather significant that the very same species *E. mundtii* was collected from silkworm larvae fed on mulberry leaves in China (Fei et al., 2006). With our analysis of epiphitic and endophitic microflora we first proved that indeed *E. mundtii* can be found on the mulberry leaves in nature. Fei et al. (2006) supposed silkworm can be contaminated through the polluted mulberry leaves. In our tests mulberry phyllosphere itself was revealed to be a site of presence for *E. mundtii* but not a place that appears to foster its multiplication.

On the other hand, incapability of the bacterium to grow on artificial diet itself was proved by *E. mundtii* inoculation of the diet and by the following colony rescue performed on dilutions of the spiked diet, constantly giving no indication of any multiplication (data not shown). The absence from the diet, which was proved to be absolute in the autoclaved processed material, or a slight random presence, in the microwave processed diet, testify that the leaf substitute is not a good environment for the bacterium proliferation either. Furthermore as stated in the Results, our attempts of inoculating the bacterium in the diet for the first

instar larvae failed; probably that is due to the size of newly-hatched silkworms which did not eat large amounts of food so that bacteria were prevented from entering in appropriate quantities in the larval guts, at the same time being incapable of proliferating onto the diet.

With regard to the modality of larval infection, on the basis of our experimental data, we can exclude a vertical trans-ovarian type transmission of the bacterium from the mother moth to the progeny, because disinfection, routinely performed on the eggs before silkworm rearing, was demonstrated sufficient to prevent the transmission due to the egg shell contamination. We also clearly showed that colonies of *E. mundtii* could not be rescued on plates from surface-disinfected eggs neither intact nor crushed, while they would abundantly grow if eggs were not disinfected and came from moths whose larvae had been infected. As silkworm has been over centuries completely a domesticated species which does not exist in wild conditions, beside the food, i.e., leaves or diet, as a reservoir for the bacterium transmission to the larvae, one could take into consideration also the novel hypothesis that man could be a contamination source. In fact, the same bacterial species was isolated from human sources (Facklam and Collins, 1989) and it has been demonstrated that *E. mundtii* can be a species of clinical interest (Higashide et al., 2005; Kaufhold and Ferrieri, 1991; Raja et al., 2006) confirming the ambiguous nature of Enterococci capable to be used as probiotic bacteria (Einsfeld Ferriera et al., 2007) but also prone to cause human infections. *E. mundtii*, as many enterococcal species, can produce bacteriocins, small secreted peptides which can inhibit many other food-borne pathogens (Simonetta et al., 1997; Ennahar et al., 1998; Laukova and Czikkova, 1999). According to Fei's research (Fei et al., 2006) the bacterium was not responsible for flacherie in the silkworm and its occurrence in the guts of healthy silkworms was related to its antimicrosporidian activity. In the case of the silkworm reared on the leaves, possibly the *E. mundtii* probiotic action prevails, as supposedly the more composite microflora resulting in the gut could hinder its excessive multiplication in the alimentary canal. This is probably the reason why Enterococci have ever been considered as "secondary invaders" in the silkworm reared on fresh mulberry leaves and the bacterial flacherie appearance was thought to be triggered by predisposing factors such as viral disease occurrence, *Bacillus thuringiensis* toxins, over-ripening of larvae, combinations of more than one of these factors, etc. (Kodama, 2001). Moreover, we also found the bacterium in the guts of silkworms reared on leaves without observing any symptoms in the larvae. However, in the case of silkworms reared on artificial diet, presence of chloramphenicol as an additive could contribute to create a nearly axenic situation, where there are practically no competitors. *E. mundtii*, that could be introduced in the rearing possibly by man's manipulation of the diet, unlike other generic environmental microorganisms, is able to easily adapt and multiply even in the presence of the antibiotic, as demonstrated by our *in vitro* growth experiment. In the silkworm gut it finds an ideal environment to grow and to multiply, spreading from one larva to the other by means of infected faeces and after crossing through the gut defence barriers it infects all the larval tissues, rapidly conducting the silkworms to their death.

Therefore, chloramphenicol seems to have lost its historic role as unique additive to the artificial diet for the silkworm larvae and it cannot be recommended any longer to be used to prevent bacterial infection. Finding a possible alternative is not an easy task due to quick adaptation by Enterococci to new active ingredients and to progressive and crossed resistance to many antibiotics, which currently poses great treats even in the field of human infections. More in-depth studies are required to individuate new antibacterial substances apt to be added to artificial diet or germfree rearing has to be adopted as an efficient method to counteract bacterial infections.

Acknowledgments

G.T.'s work was supported by the Italian Ministry of University and Research (PRIN 2008, protocol 2008SMMCJY) and by F.A.R. 2009–2010 Grants from the University of Insubria.

S.C.'s work was funded by a grant from Spintec Engineering GmbH (Aachen – Germany), in the framework of the collaborative TST agreement.

References

- Aizawa, K., Furuta, Y., Kutaka, K., Sato, F., 1964. On the etiologic agent of infectious flacherie of the silkworm, *Bombyx mori* (Linnaeus). *Bull. Seric. Exp. Sta.* 19, 223–240.
- Arakawa, T., 2008. Epidemiological importance of silkworm body surface for persistence of viral contamination by nucleopolyhedrovirus of *Bombyx mori* L. in an artificial rearing environment. *Sericologia* 48, 23–30.
- Cappellozza, L., Cappellozza, S., Saviane, A., Sbrenna, G., 2005. Artificial diet rearing system for the silkworm *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae): effect of vitamin C deprivation on larval growth and cocoon production. *Appl. Entomol. Zool.* 40, 405–412.
- Collins, M.D., Farrow, J.A.E., Jones, D., 1986. *Enterococcus mundtii* sp. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36, 8–12.
- Deseő Kovács, K.V., Rovesti, L., 1992. *Lotta microbiologica contro i fitofagi. Teoria e pratica*, first ed. Edagricole, Bologna (in Italian).
- Einsfeld Ferreira, A., Canal, N., Morales, D., Bopp Fuentefria, D., Corção, G., 2007. Characterization of Enterococci produced by *Enterococcus mundtii* isolated from human feces. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 50, 249–258.
- Ennahar, S., Aoude-Werner, D., Assobhei, O., Hasselmann, C., 1998. Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 isolated from cheese. *J. Appl. Microbiol.* 85, 521–526.
- Facklam, R.R., Collins, M.D., 1989. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J. Clin. Microbiol.* 27, 731–734.
- Fei, C., Lu, -X.M., Qian, Y.H., Zhang, H., Mahmood, Q., 2006. Identification of *Enterococcus* sp. from midgut of silkworm based on biochemical and 16S rDNA sequencing analysis. *Ann. Microbiol.* 56, 201–205.
- Higashide, T., Takahashi, M., Kobayashi, A., Ohkubo, S., Sakurai, M., Shirao, Y., Tamura, T., Sugiyama, K., 2005. Endophthalmitis caused by *Enterococcus mundtii*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1475–1476.
- Ishikawa, Y., Miyajima, S., 1968. Interaction between infectious flacherie virus and some bacteria in the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Seric. Sci. Jpn.* 37, 471.
- Kaufhold, A., Ferrieri, A., 1991. Isolation of *E. mundtii* from normally sterile body sites in two patients. *J. Clin. Microbiol.* 29, 1075–1077.
- Kodama, R., 2001. Bacterial diseases and countermeasures. In: Hamamura, Y. (Ed.), *Silkworm Rearing on Artificial Diet*. Science Publishers Inc., Enfield, Plymouth, pp. 162–221 (Translated from Japanese).
- Laukova, A., Czikkova, S., 1999. The use of enterocin CCM4231 in soy milk to control the growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.* 87, 182–186.
- Lysenko, O., 1958. Non-spore forming bacteria pathogenic to insects: incidence and mechanisms. *Ann. Rev. Microbiol.* 39, 673–695.
- Manimegalai, S., 2009. Bacterial pathogens of mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. and their management strategies. *Sericologia* 49, 401–420.
- Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J., Wade, W.G., 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 795–799.
- Matsubara, F., Sang, Q., Sugimori, H., Ishiko, S., Sumida, M., Matsumoto, T., 1988. New method of silkworm rearing on an artificial diet (two feedings throughout the larval period). *J. Seric. Sci. Jpn.* 57, 118–122 (in Japanese).
- Nehme, N.T., Liégeois, S., Kele, B., Giammarinaro, P., Pradel, E., Hoffmann, J.A., Ewbank, J.J., Ferrandon, D., 2007. A model of bacterial intestinal infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathog.* 3, e173.
- Osborn, A.M., Moore, E.R.B., Timmis, K.N., 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* 2, 39–50.
- Pasteur, L., 1870. *Etudes sur la Maladie de Vers à Soie*. Gauthier-Villars, Paris.
- Raja, N.S., Ul Haq, R.N., Janjua, K.A., 2006. Management of vancomycin-resistant Enterococci infections. *Infect. Dis. J. Pak.* 15, 13–19.
- Rost-Roszkowska, M.M., Machida, R., Fukui, M., 2010. The role of cell death in the midgut epithelium in *Filientomon takanawanum* (Protura). *Tissue Cell* 42, 24–31.
- Simonetta, A.C., Moragues de Velasco, L.G., Frison, L.N., 1997. Antibacterial activity of Enterococci strains against *Vibrio cholera*. *Lett. Appl. Microb.* 24, 139–143.
- Sumida, M., Ueda, H., 2007. Dietary sucrose suppresses midgut sucrose activity in germfree fifth instar larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* 76, 31–37.
- Tanada, Y., Kaya, H.K., 1993. *Insect Pathology*. Academic Press, S. Diego.
- Tettamanti, G., Malagoli, D., 2008. In vitro methods to monitor autophagy in Lepidoptera. *Methods Enzymol.* 451, 685–709.
- Tettamanti, G., Grimaldi, A., Casartelli, M., Ambrosetti, E., Ponti, B., Congiu, T., Ferrarese, R., Rivas-Pena, M.L., Pennacchio, F., de Eguileor, M., 2007. Programmed cell death and stem cell differentiation are responsible for midgut replacement in *Heliothis virescens* during prepupal instar. *Cell Tissue Res.* 330, 345–359.
- Veda, K., Nagai, I., Orikomi, M.H., 1997. *Silkworm Rearing*. Springer, Berlin (Translated from Japanese).

5

Conclusioni generali

Nel corso del triennio 2011–2013, l'attività scientifica e sperimentale condotta ha portato al raggiungimento di diversi obiettivi, riassunti nei capitoli precedenti ed oggetto di pubblicazioni (una già accettata e due in corso di valutazione da parte dei referee).

La parte centrale e più impegnativa della sperimentazione, ha riguardato la selezione di razze nutrizionalmente efficienti e la valutazione quantitativa mediante indici nutrizionali, del miglioramento ottenuto con la procedura mista foglia–dieta, implementata per accelerare l'incremento di prestazioni dell'apparato di sintesi proteica delle larve - in generale - e delle ghiandole della seta nello specifico. Come esposto nel Capitolo 2, la strategia applicata si è dimostrata efficace anche se, in certe situazioni (razze di origine cinese), dovrà essere affiancata ad una procedura di preselezione per l'adattabilità alla dieta artificiale sostitutiva.

La gestione delle prove e la messa a punto dei dettagli sperimentali, ha inoltre portato alla produzione di ulteriori dati scientifici in grado di chiarire e mettere a fuoco, altri aspetti legati alla biologia del baco da seta. Questo ha permesso la redazione di un articolo, riguardante la vitalità e la resistenza degli embrioni della razza polivoltina Nistari in seguito all'esposizione al freddo, mostrando come sia necessario estendere gli strumenti utilizzati in questo ambito. Solo così, si potrà comprendere la fisiologia che sottende ai meccanismi responsabili degli adattamenti, in grado di conferire agli embrioni resistenza alle basse temperature.

Per quanto riguarda invece la microbiologia negli allevamenti su dieta artificiale, l'isolamento dell'*Enterococcus mundtii* come patogeno, ci ha consentito di caratterizzare un microorganismo in grado di sviluppare velocemente meccanismi di resistenza all'antibiotico più comunemente utilizzato in queste condizioni. Questo sottolinea una volta di più come, per allevare efficacemente questo lepidottero, sia necessario avere una buona conoscenza della sua biologia ed avere una buona pratica di laboratorio in modo da

prevenire l'insorgenza di malattie, non curabili e difficilmente contenibili in caso di allevamenti ad alta densità. Esperimenti d'inoculo selettivi, hanno altresì permesso d'individuare la sintomatologia precoce, connessa con questo tipo di batteriosi consistente in un caratteristico odore generato dai metaboliti secondari, emessi dal batterio durante i processi fermentativi sviluppati all'interno dell'intestino dell'ospite. L'operatore esperto, può in questo modo intercettare l'insorgenza della setticemia adottando le opportune contromisure che consistono, sostanzialmente, nell'isolamento e nell'eventuale eliminazione dei lotti infetti in modo da contenere l'epidemia e non compromettere la totalità degli allevamenti.

Gli incrementi di prestazioni ottenuti con la procedura di selezione, non rappresentano ad ogni modo, un punto di arrivo ma solamente una tappa di un processo che continuerà negli anni. Attività di questo tipo sono infatti estremamente lunghe ed i risultati ottenuti, vanno consolidati e migliorati, continuando con la pressione selettiva in abbinamento con lo sviluppo degli alimenti sostitutivi. Poiché la selezione viene fatta su linee pure, le subpopolazioni ottenute possono poi venire impiegate per creare nuovi ibridi per impieghi tradizionali e non.

Negli impieghi tradizionali, dove si usa la corteccia serica o la seta come fibra tessile, l'elevata efficienza porterà ad un miglioramento dei costi di produzione. Le selezioni possono inoltre essere usate come materiale genetico di base, da incrociare con linee transgeniche dove sia auspicabile un'elevata espressione di transgeni, sottoposti al controllo dei promotori delle proteine della seta. Le linee usate per la transgenesi sono infatti generalmente scarse produttrici di seta però, una volta consolidate, possono essere incrociate con linee monovoltine sia per sfruttare l'elevata produttività ed efficienza di queste ultime sia per una migliore conservazione e gestione delle nascite.

Durante gli allevamenti e la rilevazione dei parametri produttivi (peso della corteccia, del bozzolo, ecc.) necessari per individuare gli individui migliori, la necessità di introdurre alcune facilitazioni metodologiche, ha permesso poi la stesura di due brevetti. Per entrambi, le domande, sono state redatte, anche a mio nome, in collaborazione con studi legali individuati dal CRA e sono ora depositate ed in attesa di una valutazione da parte degli organi competenti.



Elsevier license

**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Oct 15, 2013

This is a License Agreement between alessio saviane ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	alessio saviane
Customer address	Via Eulero 6A Padova, 35143
License number	3250270209254
License date	Oct 15, 2013
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Journal of Invertebrate Pathology
Licensed content title	Identification of <i>Enterococcus mundtii</i> as a pathogenic agent involved in the "flacherie" disease in <i>Bombyx mori</i> L. larvae reared on artificial diet
Licensed content author	Silvia Cappellozza, Alessio Saviane, Gianluca Tettamanti, Marta Squadrin, Elena Vendramin, Paolo Paolucci, Eleonora Franzetti, Andrea Squartini
Licensed content date	March 2011
Licensed content volume number	106
Licensed content issue number	3
Number of pages	8
Start Page	386
End Page	393
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Order reference number	
Title of your thesis/dissertation	Nutritional analysis and selection of <i>Bombyx mori</i> (Lepidoptera: Bombycidae) monovoltine strains characterized by high dietary efficiency on mulberry leaves and artificial diet

Expected completion date	Jan 2014
Estimated size (number of pages)	160
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Permissions price	0.00 EUR
VAT/Local Sales Tax	0.0 USD / 0.0 GBP
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

“Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER].” Also Lancet special credit - “Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier.”

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at permissions@elsevier.com)

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article. If this license is to re-use 1 or 2 figures then permission is granted for non-exclusive world rights in all languages.

16. **Website:** The following terms and conditions apply to electronic reserve and author websites:

Electronic reserve: If licensed material is to be posted to website, the web site is to be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course if:

This license was made in connection with a course,

This permission is granted for 1 year only. You may obtain a license for future website posting,

All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image,

A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com> , and

Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

17. **Author website** for journals with the following additional clauses:

All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image, and the permission granted is limited to the personal version of your paper. You are not allowed to download and post the published electronic version of your article (whether PDF or HTML, proof or final version), nor may you scan the printed edition to create an electronic version. A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> . As part of our normal production process, you will receive an e-mail notice when your article appears on Elsevier's online service ScienceDirect (www.sciencedirect.com). That e-mail will include the article's Digital Object Identifier (DOI). This number provides the electronic link to the published article and should be included in the posting of your personal version. We ask that you wait until you receive this e-mail and have the DOI to do any posting.

Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

18. **Author website** for books with the following additional clauses:

Authors are permitted to place a brief summary of their work online only.

A hyper-text must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com> . All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version.

Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

19. **Website** (regular and for author): A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx>. or for books to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>

20. **Thesis/Dissertation**: If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission.

21. **Other Conditions**:

v1.6

If you would like to pay for this license now, please remit this license along with your payment made payable to "COPYRIGHT CLEARANCE CENTER" otherwise you will be invoiced within 48 hours of the license date. Payment should be in the form of a check or money order referencing your account number and this invoice number RLNK501135976.

Once you receive your invoice for this order, you may pay your invoice by credit card. Please follow instructions provided at that time.

Make Payment To:
Copyright Clearance Center
Dept 001
P.O. Box 843006
Boston, MA 02284-3006

For suggestions or comments regarding this order, contact RightsLink Customer Support: customercare@copyright.com or +1-877-622-5543 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.
