

DANIELA BERTOLINI ZANATTA

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES RAPD PARA
POLIMORFISMO, RESISTÊNCIA E SUSCETIBILIDADE EM
LINHAGENS DE *Bombyx mori***

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
NOVEMBRO - 2006**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DANIELA BERTOLINI ZANATTA

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES RAPD PARA
POLIMORFISMO, RESISTÊNCIA E SUSCETIBILIDADE EM
LINHAGENS DE *Bombyx mori***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Mestre.

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
NOVEMBRO - 2006**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Z27i Zanatta, Daniela Bertolini
Identificação de marcadores RAPD para polimorfismo,
resistência e suscetibilidade em linhagens de Bombyx
mori / Daniela Bertolini Zanatta. - Maringá : [s.n.],
2006.
48 f. : il.

Orientadora : Prof. Dr. Maria Aparecida Fernandez.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá. Programa de Pós-graduação em Genética e
Melhoramento, 2006.

1. Bombyx mori - Melhoramento genético. 2.
Caracterização biológica. 3. Sequenciamento DNA. 4.
Infecção do bicho da seda - BmNPV. I. Universidade
Estadual de Maringá. Programa de Pós-graduação em
Genética e Melhoramento.

Cdd 21.ed. 638.2

A Deus, por tudo que proporcionou à minha vida, pela força e fé, que me mantiveram firme em meus objetivos.

A meus pais Neusa e Arnaldo, pelo apoio incansável dedicado à minha formação.

A minha irmã Luciana, pelo incentivo.

Aos amigos, pelo apoio, compreensão, amizade e pelas mãos acolhedoras em todos os momentos,

Com alegria e carinho dedico este trabalho.

Aos meus pais, de quem recebi apoio e incentivo, pelo carinho eterno,
dedicação e amor incondicional a mim despedido,

Dedico.

AGRADECIMENTO

À Deus, pelas oportunidades que tive em minha vida, por ter sempre me iluminado e por tudo o que sou.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Fernandez, por sua forma exigente, crítica e criativa de argüir as idéias apresentadas, direcionando este trabalho e facilitando o alcance de seus objetivos. Acima de tudo, por continuar a ser alguém muito especial, por quem tenho muito carinho e admiração. A você meus irrestritos agradecimentos.

À Prof^a. Dr^a. Rose Meire Costa Brancalhão e Prof^a. MSc. Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), pela amizade e por terem desenvolvido os experimentos de ensaio biológico de infecção das linhagens com o vírus BmMNPV.

Meu maior agradecimento é dirigido aos meus pais, por terem sido o contínuo apoio em todos estes anos, ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência de meus próprios valores.

Em especial, ao querido Flávio por ter entrado em minha vida e fazê-la muito mais agradável. São tantas as palavras que, diante de tamanha emoção que sinto não consigo escrever tudo o que gostaria.

À amiga Juliana Bravo, sempre prestativa e atenciosa. E como não há muitas maneiras de dizer o indizível, digo apenas – o que não é pouco – que por tudo.

À amiga Fabiana Gouveia pelas constantes provocações, mas principalmente pelos largos sorrisos.

Aos colegas do Laboratório de Organização Funcional do Núcleo, por terem feito os dias passarem de maneira mais agradável, tanto pelas boas e diferentes ajudas como pelas risadas compartilhadas.

À Roxelle Munhoz pela inestimável ajuda e por seu jeito simples de plantar idéias.

Agradecer a todos que ajudaram a construir esta dissertação não é tarefa fácil. O maior perigo que se coloca para o agradecimento seletivo não é decidir quem incluir, mas decidir quem não mencionar. Então, aos meus amigos que, de uma forma ou de outra, contribuíram com sua amizade e com sugestões efetivas para a realização deste trabalho, gostaria de expressar minha profunda gratidão.

BIOGRAFIA

Daniela Bertolini Zanatta, filha de Cedeunir Zanatta e Ana Tereza Bertolini Zanatta, nasceu em 17 de janeiro de 1981, na cidade de Marialva, Estado do Paraná. Diplomou-se em janeiro de 2005 em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá, com habilitações em licenciatura e bacharelado. Em março do mesmo ano iniciou o Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento, também na Universidade Estadual de Maringá.

SUMÁRIO

Resumo.....	viii
Abstract	x
1. Introdução.....	1
2. Revisão da literatura.....	5
2.1. <i>Bombyx mori</i>	5
2.2. Baculovirus no cultivo de <i>B. mori</i>	7
2.3. Análise do polimorfismo genético de <i>B. mori</i>	10
2.4. Melhoramento genético de <i>B. mori</i>	12
3. Material e métodos	16
3.1. Material biológico	16
3.2. Caracterização biológica	16
3.3. Extração de DNA genômico	17
3.4. Análise qualitativa e quantitativa do DNA	18
3.5. Perfil RAPD	19
3.6. Clonagem, sequenciamento e busca de homologia.....	20
4. Resultados e discussão	22
4.1. Caracterização biológica	22
4.2. Marcadores moleculares.....	26
4.2.1. Variabilidade genética	26
4.2.2. Análise de produtividade	29
4.2.3. Análise de resistência ao vírus da poliedrose nuclear	31
4.2.4. Análise das seqüências das bandas polimórficas.....	36
5. Conclusões	41
6. Referências bibliográficas.....	42

RESUMO

ZANATTA, Daniela Bertolini. M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, Novembro de 2006. Identificação de marcadores RAPD para polimorfismo, resistência e suscetibilidade em linhagens de *Bombyx mori*. Professor orientador: Dr^a. Maria Aparecida Fernandez. Professores conselheiros: Dr^a. Claudete Aparecida Mangolim e Dr^a. Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki.

O bicho-da-seda (*Bombyx mori*) pertence à ordem Lepidóptera e é o segundo inseto mais estudado no mundo, estando atrás somente da *Drosophila melanogaster*. A sericicultura é uma atividade que compreende a criação das lagartas do bicho-da-seda pelos produtores até a fase em que há o encasulamento, a venda dos casulos para as empresas de fiação, além do cultivo da amoreira, o principal alimento do inseto. O Brasil é atualmente o 5^o país no ranking mundial dos produtores de seda, sendo responsável por aproximadamente 2,4% deste mercado, valor este que vem aumentando a cada safra, tornado a atividade ainda mais rentável para os produtores rurais. As características como produtividade e resistência a doenças são as mais cobiçadas pelos melhoristas, por estarem relacionadas com aumento no teor de seda e maior adaptabilidade às condições do campo, assim linhagens que apresentem essas características são candidatas a participarem dos programas de melhoramento genético da espécie visando à produção de um híbrido de alta qualidade. Os estudos de polimorfismo em *B. mori* são de grande importância para tais programas, pois auxiliam na caracterização das linhagens puras e de seus híbridos, facilitando o alcance de seus objetivos. Os marcadores moleculares são importantes ferramentas para esses estudos, destacando-se os marcadores de polimorfismo de DNA amplificados ao acaso (RAPD) que são capazes de detectar polimorfismos intraespecíficos. A Universidade Estadual de Maringá (UEM), conta hoje com um banco genético do bicho-da-seda, sobre o qual pouco ainda é conhecido, dessa forma, sua caracterização é imprescindível. Com a finalidade de se iniciar um trabalho neste sentido, dezesseis linhagens parentais do bicho-da-seda, de origens chinesa e

japonesa, contidas neste acervo foram analisadas tanto quanto a parâmetros biológicos de interesse para a sericicultura, como alguns caracteres genéticos relacionados com produtividade e resistência a infecção por vírus, os quais foram obtidos através de marcadores do tipo RAPD. A análise das seqüências de segmentos polimórficos no genoma dessas linhagens permitiu identificar prováveis segmentos no genoma envolvidos na resistência de *B. mori* à infecção viral. De acordo com os dados levantados, foram identificadas as linhagens candidatas à obtenção de híbrido comercial a partir desse banco de germoplasma.

Palavras-chave: *Bombyx mori*, bicho-da-seda, caracterização biológica, RAPD.

ABSTRACT

ZANATTA, Daniela Bertolini. M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, November, 2006. Identification of RAPD markers for polymorphism, resistance and susceptibility in *Bombyx mori*. Adviser: Dr. Maria Aparecida Fernandez. Co-Advisers: Dr. Claudete Aparecida Mangolim And Dr. Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki..

The silkworm (*Bombyx mori*) belong to the order Lepidoptera and is the second insect more studied in the world, been behind only of the *Drosophila melanogaster*. The sericulture is an activity that comprises the silkworm raise by the farmers until the phase where the cocoon spinning and the sale of those for the thread companies, it also includes mulberry trees cultivation, the main food of this insect. At present, Brazil is the 5^o country in the world ranking of the silk producers, been responsible for approximately 2.4% of this market, value that has been increasing every crop, making this activity more rentable for rural producers. Productivity and resistance to diseases are the most desired characteristics by the silkworm breeders, because it has been associated with increases in the silk content and higher adaptability to the field conditions, so strains that show these characteristics are candidate to participate of genetic breeding programs of the specie aiming a high quality hybrid production. Polymorphism study in *B. mori* is of great importance for those programs, because it helps the characterization of pure strains and their hybrids, facilitating the reach of their objectives. Molecular markers are important tools for these studies, highlighting the Random Amplified Polymorphic DNA marker (RAPD) that is capable of to detect intraespecific polymorphism. The Universidade Estadual of Maringá (UEM), holds today a genetic bank of silkworm, about which little is known, so your characterization is essential. For initiate a study in this way, sixteen silkworm parental strains, of Chinese and Japanese origin, maintained in this collection were analyzed as biological characters of interest for the sericulture, as some associated genetics characters with productivity and virus infection resistance through RAPD markers.

The sequence analysis of the detected polymorphic segments from the strains identified putative genomic segments required for virus resistance. According to these data, were identified the candidate strains to obtain a commercial hybrid from this germplasm bank.

Keyword: *Bombyx mori*, silkworm, biological characterization, RAPD.

1. INTRODUÇÃO

A sericicultura é uma atividade que iniciou a milhares de anos atrás na China e hoje possui grande importância para o setor Agroindustrial mundial, inclusive do Brasil, contribuindo para o desenvolvimento sustentável do país. A atividade inclui o cultivo da amoreira, a produção dos ovos do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.), criação das lagartas até a produção dos casulos e, finalmente, fiação e confecção da seda por parte do setor industrial. Como as lagartas se alimentam exclusivamente de folhas de amoreira (*Morus* sp.), a atividade sericícola se destaca pelo seu baixo impacto ambiental (Fernandez *et al.*, 2005).

Existem 400-500 espécies de lepidópteros produtores de seda, mas apenas 8 a 9 espécies são comercialmente cultivadas, dentre estas *B. mori* é responsável por 99% da produção mundial de seda (Dingle *et al.*, 2005). Estima-se que mais de 3000 genótipos, ou linhagens, do bicho-da-seda tenham sido desenvolvidos e mantidos na Ásia e Europa, diferindo entre si, principalmente quanto às suas preferências ambientais e ao número de gerações que podem ser obtidas anualmente. Além dessas características, as linhagens de bicho-da-seda também podem ser diferenciadas quanto à produção de ovos, taxa de crescimento das larvas, tamanho e forma do casulo e comprimento e resistência do fio de seda.

A seda é uma fibra natural, antialérgica e de alto valor comercial que reúne características únicas como brilho, suavidade e textura, considerada adequada a todos os climas, pois é má condutora de calor e quando misturada com outros fios, produz tecidos mais resistentes que o homem não pôde igualar com fibras sintéticas. A produção de seda é voltada para o mercado internacional o qual é dividido quase que equitativamente entre a comercialização dos fios, tecidos e roupas de seda, mas está principalmente relacionada a pequenos produtores rurais, que utilizam intensa mão de obra familiar, contribuindo para a diversificação da renda familiar. No Brasil as condições climáticas são favoráveis ao cultivo tanto da amoreira quanto do inseto, fazendo com que a produção de casulos seja considerada uma boa alternativa

para os produtores.

A cadeia produtiva brasileira da seda envolve produtores, empresas e o governo de alguns estados. As indústrias de fiação distribuem mudas de amoreiras e lagartas do bicho-da-seda no 3º ínstar para os produtores que vendem os casulos ao setor empresarial. A participação dos estados está na forma de financiamento, com a disponibilização de crédito aos produtores, possibilitando a atividade sericícola.

Mais de trinta países produzem a seda comercialmente, destacando-se a China como principal país produtor de seda crua, responsável por aproximadamente 75% da produção mundial, gerando um valor de 1,6 bilhões de dólares. Em segundo lugar está a Índia (15%), seguida da Coréia e Turcomenistão (país pertencente à antiga URSS) que produzem menos de 5% cada e no quinto lugar se encontra o Brasil produzindo aproximadamente 2,4% (Dingle *et al.*, 2005). Apesar de a China dominar este mercado, sua seda é considerada de qualidade pior que a brasileira. Hoje o Brasil é um país essencialmente exportador, consumindo perto de 5% da seda que produz, tendo o Japão como um dos principais compradores (Global 21 Notícias – <http://www.global21.com.br> – acesso: 16/11/2006).

O estado do Paraná, em 2006, foi responsável por 88,69% da produção nacional de casulos destinada integralmente à exportação, pouco menos que na safra anterior, quando a participação paranaense foi de 89,63%. (O Estado do Paraná – <http://www.parana-online.com.br> – acesso: 12/11/2006).

Na safra 2004/2005 foram produzidos pelo estado 6.405 toneladas de casulo gerando R\$ 39.122.270,00 e estavam envolvidos na atividade sericícola do estado 213 municípios, compreendendo 5.089 criadores num total de 5.501 barracões, com a participação de 16.503 pessoas (SEAB - <http://www.pr.gov.br/seab> – acesso 03/12/2005). Enquanto que na safra 2005/2006 o número de municípios envolvidos com a sericultura aumentou para 231 e o número de criadores foi de 6.462, 27% mais que na safra anterior. Além disso, a produção de casulos teve um acréscimo de 11,5% no volume da produção anterior, produzindo 7.141 toneladas de casulos e o preço pago ao produtor teve um aumento de 3,16%, gerando uma receita de R\$ 45 milhões, considerando toda a cadeia agroindustrial. O aumento na produtividade

desta última safra (35%) deve-se às melhores condições climáticas e às melhorias no manejo do bicho-da-seda e nas variedades da amoreira usadas em sua criação (O Estado do Paraná – <http://www.parana-online.com.br> – acesso: 12/11/2006).

Um dos maiores problemas que ameaçam a sericicultura no Brasil e no mundo são as doenças causadas por diversos patógenos como protozoários, vírus, bactérias e fungos, que podem infectar o bicho-da-seda durante seus diferentes estágios do ciclo de vida, às quais o inseto é altamente suscetível. Boa higienização e desinfecção podem manter as áreas de criação limpas, mas não podem impedir a entrada do agente infeccioso.

Os protozoários causadores de injúria no bicho-da-seda pertencem aos gêneros *Nosema*, *Pleustophora*, e *Thelohania*. Além desses, *Trypanosoma* sp e *Leptomonas* sp também tem sido encontrados em infecções do inseto. A principal doença causada por protozoário é a pebrina acarretada por *Nosema bombycis*. As doenças de origem viral podem ser consideradas como as mais importantes, sendo quatro os tipos conhecidos: poliedrose nuclear (baculovírus), poliedrose citoplasmática (cytovírus), flacidez infecciosa (vírus F) e densovirose (parvovírus) (Sengupta *et al.*, 1990).

As doenças bacterianas de *B. mori* são chamadas de *flacherie*, pois causam flacidez do corpo da lagarta. Elas são divididas em três grandes grupos chamados de septicemia bacteriana, doenças bacterianas do trato digestivo e toxicose bacteriana, nos quais *Bacillus thuringiensis* pode ser reconhecido como principal agente infeccioso. As doenças fúngicas são chamadas de muscadinoses, ou calcinoses, e aspergiloses (Zanetti, 2005a).

Algumas pragas também podem atacar as criações de bicho-da-seda, trazendo sérios danos para os casulos, pupas e lagartas. Entre estas pragas destacam-se as moscas *Kyoso*, *Tachina* e *Uzi*, o Ácaro da Sarna de Palha e o Besouro do Casulo. A sericicultura é suportada pelos recursos de diversidade gênica do bicho-da-seda e os avanços são baseados no melhoramento de novas linhagens utilizando-se os recursos de seu rico banco de germoplasma (Zanetti, 2005a).

Portanto, a introgressão de genes para resistência, através de programas de melhoramento com o bicho-da-seda, é um caminho adequado para diminuir os problemas gerados por tais infecções. Através da seleção direta de linhagens de *B. mori* que sejam resistentes a doenças, somados com características que melhorem sua produtividade, é possível obter através de cruzamentos entre linhagens um híbrido elite, possuidor de características essenciais para produção de qualidade e resistência à patógenos. Para isto, as grandes coleções de mutantes e linhagens melhoradas de bicho-da-seda, cuidadosamente mantidas nos acervos de germoplasmas, são recursos valiosos que apenas estão começando a serem exploradas em seu completo potencial.

No Brasil, até o ano de 2005 as linhagens de *B. mori* eram exclusivamente de domínio das empresas de fiação, quando uma das empresas que atuavam no setor na cidade de Maringá, localizada no estado do Paraná, retirou-se do mercado, doando todo o seu acervo genético de bicho-da-seda para a Universidade Estadual de Maringá (UEM). Portanto, essa proposta tem por finalidade a caracterização genética desse acervo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *BOMBYX MORI*

A domesticação do bicho-da-seda ocorreu por volta de 2700 a.C. na China, provavelmente a partir da linhagem selvagem *Bombyx mandarina* (Dingle *et al.*, 2005). Foi propagado em larga escala e utilizado para a produção de seda na China, Japão e Europa, chegando ao Brasil apenas no ano de 1740 (Inceoglu *et al.*, 2001). Devido ao seu antigo processo de domesticação as lagartas não conseguem se alimentarem em seu ambiente natural, necessitando que o alimento seja levado até elas pelo homem e as mariposas, por possuírem asas e aparelho mastigatório degenerados, não podem mais voar ou se alimentar.

O bicho-da-seda é hoje um organismo modelo em estudos científicos, devido as suas características de fácil manuseio e criação, que apresenta grande importância econômica, pois o produto de secreção de suas glândulas sericígenas, uma proteína filamentosa que origina o fio da seda, tem alto valor para a indústria.

As pesquisas com este inseto iniciaram-se antes de 1900 sob o patrocínio da indústria da seda e, em 1930, vários estudos genéticos já haviam sido reportados. Hoje são conhecidas mais de 500 mutações (Nagaraju, 2000) que afetam diversos aspectos do organismo, como morfologia, desenvolvimento, comportamento e, sobretudo, as características consideradas de importância econômica (Nagaraju e Goldsmith, 2002).

A caracterização molecular dos elementos repetitivos de *B. mori*, revelou a presença de elementos transponíveis, retrotransposons, SINEs (*Short Interspersed Elements*) e LTRs (*Long Terminal Repeats*). Foram caracterizados, também, motivos de DNA telomérico (TTAGG), genes homeobox e um grande número de seqüências gênicas que codificam proteínas com diversas funções (Nagaraju, 2000) e mais de 180.000 ESTs (*Expressed Sequence Tags*) tem sido identificados no genoma do bicho-da-seda (GenBank, Setembro de 2006).

Em 2000, após 12 anos de trabalho, duas equipes francesas, uma do Centro Nacional de Pesquisas Científicas (CNRS) e outra do Instituto Nacional de Pesquisas Agronômicas (INRA) de Lyon (em colaboração com grupos japoneses e americano) conseguiram o transgênico do bicho-da-seda através de transformação por um vetor contendo o transposon piggyBac (Toshiki *et al.*, 2000). O vetor tem se mostrado eficiente para inserir genes exógenos no patrimônio genético do inseto, podendo ser útil tanto para a produção de seda como para a indústria farmacêutica, na síntese de substâncias protéicas (colágeno, elastina e outros) e como fonte de biomateriais (Tamura *et al.*, 2000).

Em agosto de 2002, um consórcio genômico internacional foi criado (http://papilio.ab.a.u-tokyo.ac.jp/lep-genome/new_lepgenome.htm acesso 10/2006) para promover a cooperação no seqüenciamento de *B. mori* e de outros lepidópteros de interesse econômico. No segundo semestre de 2004, foram publicados os primeiros rascunhos das seqüências genômicas do bicho-da-seda que cobriram mais de 90% de todos os genes conhecidos para este inseto (Mita *et al.*, 2004; Xia *et al.*, 2004).

O bicho-da-seda pode ser classificado de acordo com sua distribuição geográfica como de origem japonesa, chinesa, européia ou indiana (Krishnaswami *et al.*, 1979), ou de acordo com o voltinismo (número de criadas realizadas anualmente). As linhagens univoltinas ou bivoltinas são geralmente temperadas, cujo comprimento do filamento de seda está acima de 1000-1500 metros, sendo consideradas melhores produtoras. Já as linhagens multivoltinas são tropicais e, em geral, são piores produtoras de seda, com comprimento do filamento de seda em torno de 600 metros. Assim, o valor comercial dos casulos produzidos pelas univoltinas e bivoltinas é maior que o das multivoltinas. Uma outra forma de classificá-lo é pelo número de ecdises realizadas pela lagarta, que podem ser em número de três (ciclo larval curto), quatro (ciclo larval médio) ou cinco ecdises (ciclo larval longo). A maioria dos sericultores brasileiros utiliza híbridos originados de cruzamentos entre as linhagens da origem japonesa e chinesa da espécie *B. mori* de ciclo uni e bivoltino (Zanetti, 2005b).

O bicho-da-seda apresenta um ciclo de vida típico de Lepidoptera, com quatro fases distintas, isto é, ovos, larva, pupa e, se finalizada a metamorfose, adulto (Watanabe *et al.*, 2000). Na fase larval apresentam, em geral, quatro ecdises com cinco ínstaes. Durante as ecdises entram em estado de repouso, cessam a alimentação e trocam de tegumento. O bicho-da-seda se alimenta apenas na fase larval e tem uma dieta herbívora, alimentando-se exclusivamente de folhas de amoreira fresca. A larva aumenta quase que setenta vezes seu tamanho original, ocupando quatro vezes mais o espaço inicial. Ao final do 5º ínstar, a larva pára de se alimentar, inicia a fiação do casulo e se converte em pupa que, mais tarde, se transformará em uma mariposa.

Os casulos são formados pela fibroína e sericina, produto de secreção da glândula sericígena. A fibroína endurece em finos fios de seda, juntamente com a sericina que é responsável por consolidar os fios de seda (Carradello, 1987). Uma terceira categoria de proteínas, constituintes do casulo, foi caracterizada molecularmente nos lepidópteros *Galleria mellonella* e *B. mori*, sendo denominadas seroína 1 e seroína 2. Essas proteínas atuam como agentes antimicrobianos protegendo o casulo de fungos e bactérias (Zurovec *et al.*, 1998).

2.2. BACULOVIRUS NO CULTIVO DE *B. MORI*

As perdas nas culturas de bicho-da-seda são principalmente atribuídas à ocorrência de doenças, e não às condições ambientais desfavoráveis que resulta em uma colheita de folhas de amora de má qualidade (Watanabe, 1986). Desta forma, a prevenção de doenças é um dos aspectos mais importantes no sucesso da sericultura comercial. Desinfecção dos barracões de criação e utensílios antes do início da criação é geralmente recomendado, mas não é necessariamente adequado para prevenir a ocorrência de doenças. Entretanto, juntamente com uma boa higienização, o uso de *B. mori* resistente a doenças deve ser um passo futuro na direção de uma prevenção de doenças mais efetiva.

De todas as doenças que causam danos à criação do bicho-da-seda, as de origem viral são as mais graves, sendo responsáveis por quase 70% da perda da produção, representando um sério problema para a sericicultura mundial (Sengupta *et al.*, 1990; Brancalhão, 2002a).

O vírus da poliedrose nuclear (NPV) é um patógeno altamente infectivo que causa uma das mais sérias doenças virais, pois produz estruturas de resistência que são capazes de persistirem por um longo período de tempo no meio ambiente, causando a morte rápida das lagartas infectadas, não existindo cura até o momento. Por este motivo, uma vez identificada a presença da doença na criação, se faz necessária a eliminação de todas as lagartas do barracão contaminado.

Os NPVs pertencem a família Baculoviridae e possuem DNA envelopado e circular de fita-dupla com 88-180 kb de tamanho. Os baculovírus são importantes patógenos de artrópodes, infectando predominantemente insetos holometábolos, particularmente os da ordem Lepidoptera, e são específicos ao estágio larval de seus hospedeiros (Inceoglu *et al.*, 2001).

Os baculovírus ocorrem em dois tipos morfológicos distintos. Um destes tipos é representado pela forma envelopada do vírus (*budded*) que consiste de um único nucleocapsídeo rodeado por um envelope lipídico e é o responsável pela disseminação sistêmica da infecção que ocorre entre as células de um inseto. A outra forma, chamada vírus encapsulado (*occluded*), é responsável pela transmissão horizontal da doença (inseto para inseto), sendo infecciosa apenas se ingerida pelo hospedeiro. Nesta forma morfológica, múltiplos nucleocapsídeos se encontram embedidos em uma matriz cristalina composta por, quase exclusivamente, de uma proteína chamada poliedrina, formando os poliedros que protegem os vírus contra os danos ambientais e beneficia a entrega do vírus infeccioso ao hospedeiro suscetível (Inceoglu *et al.*, 2001; Je *et al.*, 2001).

Contudo, os baculovírus podem ser altamente benéficos, uma vez que não infectam homens ou plantas, podendo ser utilizados no controle biológico de várias espécies pragas como no caso da *Anticarsia gemmatalis*, uma das principais pragas da soja na cultura brasileira (Ribeiro e Pinedo, 2001). Além disso, são considerados

excelentes vetores para expressão de proteínas, aplicados em pesquisa básica e na medicina (Inceoglu *et al.*, 2001; Brancalhão *et al.*, 2002b).

Esses vírus são espécie específica, sendo o baculovírus que infecta o bicho-da-seda denominado *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (BmNPV), cujo genoma de 130 kb, totalmente sequenciado (Gomi *et al.*, 1999), tem a capacidade de codificar mais de 100 genes diferentes. Originalmente isolado por Bergold em 1947 (Gomi, 1999), a primeira observação notificada do BmNPV no Brasil foi feita por Gatti *et al.* (1976), nas culturas híbridas do bicho-da-seda no estado de São Paulo. No estado do Paraná, a primeira descrição do vírus foi realizada por Brancalhão (2002a). Este isolado é considerado um gênero altamente virulento, pois possui um poliedro característico englobando nucleocapsídeos múltiplos (M) envelopados individualmente, em par ou grupo de três, tendo recebido o nome de BmMNPV.

A contaminação por NPV, no bicho-da-seda, se dá através da ingestão de partículas virais contidas nas folhas de amoreira usadas em sua alimentação. Quando a lagarta é infectada nas primeiras idades pode morrer entre 1 e 2 dias após a ingestão do patógeno, mas quando a infecção ocorre após a terceira idade, os sintomas não são observados até o sexto dia de incubação (Ikuno *et al.*, 2004; Cianciarrulo *et al.*, 1977). Os primeiros sinais de disfunção metabólica são: perda de apetite, mudanças no comportamento da lagarta e na cor do tegumento (Adams e McClintock, 1991; Bilimoria, 1991), podendo ser observadas manchas amareladas no tegumento da lagarta infectada (Smith, 1967), e manchas pretas na superfície corporal da pupa que surgem um pouco antes de sua morte (Ikuno *et al.*, 2004). Quando a infecção ocorre nas últimas idades, as lagartas infectadas podem sobreviver até completarem a metamorfose (Tinoco, 2000).

A morte ocorre pela liquefação e desintegração dos tecidos internos seguidos pela quebra da cutícula, que é fina e frágil, liberando os fluídos corporais contendo milhares de poliedros (Tinoco, 2000). Cada lagarta pode produzir até 1×10^9 corpos de oclusão viral (poliedros) (Adams e McClintock, 1991). Em algumas infecções por baculovírus, o estágio larval é prolongado o que beneficia a reprodução viral (Tanada e Kaya, 1993).

A variedade mais virulenta do NPV pode causar a morte do hospedeiro em 2 a 5 dias após a infecção, enquanto que as menos virulentas demoram de 2 a 3 semanas (Granados e Williams, 1986). As lagartas de *B. mori* infectadas com o vírus morrem em um período de 4 a 7 dias, sendo que a morte daquelas infectadas nos primeiros estágios do desenvolvimento larval leva de 4 a 5 dias e nas mais velhas entre 5-7 dias, aproximadamente (Sengupta, 1990).

A virulência do isolado geográfico BmMNPV é caracterizada pelo curto intervalo de tempo para a manifestação dos sintomas, que ocorre a partir do quinto dia pós-inoculação e causam até 80% das mortes das lagartas no final do experimento. As lagartas sobreviventes tecem um casulo de baixa qualidade e, em sua maioria, morrem durante o estágio de pupa (Brancahã, 2002a).

2.3. ANÁLISE DO POLIMORFISMO GENÉTICO DE *B. MORI*

O polimorfismo genético de *B. mori* tem sido detectado através de diversos marcadores moleculares cujo mapeamento no seu genoma tem permitido o conhecimento do padrão de herança (homozigose e heterozigose) e a distância genética entre as diferentes linhagens cultivadas ao redor do mundo (Goldsmith *et al.*, 2005).

A partir de estudos de polimorfismo em *B. mori*, os programas de melhoramento genético serão auxiliados na caracterização das linhagens puras e de seus híbridos, facilitando o monitoramento para a obtenção de um híbrido elite, que apresente as melhores características para a produção e sobrevivência no campo (Fernandez *et al.*, 2005).

Dentre os marcadores moleculares destaca-se o RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA* (Williams *et al.*, 1990), um importante marcador capaz de revelar polimorfismos de DNA entre indivíduos geneticamente relacionados. A técnica tem sido amplamente utilizada na construção de mapas de ligação, fingerprinting e seleção assistida por marcadores para melhoramento das linhagens (Nagaraju, 2002).

O RAPD é um marcador dominante que envolve a amplificação de fragmentos do DNA genômico através de um primer único de seqüência curta, aleatória e com uma quantidade mínima de C+G de 50%, que amplifica repetições invertidas curtas espalhadas pelo genoma. A reação de amplificação é realizada com baixa estringência, sendo a temperatura de anelamento de 37-40°C, permitindo a amplificação de seqüências que não sejam totalmente complementares à seqüência do primer. O polimorfismo gerado pelo marcador é verificado pela comparação da presença ou ausência de produtos de amplificação específicos entre os diferentes indivíduos analisados.

Diversos estudos têm utilizado este marcador para caracterizar *B. mori*. Utilizando as linhagens parentais C108 e p50, Promboon *et al.* (1995) construíram um mapa de ligação por RAPD para o bicho-da-seda. As gerações F1 e F2 dessas mesmas linhagens foram utilizadas Yasukochi (1998), que construiu um denso mapa de ligação para o inseto. Esse mapa abrangeu 1018 marcadores genéticos e utilizou 7757 combinações de primers sendo primeiro mapa de ligação com cobertura de cromossomos (n=28) em insetos.

A técnica RAPD foi usada por Nagaraja e Nagaraju (1995) para examinar a variação genética em 13 genótipos altamente divergentes de bicho-da-seda. Neste estudo, dos 40 primers testados, 2 foram selecionados como marcadores do genótipo diapausa e 3 como marcadores do genótipo não-diapausa, um fenômeno especial que ocorre entre os insetos para evitar as condições ambientais desfavoráveis. As linhagens que não entram em diapausa, são aquelas adaptadas ao clima tropical e com baixo rendimento de seda, já as linhagens que entram em diapausa são melhores adaptadas ao clima temperado e sua seda tem um maior rendimento, além de ter melhor qualidade.

Vários projetos têm buscado marcadores moleculares que estejam intimamente relacionados com características importantes para a sericicultura. Dentre estes, marcadores RAPDs, localizados nos locos *nsd-1* (Abe *et al.*, 1995) e *nsd-2* (Abe *et al.*, 2000), foram relacionados com a resistência do bicho-da-seda ao *densonucleosis virus*. Uma estratégia similar foi usada na identificação de um outro

importante patógeno do bicho-da-seda, o vírus da poliedrose nuclear – NPV (Yao *et al.*, 2003). Primers RAPD também foram utilizados para investigar a associação existente entre marcador molecular e crescimento, com influência aos atributos de rendimento para melhorar a produção de casulos pelo bicho-da-seda e, conseqüentemente, de seda (Chatterjee e Pradeep, 2003). Progressos têm sido realizados quanto a correlação de marcadores RAPDs com QTLs para algumas características como número de casulo e taxa de crescimento larval e pupal (Chatterjee e Mohandas, 2003). Marcadores moleculares tipo RAPD associados à resistência a fluoretos (Chen *et al.*, 2003) também foram identificados.

Marcadores RAPD e SSR foram usados para estudar o intervalo de tempo compreendido pelo desenvolvimento larval de uma linhagem em particular de *B. mori* (*Nistari*), utilizada na Índia em escala comercial por apresentar uma grande resistência a patógenos. No estudo foram analisadas 4 gerações resultantes de autocruzamentos, sendo que os marcadores se mostraram polimórficos para ciclo longo e ciclo curto. Estes marcadores foram completamente ausentes na terceira e quarta geração, indicando que este tipo de melhoramento pode resultar em gerações com propriedades genéticas diferentes das populações parentais (Pradeep *et al.*, 2005).

2.4. MELHORAMENTO GENÉTICO DE B. MORI

Um intensivo trabalho visando à obtenção de linhagens de bicho-da-seda melhoradas para aumento de produtividade e qualidade da seda vem sendo realizado (Datta, 1984). Estima-se que mais de 3000 genótipos de bicho-da-seda sejam mantidos na Ásia e Europa, sendo esta diversidade genética derivada dos cruzamentos entre as quatro linhagens geográficas (Nagaraju, 2000).

Embora o melhoramento clássico tenha resultado no aumento da produtividade de seda, não tem tido muito sucesso em integrar os caracteres de alto rendimento dos genótipos temperados com a resistência a doenças e ao cultivo no campo dos genótipos tropicais (Goldsmith, 1991).

Dessa forma, na produção do bicho-da-seda, é de extrema importância a identificação de mapas genéticos para caracterizar a biodiversidade e promover a obtenção de híbridos elites que apresentem alto rendimento de casulos por grama de ovo, tamanho e formato do casulo, resistência e qualidade do fio de seda.

Os híbridos comerciais podem ser obtidos através de cruzamento simples direto entre dois parentais do bicho-da-seda (A x B), em geral, linhagem japonesa cruzada com chinesa, que são mais produtivas e mais resistentes, respectivamente. O cruzamento duplo [(A x B) x (C x D)] e o cruzamento triplo [(A x B) x C] também podem ser usados (Watanabe, 1961). Os híbridos obtidos por cruzamento simples manifestam maiores taxas de vigor do híbrido quando comparado aos cruzamentos triplos e duplos. Entretanto, segundo Watanabe (2002), sob condições desfavoráveis de criação é aconselhável a utilização de híbridos obtidos por cruzamento duplo quando se deseja a prevenção de doenças e a obtenção de uma produção de casulos homogêneos, pois a expressão poligênica é mais estável devido a sua flexibilidade na constituição gênica entre a população.

Quando diferentes linhagens são cruzadas, frequentemente os descendentes possuem características balanceadas derivadas de ambos os parentais ou então eles possuem mais características de um ou de outro parental, sendo mais resistentes ao campo ou se destacam em produtividade. Este fenômeno é conhecido como heterose ou vigor do híbrido. A utilização dos princípios de vigor do híbrido para aumentar a resistência no campo e a produção, através de cruzamentos entre diferentes genótipos de *B. mori*, foi primeiramente descrita por Toyama (1906).

Apenas um pequeno número de trabalhos sobre desenvolvimento de insetos resistentes a patógenos está disponível. Uzigawa e Aruga (1966) desenvolveram linhagens de bicho-da-seda resistentes ao vírus da flacidez infecciosa após contínua seleção das lagartas sobreviventes por cinco gerações. Similarmente, Watanabe (1967) desenvolveu uma linhagem de bicho-da-seda resistente a poliedrose citoplasmática através da seleção dos sobreviventes por oito gerações. Em 1998, Eguchi *et al.* obteve sucesso no desenvolvimento de um híbrido totalmente resistente ao densovírus de *B. mori* tipo I (BmDENV I).

Como a resistência ao BmNPV é controlada por poligenes (Watanabe, 2002), genes dominantes e múltiplos genes de micro-efeito, a indução de completa resistência a este vírus em linhagens de bicho-da-seda é praticamente impossível, pois dificultam a hereditariedade da resistência entre as linhagens de *B. mori* (Chen *et al.*, 2003). Contudo, o melhoramento de linhagens comparativamente mais resistentes é possível através da contínua seleção dos sobreviventes após exposição ao vírus (Aratake, 1973), uma vez que as linhagens de bicho-da-seda apresentam diferenças marcantes quanto à resistência ao BmNPV.

Um dos processos de melhoramento das linhagens de *B. mori* com características poligênicas é a seleção para o caráter desejado pela exposição ao vírus, o que muda a frequência dos genes para a resistência viral na população causando o seu aumento (Watanabe, 2002).

Vários estudos têm sido realizados sobre características de resistência ao vírus da nucleopoliedrose, como a construção de um banco de dados ESTs. A identificação de alguns marcadores moleculares para a resistência ao NPV em *B. mori* (Yao *et al.*, 2003) e a localização de dois genes ligados a resistência ao BmNPV pela técnica de Detecção por Fluorescência Diferencial, (Xu *et al.*, 2005), auxiliam no conhecimento sobre os relevantes mecanismos de resistência. Para investigar o padrão diferencial de expressão gênica frente à infecção por BmNPV, células em cultura de *B. mori*, BmN foram utilizadas (Okano *et al.*, 2001).

Além de resistência a doenças, o uso de linhagens que se destaquem em produtividade, é de grande importância para a sericicultura. Dentre as características do bicho-da-seda que afetam a produção de seda devem ser destacadas:

- Fertilidade;
- Porcentagem de eclosão;
- Sobrevivência nos primeiros íntares larvais;
- Sobrevivência nos últimos íntares larvais;
- Duração total do período larval;
- Duração do quinto ínstar;
- Número de casulos;

- Peso do casulo;
- Peso da casca sérica;
- Peso da lagarta;
- Comprimento e resistência do filamento de seda;
- Teor de seda.

Enquanto algumas destas características são herdáveis outras são influenciadas pelos fatores ambientais (Thiagarajan *et al.*, 1993).

Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo analisar diferentes linhagens de *B. mori* existentes no banco genético na UEM. Essa caracterização foi realizada por meio de:

- caracterização biológica de parâmetros de referência relacionados à produtividade;
- obtenção de marcadores tipo RAPD associados à produtividade;
- obtenção de marcadores tipo RAPD associados à resistência e suscetibilidade ao BmNPV;
- clonagem e sequenciamento de bandas polimórficas associadas à resistência e suscetibilidade ao BmNPV;
- análise da homologia e identidade dessas seqüências em bancos de dados biológicos de seqüências expressas e do genoma de *B. mori*.

Os resultados e impactos esperados no avanço desse projeto são de caráter significativo no aspecto científico, pois nenhuma informação genética é conhecida nesse acervo de linhagem de *B. mori*. A partir de uma ampla caracterização será possível realizar cruzamentos direcionados para a produção de um híbrido elite com fins comerciais.

Informações que identifiquem genes envolvidos na resistência e produção irão refletir na fixação do homem nas pequenas propriedades rurais, proporcionando condições da sustentabilidade do núcleo familiar.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Foi realizada a análise de dezesseis linhagens parentais de *Bombyx mori* pertencentes ao banco de germoplasma da UEM, sendo metade dessas linhagens de origem chinesa (C14, C21, C24-A, C24-2, C25-B, C121-A, C122-B e C209) e a outra metade de origem japonesa (HA-A, HA-B, J1, M11-A, M12, M12-B, M18-2 e M19-2).

3.2. CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA

As dezesseis linhagens do bicho-da-seda foram analisadas em função de caracteres biológicos de grande influência genética, que estão direta ou indiretamente relacionados com a produção de seda.

Em barracão de criação, foram mantidos 2000 exemplares de cada linhagem, sob condições ambientais controladas (temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa do ar de $75 \pm 2\%$ e luz branca com fotoperíodo de 16:8 hora), sendo que cada linhagem recebeu o mesmo manejo, tanto alimentar quanto de criação.

Quando as lagartas se encontravam no 5° dia do 5° ínstar, foram coletadas 60 lagartas ao acaso de cada linhagem, em um total de três repetições.

No laboratório, as lagartas foram colocadas em sacos plásticos e levadas ao freezer -20 °C para dormência das mesmas. Realizou-se a medida do tamanho corporal da lagarta (TL) em centímetros, peso da lagarta (PL) em gramas e em seguida procedeu-se a dissecação das mesmas para retirada de suas glândulas sericígenas, determinando-se o peso em gramas de cada par de glândulas (PGS).

De cada linhagem do bicho-da-seda, 60 casulos foram coletados aleatoriamente totalizando três repetições e analisados os parâmetros: comprimento (CC) e largura do casulo (LC) em centímetros; peso da casca sérica (PCS), referente

ao peso dos casulos sem crisálida e o espólio, e peso da crisálida (PC), em gramas. O teor de seda líquido (TS) foi obtido através da fórmula: peso da casca sérica/peso do casulo X 100, sendo descontado 24%, do resultado obtido pela fórmula, referente à média de perda que ocorre na fiação. Esse dado é importante, pois é sobre o teor de seda líquida que as empresas de fiação pagam o produtor. A comparação das médias desses parâmetros entre as linhagens foi realizada pelo teste de Tukey, com 5% de significância, usando o programa Sisvar (Sistema de Análise de Variância Para Dados Balanceados - Ferreira, 1992).

3.3. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

As amostras de mistura de lagartas de cada linhagem no 1º ou 2º instares, foram previamente armazenadas à -20°C. Para amostras individuais, o DNA foi extraído a partir do par de glândulas sericígenas de lagartas de cada linhagem no 3º dia do 5º instar, armazenadas em isopropanol absoluto à -20°C. No início do protocolo de extração, tratamento diferencial foi realizado dependendo do tipo de amostra. As amostras de lagartas foram previamente maceradas em cadinho de porcelana gelado com nitrogênio líquido até a consistência de pó, que foi transferido para microtubos e então iniciada a extração do DNA genômico.

As glândulas sericígenas, por estarem armazenadas em isopropanol, foram centrifugadas a 17.000g durante 15 segundos e lavadas com NaCl 0,7%. O protocolo utilizado na obtenção do DNA genômico de ambos os tipos de amostras foi baseado no descrito por Monesi *et al.* (1998), com algumas modificações. Às amostras maceradas e de glândulas foi adicionado 1 mL de tampão de extração (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 EDTA pH 8,0; 1,5% Sarcosil; 10 mM NaCl e 1,0 mg/mL). As glândulas sericígenas foram picotadas com tesoura para a total dissolução.

Ambos os materiais foram homogeneizados e incubados à 60°C durante 3 horas, para a realização da digestão dos constituintes celulares. O lisado foi purificado com igual volume de fenol (pH 8,0), sendo homogeneizado e centrifugado por 30 minutos a 17000g. O sobrenadante foi transferido para outro

tubo, acrescentando-se, o mesmo volume de fenol/clorofórmio, numa proporção 1:1, repetindo-se o processo de homogeneização, centrifugação e transferência do sobrenadante, repetindo-se o processo, porém, acrescentando igual volume de clorofórmio.

Para a precipitação do DNA, o volume do último sobrenadante foi medido e a ele acrescentado 0,2 M de NaCl e 0,7% de isopropanol ao volume final. Esta solução foi imersa em nitrogênio líquido e centrifugada a 17000g, a 4°C e por 40 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70%, seco a temperatura ambiente, ressuscitado em TE (1,0mM de Tris-HCl pH 7,4 e 0,1mM de EDTA pH 8,0), adicionado RNase A (50 µg/mL) e incubado a 37°C, por 30 minutos. Em seguida o DNA foi extraído com fenol/clorofórmio e clorofórmio, precipitado, ressuscitado em 200 µl de TE e armazenado a -20 °C.

3.4. ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DO DNA

A quantificação do DNA extraído de cada amostra foi realizada em gel de agarose 0,7% através de comparação com DNA de fago lambda clivado com a enzima de restrição *HindIII* (λ *HindIII*), cuja concentração é conhecida. Para a eletroforese, utilizou-se o tampão TBE 1X (45mM Tris-borato, 1mM EDTA pH 8,0), tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol e 30% de glicerol) e o agente intercalante brometo de etídeo (0,01mg/mL). A documentação foi feita em sistema UVP BioImaging System sob transiluminador de UV.

Antes da amplificação, os DNAs quantificados foram submetidos a diluição com TE de modo a ficarem todos na concentração de trabalho de 5 ng/µl e foram novamente quantificados em gel de agarose 0,7% para certificação de que a concentração desejada foi obtida. Este procedimento foi repetido o número necessário de vezes para a obtenção da diluição do DNA a 5 ng/µl.

Estas são etapas importantes para a obtenção da concentração adequada de DNA de qualidade, pois DNA com contaminantes, degradado ou com concentração inadequada prejudicam a definição e posterior análise das bandas eletroforéticas

(*locos* RAPD). A não observância desses parâmetros consiste em uma das causas mais frequentes de fracasso no processo de RAPD (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

3.5. PERFIL RAPD

Para geração do perfil RAPD das linhagens de bicho-da-seda selecionadas, foram utilizados os primers OPA-18 (5'-AGGTGACCGT-3') e OPY-11 (5'-CTGATGCGTG-3'), Operon Technologies, e UBC89 (5'-GGGGGCTTGG-3') e UBC91(5' - GGGTGGTTGC -3'), University of British Columbia (UBC).

Os primers OPA-18 e OPY-11 foram descritos por Yao *et al.* (2003) como marcadores ligados à resistência e suscetibilidade ao vírus da poliedrose nuclear, respectivamente. Já os primer UBC89 e UBC91 foram descritos por Chatterjee e Pradeep (2003) e seus polimorfismos foram relacionados com a duração do ciclo larval, podendo essa característica ser associada a parâmetros de rendimento de teor de seda nos casulos.

A amplificação por PCR foi executada em uma mistura de reação com volume final de 20 µl contendo 10x tampão de *Taq* polimerase (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% (v/v) glicerol, estabilizantes) (Invitrogen), 0,75 mM MgCl₂, 200 µM de dNTPs e 1,25 µM de primer, 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 20 ng de DNA genômico. A reação foi realizada em termociclador Mastercycler gradiente (Eppendorf) sob as seguintes condições: 38 ciclos e extensão final de 72°C por 10 min, sendo que cada ciclo consistiu de denaturação por 94°C durante 30s, 38°C por 60s e 72°C por 120s, para os primers da Operon Technologies, e 40 ciclos de 94°C por 60s, 36°C por 60s e 72°C por 120s, precedidos por denaturação inicial de 93°C por 120s e seguidos de extensão final de 72°C por 10 min, para os primers UBC.

Os produtos da reação de PCR foram visualizados em géis de agarose 1,5%, ou em géis de poliacrilamida 6%. Os géis de poliacrilamida foram submetidos a uma pré-corrida durante a noite com tampão TBE 1X contendo brometo de etídeo a uma concentração final de 0,1mg/mL. As amostras foram preparadas com tampão

de amostra contendo 0,01mg/mL de brometo de etídio e acondicionadas a 4°C pelo mesmo período da pré-corrída. A corrida eletroforética visando à separação dos fragmentos obtidos pela reação de amplificação, foi realizada a 140 v por cerca de 7 horas, após a qual, os géis foram corados com brometo de etídeo a 0,01 mg/mL. Os demais produtos de amplificação foram separados em géis de agarose 1,5%, sendo que após a migração dos fragmentos, todos os géis foram fotografados em sistema UVP BioImaging System sob transiluminador de UV.

As reações de amplificação foram repetidas pelo menos duas vezes e as bandas reprodutíveis selecionadas para a análise quanto a presença (1) ou ausência (0) de fragmentos polimórficos. Para análise dos dados, utilizou-se o NTSYSpc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System), versão 2.1 (Rohlf, 2001). A similaridade entre as amostras foi estimada pelo coeficiente de Jaccard, gerando a matriz de similaridade. A partir dessa matriz foi gerado o dendrograma, pelo método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average).

3.6. CLONAGEM, SEQUENCIAMENTO E BUSCA DE HOMOLOGIA

A banda específica de aproximadamente 400 pares de base (pb), obtida através da amplificação do DNA genômico da linhagem japonesa do bicho-da-seda (M11-A) com o primer OPY-11, foi recuperada de gel de agarose 1,5% utilizando-se o *MinElute Gel Extraction Kit* (Qiagen), de acordo com as especificações do fabricante. Já a banda de 800 pb, obtida a partir da reação de amplificação da linhagem chinesa C24-2 com o primer OPA-18, foi recuperada de gel de poliacrilamida 6% através da incubação a 95 °C por 20 min com o tampão de eluição (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,1% Triton X-100) de acordo com o protocolo descrito por Sanguinetti *et al.* (1994).

Os fragmentos de DNA recuperados foram submetidos a reação de PCR com os respectivos primers, sendo que o tempo de extensão final (72 °C) do ciclo de amplificação anteriormente descrito foi alterado para 30 min. O produto de amplificação foi ligado ao vetor pDrive através do protocolo do *PCR Cloning Kit*

(Qiagen). O DNA recombinante desses clones, nomeados como pBmS400 e pBmR800, foi inserido através de transformação por choque térmico na bactéria *Escherichia coli* cepa *DH5α*. Os plasmídeos foram então purificados da bactéria transformada usando o *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen), seguindo as especificações do fabricante, e uma alíquota do material obtido através deste procedimento, foi clivado com *EcoRI* para confirmação dos clones.

Para a reação de sequenciamento, foi utilizado o *DYEnamic ET Dye Terminator Kit* (Amersham-Ge) com 400–500 ng do plasmídeo e o sequenciamento foi realizado em sequenciador automático MegaBACE 1000. Foi realizado o alinhamento das seqüências obtidas com os programas Phred (Ewing et al. 1998), Phrap/Cross_match e Consed (Gordon et al., 1998) e o consenso gerado foi analisado quanto à homologia e identidade com os bancos de dados biológicos Silkbase (<http://papilio.ab.a.u-tokyo.ac.jp/silkbase/index.html>) e GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) através do programa Blastn.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA

As 16 linhagens de bicho-da-seda foram analisadas em função de caracteres biológicos de grande influência genética e que estão direta ou indiretamente relacionados com a produção de seda. Dentre essas linhagens oito são de origem chinesa (C14, C21, C24-A, C24-2, C25-B, C121A, C122B, C209) e oito de origem japonesas (HA-A, HA-B, J1, M11A, M12B, M18-2, M19-2, M102). Segundo Okino (1982), em função da sua origem geográfica, o bicho-da-seda apresenta variações nas características de ovo (cor, forma), da lagarta (resistência, tamanho, cor, voltinismo, nº de ecdises) e do casulo (forma, tamanho, cor e rendimento).

Estudos sobre atributos qualitativos e quantitativos, intrínsecos de cada raça ou linhagens, são importantes para a seleção das melhores a serem utilizadas em programas de melhoramento e de caracterização para produção de híbridos. Desta forma a caracterização de cada acesso de um banco de germoplasma, com o máximo de informações possíveis, é essencial para que os mesmos possam ser adequadamente utilizados em trabalhos futuros.

As médias de alguns caracteres biológicos de interesse para a sericicultura, que foram analisados neste estudo, como peso do casulo (PC), da casca sérica (PCS), teor de seda líquido (TS), estão apresentados no Quadro 1 e os dados de comprimento (CC) e largura do casulo (LC), de peso da glândula sericígena (PGS), peso (PL) e tamanho corporal da lagarta (TL), no Quadro 2.

No Quadro 1, ao analisar a característica peso do casulo (PC), um dos primeiros a ser considerados para a verificação do desempenho produtivo do bicho-da-seda, pôde-se observar que os casulos provenientes da linhagem japonesa HA-B, HA-A e M102 apresentaram maior peso em relação às outras linhagens e os menores valores foram apresentados pelas linhagens C14, C122-B e M19-2.

Quadro 1. Médias de peso do casulo (PC), peso da casca sérica (PCS) e teor de seda líquido (TS), para dezesseis linhagens do bicho-da-seda

Linhagem	PC (gr)	PCS (gr)	TS (%)
C14	1,254 e	0,290 d	17,599 bc
C21	1,431 bcde	0,352 bc	18,718 abc
C24-A	1,592 abc	0,372 abc	17,749 bc
C24-2	1,510 abcd	0,336 cd	16,933 c
C25-B	1,478 abcd	0,352 bc	18,103 bc
C121-A	1,432 bcde	0,371 abc	19,690 ab
C122-B	1,295 de	0,349 c	20,539 a
C209	1,395 bcde	0,314 cd	17,142 c
HA-A	1,666 a	0,419 a	19,067 abc
HA-B	1,695 a	0,408 ab	18,319 abc
J1	1,389 cde	0,339 cd	18,566 abc
M11-A	1,422 bcde	0,349 cd	18,648 abc
M12-B	1,428 bcde	0,340 cd	18,116 abc
M18-2	1,430 bcde	0,314 cd	16,708 c
M19-2	1,329 de	0,319 cd	18,247 abc
M102	1,612 ab	0,357 bc	16,835 c
Média Geral	1,4598	0,3488	18,1863
CV(%)	4,93	5,55	4,42

Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Quanto ao peso da casca sérica (PCS), uma medida mais refinada da produção de seda, nota-se que as linhagens japonesas HA-A e HA-B, apresentaram os maiores valores, sendo que o pior resultado de PCS foi observado para a linhagem C14 que também apresentou o menor valor para PC.

O valor da variável teor de seda líquido (TS) é de grande importância para as indústrias de fiação, sendo calculado no momento da comercialização do casulo como parâmetro para definição do preço do produto. As linhagens que se destacaram quanto esta característica foram as chinesas C122-B e C121-A e os menores valores foram apresentados pelas chinesas C209 e C24-2 e pelas japonesas M18-2 e M102.

Os valores de PC, PCS e TS (Quadro 1) apresentaram valores médios superiores em relação aos encontrados por Porto e Okamoto (2003) estudando 4 linhagens do bicho-da-seda, sendo os resultados obtidos pelos autores 1,36g, 0,290g e 16,53%, respectivamente. No trabalho de Porto *et al.* (2004) foi realizada a caracterização de 8 linhagens do bicho-da-seda, sendo 4 delas comuns ao trabalho

por eles anteriormente desenvolvido, sendo que as médias gerais obtidas para PC, PCS e TS foram 1,34g, 0,313g, e 16,37%, respectivamente, tendo sido bastante próximas às obtidas Porto e Okamoto (2003) e inferiores ao encontrado no presente trabalho.

Esses dados devem ser avaliados no seu conjunto, pois nem sempre os casulos mais pesados significaram um TS maior. A linhagem chinesa C122-B apresentou um PC inferior à média geral, mas em compensação mostrou o maior TS (19,69%). Tal resultado indica um maior aproveitamento da energia para a produção da fibroína e um menor armazenamento de tecido gorduroso pela pupa.

As características externas do casulo, relacionadas à sua forma, estão normalmente ligadas à origem das linhagens do bicho-da-seda. Analisando o Quadro 2, pode ser observado que as linhagens japonesas apresentaram os maiores valores de comprimento do casulo (CC), uma vez que os casulos destas linhagens possuem forma alongada, tendo-se destacado a linhagem HA-B seguida da HA-A. Já as chinesas produzem casulos esféricos ou oval e, portanto, apresentaram os maiores valores de largura do casulo (LC), tendo se destacado as linhagens C24A e C24-2. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Okino (1982) e Porto *et al.* (2004) que obtiveram a mesma caracterização para as linhagens chinesas e japonesas por eles analisadas.

Os maiores valores para peso de glândula sericígena (PGS) foram apresentados pelas linhagens japonesas M11-A e HA-A, tendo se destacado entre elas a linhagem M11-A que apresentou o mais alto valor de peso da lagarta (PL) e um dos mais altos teores de seda líquido entre as japonesas, demonstrando características biológicas e de produção de seda de referência para o melhoramento. A linhagem HA-A apresentou o menor valor de PL entre as japonesas, porém obteve valor de TS semelhante a M11-A.

Quanto ao tamanho do corpo da lagarta (TL), as linhagens chinesas obtiveram resultados mais homogêneos, enquanto os resultados apresentados pelas japonesas foram bastante heterogêneos, tendo-se destacado a linhagem M18-2. É

interessante destacar, que essa linhagem também apresentou baixos valores de PC, PCS e TS.

Quadro 2. Médias de comprimento do casulo (CC), largura do casulo (LC), peso da glândula sericígena (PGS), peso da lagarta (PL) e tamanho corporal da lagarta (TL), para dezesseis linhagens do bicho-da-seda

Linhagem	CC (cm)	LC (cm)	PGS (gr)	PL (gr)	TL (cm)
C14	2,807 d	1,913 bcd	0,473 ab	3,594 abc	6,097 b
C21	2,897 cd	1,925 abc	0,471 ab	3,449 d	6,127 b
C24-A	2,978 c	2,125 a	0,539 ab	3,530 abc	5,968 b
C24-2	2,967 cd	2,125 a	0,505 ab	3,665 abc	6,108 b
C25-B	2,915 cd	2,068 ab	0,534 ab	3,484 cd	5,913 b
C121-A	2,982 c	2,088 ab	0,447 ab	3,676 abc	6,40 ab
C122-B	2,971 cd	2,008 ab	0,418 b	3,536 abc	6,066 b
C209	2,892 cd	1,977 ab	0,479 ab	3,673 abc	6,318 ab
HA-A	3,512 ab	1,760 cde	0,555 a	3,424 d	6,085 b
HA-B	3,670 a	1,758 cde	0,442 ab	3,426 d	6,140 b
J1	3,352 b	1,647 e	0,533 ab	3,640 abc	6,218 ab
M11-A	3,383 b	1,763 cde	0,563 a	3,831 a	6,258 ab
M12-B	3,354 b	1,713 de	0,511 ab	3,527 abc	5,902 b
M18-2	3,342 b	1,642 e	0,476 ab	3,784 ab	6,678 a
M19-2	3,375 b	1,752 cde	0,536 ab	3,521 abc	6,415 ab
M102	3,430 b	1,653 e	0,545 ab	3,676 ab	6,262 ab
Media geral	3,1765	1,870	0,5012	3,590	6,184
CV(%)	1,78	3,67	8,66	3,05	2,86

Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

As características acima analisadas (PC, PCS, TS, CC, LC e PGS) desempenham importante fator na seleção de linhagens especializadas e estão relacionadas ao casulo do bicho-da-seda e, conseqüentemente, ao fio de seda obtido, sendo alvos básicos da exploração Sericícola.

As informações levantadas neste estudo permitem uma avaliação preliminar do material genético presente no banco de germoplasma da UEM e podem ser aplicadas de forma a direcionar um programa de seleção e obtenção de um híbrido comercial do bicho-da-seda.

4.2. MARCADORES MOLECULARES

4.2.1. Variabilidade genética

Os perfis RAPD dos primers OPA-18, OPY-11, UBC89 e UCB91 foram utilizados na análise da variabilidade genética das 16 linhagens do bicho-da-seda analisadas. De acordo com os resultados obtidos por Awasthi *et al.* (2004) em estudos de espécies de *Morus*, um número relativamente pequeno de primers é informativo para estimar a distancia genética com alto nível de polimorfismo.

O tamanho dos produtos de amplificação variaram entre ~180-2000 pb, com 13-25 bandas por primer. Um total de 66 fragmentos foram geradas pelos 4 primers, dos quais 56 fragmentos (83,55%) foram considerados polimórficos. O maior número de bandas (25) foi obtido com o primer OPA-18 e o menor (13) com o primer UBC89.

Foi construída uma matriz de distância genética (Quadro 3) baseada nos dados RAPD, estimada pelo coeficiente de Jaccard, com auxílio do programa NTSYSpc. A similaridade genética entre as diferentes linhagens de bicho-da-seda variaram de 0,4328 (entre C122-B e HA-A) a 0,9104 (entre C24-A e C24-2). Em geral as linhagens chinesas apresentaram altos valores de similaridade genética entre elas, bem como as linhagens japonesas quando analisadas entre si. Entretanto, os valores mais baixos de similaridade genética foram obtidos comparando-se a linhagem chinesa com a japonesa e variaram de 0,4328 a 0,7014. A ampla variação na distância genética entre as diferentes linhagens de bicho-da-seda, revelada pela técnica RAPD, reflete um alto grau de diferenciação entre as linhagens de diferentes origens.

Quadro 3. Matriz de similaridade genética entre as dezesseis linhagens do bicho-da-seda, estimada pelo coeficiente de Jaccard. A maior similaridade genética está destacada em negrito e a menor grifada.

Linhagem	C14	C21	C24-A	C24-2	C25-B	C121-A	C122-B	C209	HA-A	HA-B	J1	M11-A	M12-B	M18-2	M19-2	M102
C14	1,0000															
C21	0,8208	1,0000														
C24-A	0,8208	0,8208	1,0000													
C24-2	0,7910	0,7910	0,9104	1,0000												
C25-B	0,7910	0,7313	0,8805	0,8805	1,0000											
C121-A	0,8059	0,8358	0,7462	0,7761	0,7462	1,0000										
C122-B	0,7313	0,7313	0,7014	0,7313	0,7611	0,8358	1,0000									
C209	0,7462	0,8358	0,7164	0,7462	0,7164	0,8507	0,7761	1,0000								
HA-A	0,5522	0,5522	0,5820	0,5223	0,5223	0,5373	<u>0,4328</u>	0,4776	1,0000							
HA-B	0,5522	0,5820	0,5820	0,5820	0,5223	0,5671	0,4925	0,5074	0,8805	1,0000						
J1	0,5522	0,5820	0,6119	0,5820	0,4925	0,5970	0,5522	0,5373	0,7313	0,7910	1,0000					
M11-A	0,5522	0,5522	0,6417	0,5522	0,5522	0,5373	0,5223	0,5074	0,7611	0,7014	0,8208	1,0000				
M12-B	0,5522	0,6119	0,5522	0,5223	0,4626	0,5671	0,4925	0,5074	0,7910	0,8208	0,7611	0,7014	1,0000			
M18-2	0,6119	0,5522	0,6417	0,6119	0,5522	0,5970	0,4925	0,5373	0,7910	0,7910	0,7910	0,7313	0,7910	1,0000		
M19-2	0,6716	0,7014	0,6119	0,5820	0,5223	0,6567	0,4925	0,5970	0,7910	0,7611	0,7014	0,7313	0,8208	0,7910	1,0000	
M102	0,6716	0,6119	0,6417	0,5820	0,5522	0,5970	0,4925	0,5671	0,7313	0,6716	0,7014	0,6716	0,7611	0,7910	0,7910	1,0000

A matriz de distância genética foi graficamente representada (Figura 1) na forma de um dendrograma pelo método UPGMA, que separou as dezesseis linhagens do bicho-da-seda em 2 grupos distintos, mostrando uma correlação positiva entre as linhagens e a sua origem geográfica.

O primeiro grupo contém as linhagens de origem chinesa, que possuem maior capacidade de sobrevivência no campo, porém apresentam baixa produtividade de seda, e o segundo as linhagens de origem japonesa, que são altamente produtivas, mas apresentam capacidade de resistência a doenças e condições de cultivo reduzidas. Assim, o dendrograma gerado pelos marcadores RAPD pôde discriminar as linhagens de bicho-da-seda de acordo com seus potenciais de produção, relacionados com a origem. Estudando as diferenças genéticas entre diferentes genótipos de bicho-da-seda através da técnica RAPD, Nagaraja e Nagaraju (1995) também conseguiram agrupar as linhagens de acordo com a origem geográfica, além disso, segundo os autores, essa técnica é eficiente para agrupar as linhagens de acordo com características de rendimento, voltinismo e diferenças morfológicas.

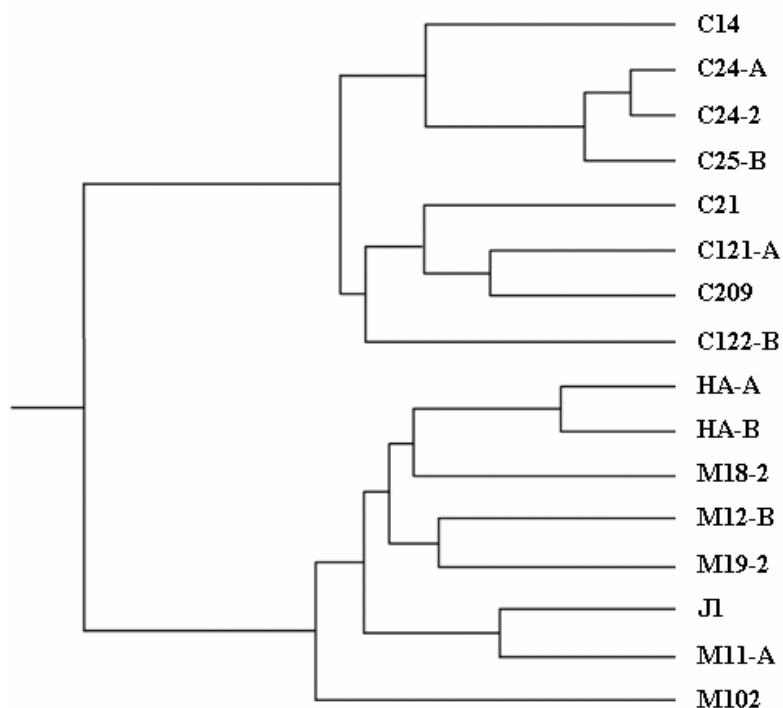


Figura 1. Dendrograma derivado da análise pelo método UPGMA, mostrando a relação filogenética entre as 16 linhagens do bicho-da-seda.

4.2.2. Análise de produtividade

Crescimento e rendimento são dois eventos interrelacionados não apenas em culturas comerciais de plantas, mas também em criações de bicho-da-seda, pois a distribuição de energia para produção de seda e ovos é dependente tanto do crescimento quanto do incremento da biomassa por parte da lagarta durante seu desenvolvimento pós-embriônico (Chatterjee e Pradeep, 2003).

Nesse sentido os primers RAPD UBC89 e UBC91, descritos como marcadores associados ao crescimento e com influência nos atributos de rendimento para uma maior produtividade de casulos pelo *Bombyx mori* (Chatterjee e Pradeep, 2003), foram utilizados no estudo molecular das 16 linhagens analisadas no presente estudo.

O primer UBC89 gera uma banda polimórfica de 1500 pb que foi associada com longa duração do período larval ($640,15 \pm 39,6$ h), contra curta duração deste período ($587,95 \pm 5,6$ h) quando a banda é ausente. A importância deste marcador está no fato de que a característica por ele detectada pode ser fortemente relacionada com altos níveis de produtividade. Quando o primer foi utilizado para amplificar o DNA genômico de lagartas de 1º ínstar das linhagens de bicho-da-seda aqui analisadas, essa banda pôde ser observada em quase todas as linhagens (Figura 2, seta) com exceção das linhagens C24-2 e HA-B, caracterizando-as como tendo ciclo larval de longa duração.

Para o primer UBC91 é descrita uma banda polimórfica de 2400 pb, cuja presença está relacionada com parâmetros de baixo rendimento e curta duração do período larval. Entretanto, no perfil de amplificação gerado por este primer não foi verificada a presença da banda polimórfica em nenhuma das linhagens de bicho-da-seda analisadas. Tal resultado era esperado, uma vez que todas as linhagens, com exceção das linhagens C24-2 e HA-B, amplificaram a banda polimórfica gerada pelo primer UBC89.

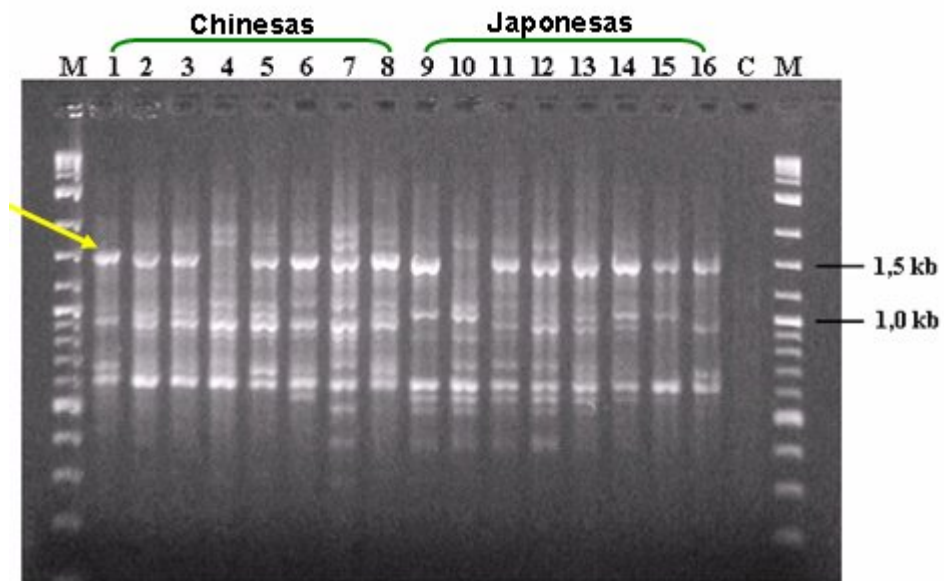


Figura 2. Perfil RAPD gerado pelo primer UBC89, para as 16 linhagens do bicho-da-seda. Gel de agarose 1,5%. 1 a 16 – C14, C21, C24-A, C24-2, C25-B, C121-A, C122-B, C209, HA-A, HA-B, J1, M11-A, M12-B, M18-2, M19-2 e M102, respectivamente; M – padrão de tamanho molecular, 2-Log – Biolabs; C – controle negativo; Seta indica a banda polimórfica de 1500pb.

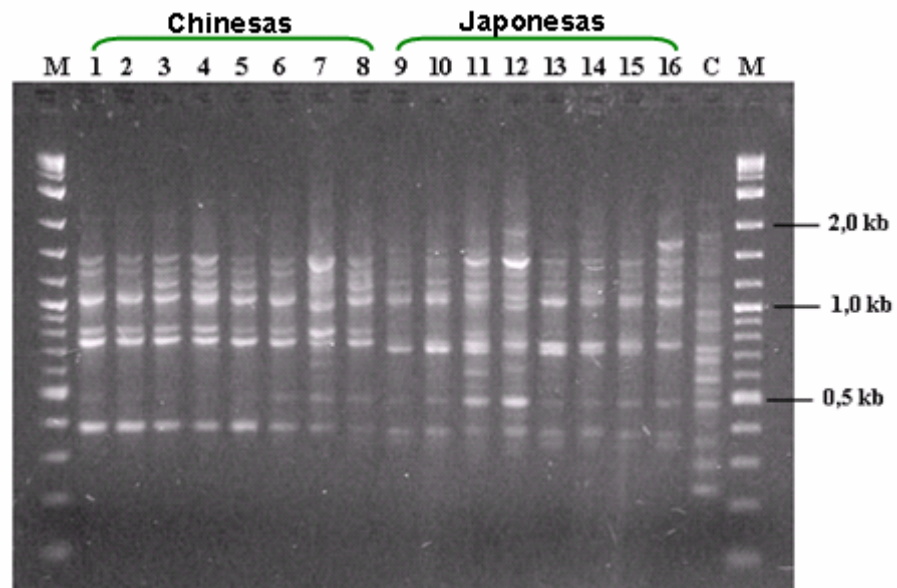


Figura 3. Perfil RAPD gerado pelo primer UBC91, para as 16 linhagens do bicho-da-seda. Gel de agarose 1,5%. 1 a 16 – C14, C21, C24-A, C24-2, C25-B, C121-A, C122-B, C209, HA-A, HA-B, J1, M11-A, M12-B, M18-2, M19-2 e M102, respectivamente; M – padrão de tamanho molecular, 2-Log – Biolabs; C – controle negativo.

As linhagens C24-2 e HA-B, além de não apresentarem a banda polimórfica gerada pelo primer UBC89, também não permitiram a amplificação da banda

polimórfica do primer UBC91, não sendo possível classificá-las como de ciclo larval longo ou curto. Entretanto, através da avaliação de seus parâmetros biológicos, como o teor de seda líquido, essas linhagens foram caracterizadas como altamente produtivas. A ausência da banda polimórfica pode ser explicada, em grande parte, por um efeito pleiotrópico aumentado dos genes relacionados (Chatterjee e Pradeep, 2003). Os mesmos autores, realizando a análise estatística de 7 parâmetros de rendimento/crescimento, não encontraram variação significativa quanto a duração do período larval entre as linhagens de bicho-da-seda por eles analisadas.

No controle negativo do primer UBC91 (Figura 3, coluna C) foi observado um bandejamento que apesar de qualquer esforço realizado (novas diluições a partir de estoque e testes de contaminação) não foi possível o seu desaparecimento. Como não ocorreu contaminação em nenhum dos outros primers utilizados no trabalho, a possibilidade de contaminação em qualquer outro reagente da PCR foi descartada. Novo lote de primer foi comprado, mas também não solucionou o problema. Nagaraja e Nagaraju (1995) também observaram a ocasional aparição de alguns produtos de amplificação em suas amostras controle sem haver a presença de qualquer DNA e se tais produtos não estavam presentes nas amostras experimentais, os autores incluíam o primer em suas análises. Então, como após diferentes reações de amplificações não foi encontrada nenhuma coincidência de bandejamento entre o controle e as linhagens analisadas, os dados deste primer foi incluído em nossas análises.

4.2.3. Análise de resistência ao vírus da poliedrose nuclear

Para identificar bandas RAPD específicas a suscetibilidade e/ou resistência ao vírus da poliedrose nuclear de *Bombyx mori* (BmNPV), como descrito por Yao *et al.* (2003), DNA genômico de linhagens individuais foram extraídos *en masse* a partir de um mínimo de 10 lagartas de 1º ínstar e utilizado como molde para as reações de PCR com os diferentes primers.

Usando o primer OPY-11, foi possível amplificar a banda RAPD específica de aproximadamente 400 pb, descrita como ligada a suscetibilidade do bicho-da-seda ao BmNPV. Esta banda esteve presente em todas as linhagens japonesas, porém não foi amplificada em nenhuma das linhagens chinesas (Figura 4).

O padrão de amplificação desta banda confirma as observações de que as linhagens japonesas, as quais são consideradas maiores produtoras de seda do que as chinesas são menos resistentes a múltiplos fatores no campo, inclusive resistência a doenças.

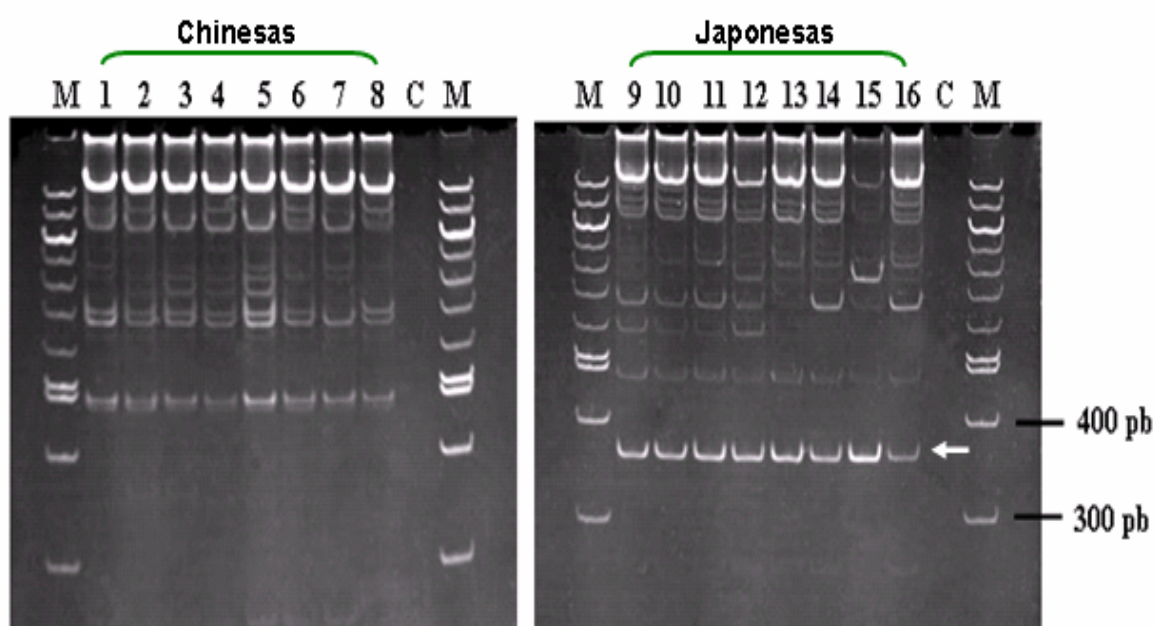


Figura 4. Gel poliacrilamida 6% mostrando o perfil RAPD geral com o primer OPY-11, amplificado a partir de DNA genômico extraído de lagartas de 1º instar. M – padrão de tamanho molecular, 100 pb – Biolabs; C – controle negativo; 1 a 16 – C14, C21, C24-A, C24-2, C25-B, C121-A, C122-B, C209, HA-A, HA-B, J1, M11-A, M12-B, M18-2, M19-2 e M102, respectivamente. Seta indica a banda específica de 400 pb.

Yao *et al.* (2003) também relataram a presença de uma banda RAPD de 700 pb obtida com o primer OPA-18, ligada à resistência do *B. mori* ao BmNPV amplificada na linhagem parental e confirmada, através de análise das gerações obtidas por retrocruzamento. A análise das 16 linhagens com esse primer, (Figura 5), não demonstrou a amplificação da banda esperada com 700 pb, bem como não foi observado nenhuma diferença significativa no padrão de bandeamento entre as linhagens.

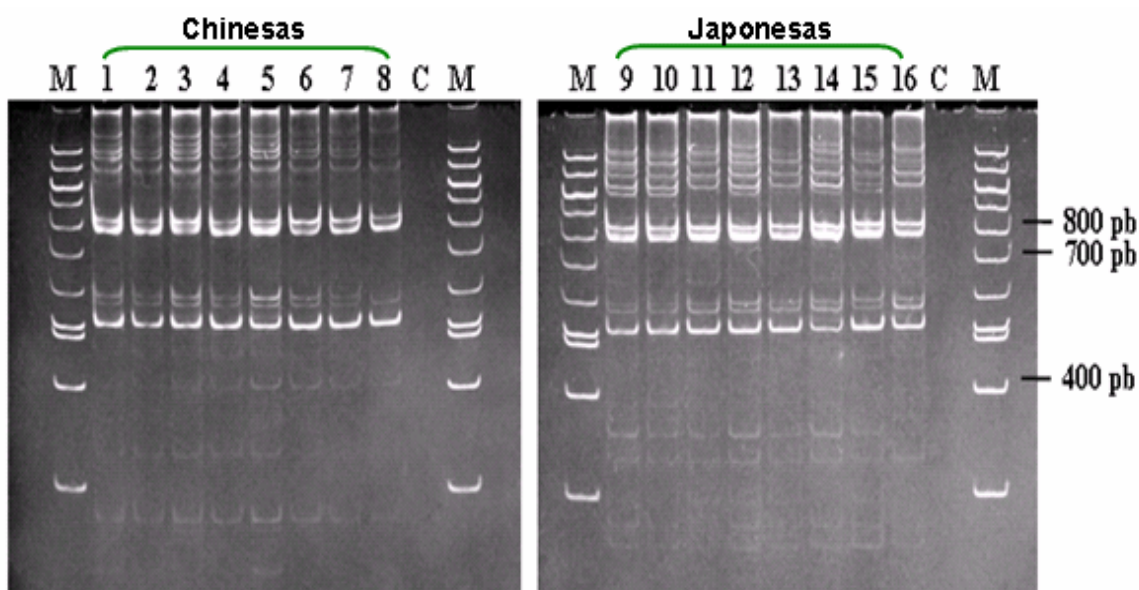


Figura 5. Gel poliacrilamida 6% mostrando o perfil RAPD geral com o primer OPA-18, amplificado a partir de DNA genômico extraído de lagartas de 1º instar. M – padrão de tamanho molecular, 100 pb – Biolabs; C – controle negativo; 1 a 16 – C14, C21, C24-A, C24-2, C25-B, C121-A, C122-B, C209, HA-A, HA-B, J1, M11-A, M12-B, M18-2, M19-2 e M102, respectivamente.

O resultado obtido pode ter sido prejudicado pelo fato de ter-se usado nas análises uma mistura populacional. Desta forma, pensou-se em utilizar amostras individuais para testar se alguma diferença seria encontrada. Para realização do teste, foram escolhidas duas linhagens utilizando-se para isto o resultado obtido por Ribeiro *et al.* (2006). Neste trabalho, com o objetivo de verificar a resposta dessas mesmas 16 linhagens frente à infecção pelo vírus da poliedrose nuclear, o ensaio biológico de infecção foi realizado na Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE em outro laboratório associado ao nosso grupo de pesquisa, com uma linhagem isolada no Paraná, o BmMNPV (*Bombyx mori multicapsid nucleopolyhedrosis virus*), descrito por Brancalhão (2002a). Esses resultados indicaram que existe uma grande variedade de resposta entre as linhagens de *B. mori*, com extremos de taxas de mortalidade pela infecção de 22% para a linhagem chinesa C24-A e 95% para a japonesa M11-A (Ribeiro *et al.*, 2006).

Como nenhuma diferença significativa foi encontrada quando a reação de amplificação no primer OPA-18, realizada a partir de DNA genômico de lagartas de 1º instar, utilizou-se DNA genômico extraído a partir de par de glândulas

sericígenas individuais de lagartas de 5º ínstar da linhagem C24-A, por ter se destacado quanto aos resultados de resistência obtidos no experimento de infecção, e da linhagem M11-A que apresentou maiores índices de mortalidade, ou seja, suscetibilidade.

Através do perfil de amplificação obtido (Figura 6A e 6B), as linhagens puderam ser diferenciadas quanto à resistência e suscetibilidade, uma vez que a presença da banda específica OPY-11_{400pb} só pôde ser observada na linhagem M11-A (Figura 6A, seta). Através da análise do perfil RAPD do primer OPA-18 em gel de poliacrilamida, pode ser observado que uma banda de aproximadamente 800 pb mostrou-se polimórfica para o primer OPA-18 (Figura 6B, seta), podendo estar relacionada àquela previamente descrita por Yao *et al.* (2003), e a diferença de tamanho ser devida às diferenças genéticas existentes entre as linhagens de bicho-da-seda mantidas na China e no banco de germoplasma da UEM.

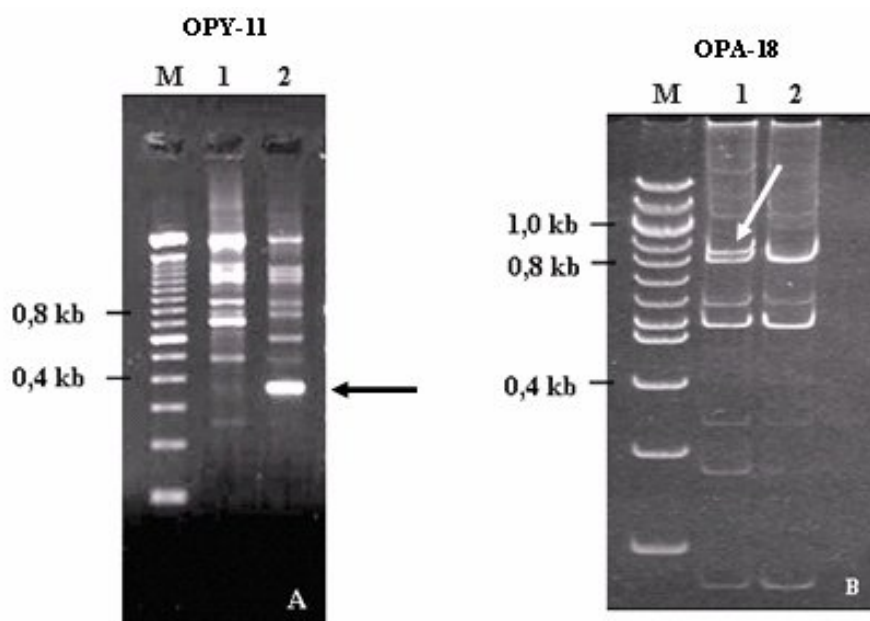


Figura 6. Gel agarose 1,5% mostrando perfil RAPD das linhagens C24-A (1) e M11-A (2) amplificados com os primers OPY-11 (A) e OPA-18 (B). MI - padrão de tamanho molecular 100 pb, Invitrogen e M - padrão de tamanho molecular 100 pb, Biolabs. Seta preta indica fragmento OPY-11₄₀₀ e seta branca fragmento OPA-18_{~800pb}.

Entretanto, quando analisada a Figura 5 pode ser observada a presença dessa banda em todas as linhagens. Essa observação apontou para a necessidade de se analisar indivíduos em separado. Realizou-se, então, a amplificação com os

primers OPY-11 e OPA-18 das 16 linhagens usando DNA genômico de glândulas sericígenas de lagartas de 5º instar (Figura 7 e 8, respectivamente). Conforme resultado obtido anteriormente, apenas as linhagens japonesas apresentaram a banda OPY-11_{400pb}, com exceção da linhagem M102 (figura 7). Já a banda OPA-18_{~800pb}, possível banda específica de resistência, foi amplificada em quase todas as linhagens, com exceção das linhagens chinesas C24-2 e C25-B e japonesas M11-A, M18-2 e M102 (Figura 8).

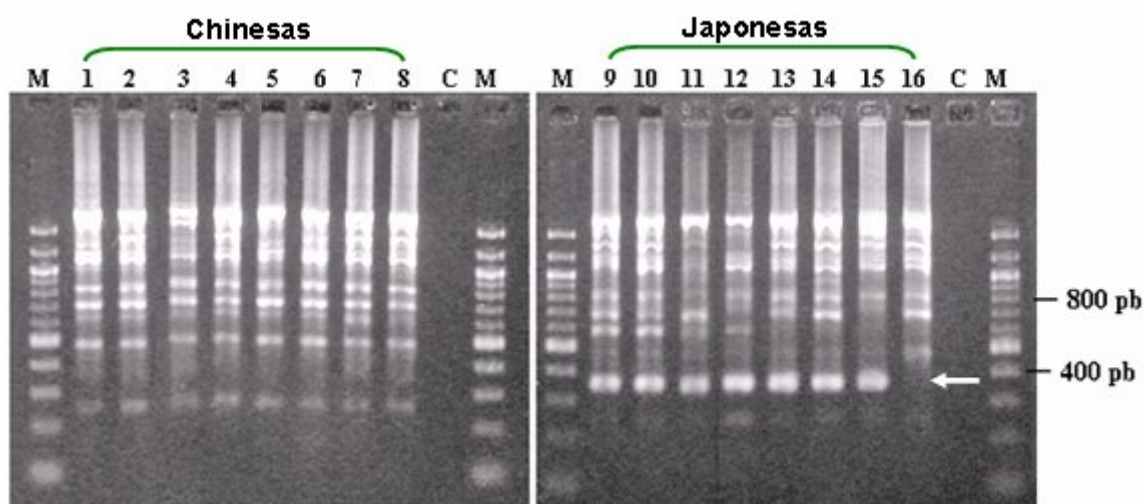


Figura 7. Perfil RAPD do primer OPY-11, amplificado a partir de DNA genômico de glândulas sericígenas de lagartas de 1º instar. M – padrão de tamanho molecular de 100pb, Biolabs; C – controle negativo; 1 a 16 – C14, C21, C24-A, C24-2, C25-B, C121-A, C122-B, C209, HA-A, HA-B, J1, M11-A, M12-B, M18-2, M19-2 e M102, respectivamente. Seta indica a banda de 400pb.

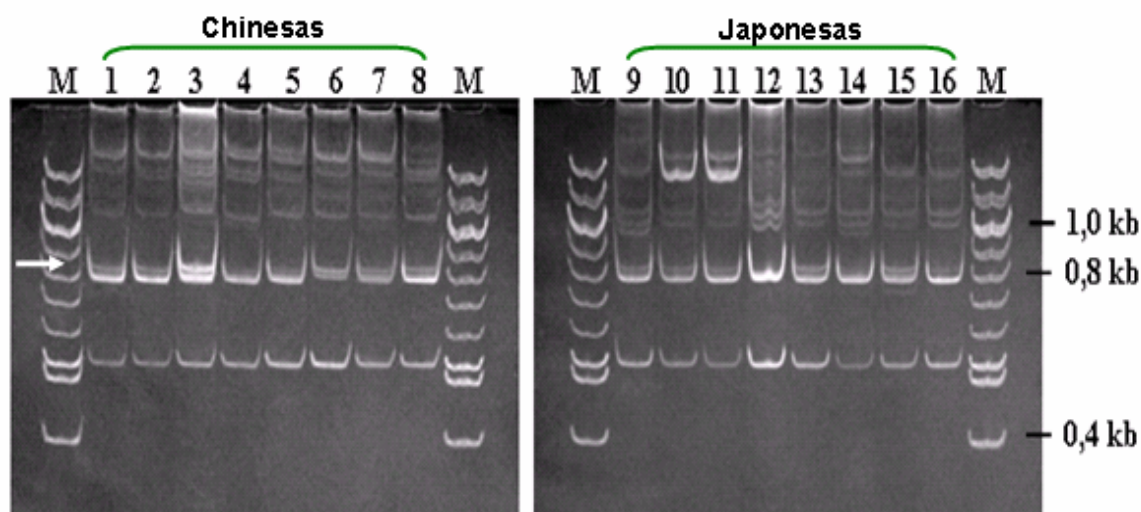


Figura 8. Perfil RAPD do primer OPA-18, amplificado a partir de DNA genômico de glândulas sericígenas de lagartas de 1º instar. M – padrão de tamanho molecular de 100pb, Biolabs; 1 a 16 – C14, C21, C24-A, C24-2, C25-B, C121-A, C122-B, C209, HA-A, HA-B, J1, M11-A, M12-B, M18-2, M19-2 e M102, respectivamente. Seta indica a banda de aproximadamente 800 pb.

Através do resultado obtido pode-se dizer que o marcador OPA-18 ou não é específico para caracterizar fenótipos resistentes de bicho-da-seda, ou as diferenças obtidas entre o presente trabalho e o de Yao *et al.* (2003) são devidas as diferenças nos níveis de suscetibilidade, uma vez que o termo resistência a doenças invasivas ou infecciosas é usado, em geral, para descrever um baixo grau de suscetibilidade e reduzida severidade dos sintomas, não existindo em *B. mori* a total ausência de suscetibilidade à doenças, com exceção do DNV (Abe *et al.*, 1998). Por outro lado, 12,5% dos indivíduos resistentes analisados por Yao *et al.* (2003) apresentaram a banda específica de 700 pb por ele descrita e 16,67% das linhagens suscetíveis também não apresentaram a banda específica de 400 pb.

4.2.4. Análise das seqüências das bandas polimórficas

Com o objetivo de caracterizar genes envolvidos no mecanismo de resistência/suscetibilidade ao vírus da poliedrose nuclear, as bandas polimórficas observadas no perfil RAPD dos primers associados com resistência (OPA-18) e suscetibilidade (OPY-11) foram clonadas e seqüenciadas a partir da amplificação do DNA genômico de par de glândulas sericígenas dos indivíduos tidos como mais resistente (C24-A) e mais suscetível (M11-A) ao BmMNPV. Os clones foram respectivamente nomeados de pBmR800 e pBmS400.

O sequenciamento mostrou que a seqüência nucleotídica do clone pBmR800 (Figura 9) é na verdade de 797 pb e os resultados por busca de homologia no banco de dados GenBank, realizada com o auxílio do BLASTN, revelou que essa seqüência possui homologia com regiões intrônicas de diversos genes, por exemplo, os nucleotídeos 265-426 do pBmR800 tem 89% de identidade com os nucleotídeos 2204-2367 do íntron 5 do gene da trehalase-2 de *Bombyx mori* (AB208702), a posição 270-426 com os nucleotídeos 84-246 (87% de identidade) do gene PCP (*Pupal Cuticle protein*) de *B. mori* (X68930). Além disso, os nucleotídeos 283-421 do fragmento seqüenciado teve 90% de identidade com a posição 269-406 de elementos *mariner-like* de *Bombyx mandarina* (AB237544).

Essas homologies com regiões intrônicas de diferentes genes podem ser devidas ao fato de que o fragmento analisado contém um transposon *mariner-like*, o qual é altamente repetitivo no genoma de *B. mori*.

```

AGGTGACCGTTACACATTGAAGGCTTTAAATTCAAACGTACTTACAAACACC
CACATGATAGGCTAAGAAAAATGCCAGCAGGTCCAGGTACCAGTCGGGGTTGA
TGTAATGATGATGATGAAGAGCAAGCTTAAATTGTGGTGAAACTCGAGTAA
GGATAGTCTATCGGCCGTATTGTGTTTCGACCGTACCAGTAGCTATTACGTAGT
TGTAGCCCGGTAGAAATCGGTGTCTCTTGAGGCAACTCAAGTAGTCCGTGGCG
GTAACCATCATACAACGCAAGATAATTGACAGATGCCTGAATCTCGCTTACGA
CATTTTCAAGATGAGCTCCCATATATAACAAGTTCCGAACAACAACATTCGGAC
CGTCGGTCTACTGAGCAAATATCACCCGCTCGGTGGAAGATCTTCCCTTTGTC
GTTTAAGCCTCCCTAAATAAGAAAACAATGCCCAAATGAAATTTGTTCAACTT
GAAAAAAGCTTAGGTTATTACTTAAATTTTATGTTTATTAATATGATAGGGAA
AATTTTAAACATAAATTGAAAAAATAAATAATTAGTTAGGAGTTACATACTTT
CTCACTACCGCTACTGTATACGTGAGAGAAAGGGATGCCAGACGGAATGGCGC
CGTAACGCGTTACGTAACGAAACGATTTACCCCTCCATAATAAGTTATCGCTT
CAAAAAATTCATTCCCATACAATTTTTTTTTTTTATAACAACACTAAGAGGCAA
ACGAGCAAGACGGGTCACCTGATGGTAAGTGATTCACCGCCGCCACGGTCAC
CT

```

Figura 9. Sequência do clone pBmR800. Em negrito está destacada sua sequência homóloga ao EST maV30131 e em sublinhado a sequência homóloga ao retrotransposon *mariner-like*.

Foi realizada então uma pesquisa no banco de dados de sequências expressas (EST), SilkBase, onde foi observada homologia com diversos EST retirados de diferentes tecidos. Entretanto, a maior identidade (95%) foi obtida entre a sequência nucleotídica inicial do fragmento do clone pBmR800, posição 2-264, com a posição 13-273 do EST maV30131 de 658 pb. Os outros ESTs com homologia repetiram o resultado obtido na pesquisa do GenBank, isto é, a região homóloga foi correspondente à região do fragmento que contém o transposon.

Um BLAST genômico foi feito no GenBank entre o pBmR800 e anotação do genoma de *Bombyx mori*, mostrando que 785 dos seus nucleotídeos apresentam 98% de identidade com os nucleotídeos 212-1009 do contig Ctg007099 (AADK01007099.1), obtido a partir da anotação do genoma da linhagem Dazao. O mesmo procedimento foi aplicado ao EST maV30131 e como esperado apenas seus nucleotídeos iniciais (1-273) mostraram 99% de identidade com o contig (Figura

10A. Foi observada a homologia da seqüência completa deste EST no contig Ctg03729 (AADK01003729), com 99% de identidade (Figura 10B).

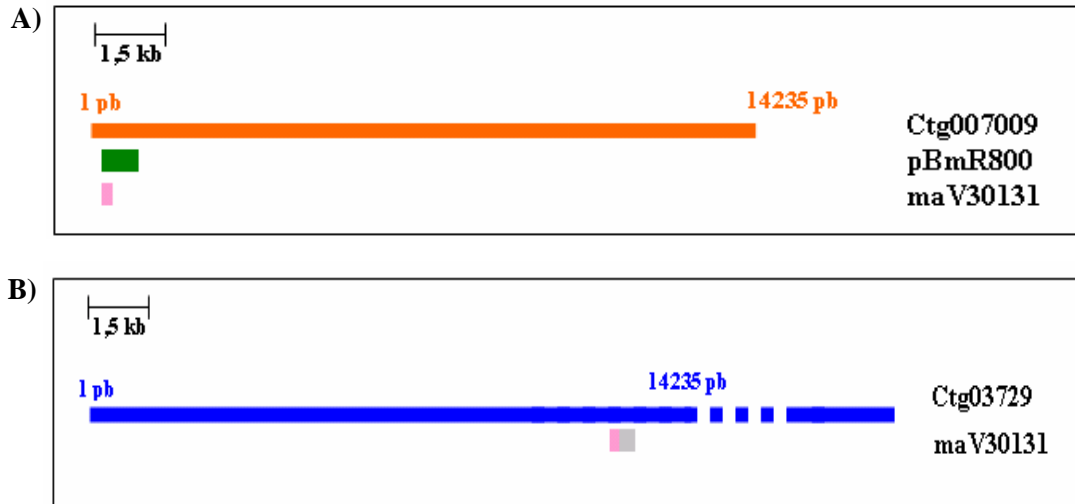


Figura 10. BLAST genômico entre o pBmR800 e anotação do genoma de *Bombyx mori* depositada no GenBank.

O EST maV30131 foi obtido de biblioteca de cDNA de túbulos de Malpighi de lagartas de *Bombyx mori* no 3º dia do 5º ínstar, depositado no GenBank (BP177699) e não apresenta, até o momento, homologia com nenhuma proteína conhecida. A anotação referida no Silkbase para o EST maV30131 é referente à homologia (com baixos valores) com o micropia-Dm11 retrotransposon de *Drosophila melanogaster* (X14037; Lankenau *et al.*, 1988). Esse EST tem identidade de 56% na posição 1-123 aminoácidos (1-369 nucleotídeos) com a posição de 1249-1288 aminoácidos (3747-3864 nucleotídeos) com o retransposon. Esse segmento em *D. melanogaster* pertence à uma família de poliproteínas. A organização típica de poliproteínas envolve uma série de domínios *in tandem* como para a transcriptase reversa, Rnase H, integrases e regiões similares à antígenos de histocompatibilidade MHC classe I. Esses domínios são característicos de elementos retrotransponíveis flanquados por LTRs e são similares aqueles codificados por retrovírus. Não foi possível determinar se a identidade encontrada se localiza em um desses domínios.

O seqüenciamento do clone pBmS400 (Figura 11) apresentou uma seqüência de 364 pb. Os nucleotídeos iniciais (5-57) desta seqüência apresentaram homologia com o retrotransposon BMC1 de *Bombyx mori* (AB008780), com 100% de identidade. No SilkBase o EST wdS30453 de 765 pb de biblioteca de disco germinal de asa, teve 81% de identidade, posição 194-395, com os nucleotídeos 59-254 do clone pBmS400, com 3% de *gaps*. Este EST apresenta também 92% de homologia com o EST prgv0817 de glândula protorácica de lagartas de 5º ínstar e ambas as seqüências não apresentam homologia significativa com nenhuma proteína descrita.

```

TCCGTGGGTTAGGTTGCACGTCGACCTCTTTGTCGAGTTCGACGAGTACGGTT
ACCGTCGCTTATCCAATCTGTACATCGGTGTATACACATTGATAAAAAGGATT
CCAATATATAGGTATCCAACCGAATGTTCTTTGTTAGCGCTTCGTCAAATGAA
CTAATAAAAGAGTAAAACAGACCTTATTACAAGTATGCTTATGTTATTTTCTT
TTATCATCTAGGAACGTGTCTTCTATAATCCCATATTCGTATTCGCGGCATAT
TTACGAAATTTATACCCTACAGATAAAAAGCCTTTACTGTAATAACAATAAAA
GAGACGCAATAAAACCTAAAAGATAGTTTTGACTGCACGCATCAGA

```

Figura 11. Seqüência do clone pBmS400. A seqüência sublinhada mostra a região de homologia com o retrotransposon BMC1 e em negrito a homologia com o EST wdS30453.

O EST prgv0817 tem uma baixa homologia, alinhando somente 57 nucleotídeos (30% de identidade), com antígenos de histocompatibilidade MHC classe II de humanos (G35058) e chimpanzés (H35058). O outro EST (wdS30453) também possui baixa homologia com uma DNA-metiltransferase sítio-específica para adenosina (S35122) de *Lactococcus lactis*. Em plantas de tabaco, Angelo *et al.* (1999) identificou um cDNA para uma adenosina-metiltransferase que estaria envolvida com mecanismos de defesas da planta. A seqüência de DNA do pBmS400 pode gerar uma proteína truncada devido ao retrotransposon nela identificado podendo, portanto, esta ser a razão dos indivíduos que possuem tal seqüência serem suscetíveis a infecção pelo BmNPV.

Devido às características dos marcadores RAPD, as seqüências amplificadas, usando-se esta metodologia, ocasionalmente incluem seqüências de elementos transponíveis. Em 1998, Abe *et al.* identificaram quatro marcadores RAPD sexo-específicos no cromossomo W de bicho-da-seda. Através do

sequenciamento dos fragmentos polimórficos obtidos com esses marcadores, foram identificadas homólogias dessas seqüências com regiões flangeadoras de elementos transponíveis *mariner* de *B. mori*, com a região codificadora da enzima transcriptase reversa (RT)-*like* do retrotransposon 412 de *D. melanogaster*, entre outros. Além disso, a análise de similaridade da seqüência deduzida de aminoácidos revelou homólogias com diversas outras seqüências de retrotransposons como o domínio para RNase H da poliproteína do retrotransposon *TED* para *Tricoplusia*. Os autores analisaram também 28 sequencias RAPD amplificadas a partir de autossomos e do cromossomo Z e os resultados obtidos mostraram que 14 dessas seqüências apresentavam homologia com elementos transponíveis, 6 não continham região codificadora e 8 continham regiões codificadoras parciais, sendo que destas 1 teve forte homologia com a seqüência de aminoácido do transposon *Minos* de *D. melanogaster*.

5. CONCLUSÕES

De acordo com a caracterização biológica, as linhagens analisadas apresentaram no geral um alto teor de seda líquido, caracterizando-as como boas produtoras, tendo-se destacado as linhagens C122-B e C121-A. As características externas dos casulos apresentadas pelas linhagens chinesas e japonesas foram de acordo com o esperado, devido a sua diferenciação por origem geográfica. Entretanto, quanto a outros caracteres biológicos analisados, tal distinção não pode ser feita, pois todas as medidas apresentaram grande homogeneidade entre as linhagens chinesas e japonesas. Os resultados mostraram também, através da análise do dendrograma, que os genótipos puderam ser estruturados em função de sua origem geográfica.

Através da análise molecular, as linhagens puderam ser classificadas como de ciclo larval longo e desta forma suas características como boas produtoras de seda apontadas pelo estudo biológico foram reforçadas, uma vez que a duração do período larval está fortemente relacionada com índices de produtividades no bicho-da-seda. Os marcadores RAPD foram eficientes na caracterização de resistência ou suscetibilidade no bicho-da-seda, embora não seja conhecida a frequência de polimorfismo das bandas identificadas nesse estudo para a população de cada linhagem.

A análise das seqüências obtidas não apresentou homologia significativa com seqüências codificadoras conhecidas, podendo fazer parte de um novo gene relacionado com o sistema de defesa do bicho-da-seda, sendo necessária a realização de um estudo mais detalhado. Os resultados mostraram também que os fragmentos polimórficos amplificados pelos primer OPA-18 e OPY-11 são parte de elementos retrotransponíveis. Os resultados acima apresentam um quadro de expressão gênica diferencial que, podem estar envolvidos nos mecanismos de defesa do *B. mori* ao BmNPV, caso os elementos transponíveis identificados estejam interferindo em algum gene envolvido na resistência do bicho-da-seda.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, H.; KANEHARA, M.; TERADA, T.; OHBAYASHI, F.; SHIMADA, T.; KAWAI, S.; SUZUKI, M.; SUGASAKI, T.; OSHIKI, T. Identification of novel random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) on the W chromosome of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, and the wild silkworm, *B. mandarina*, and their retrotransposable element-related nucleotide sequences. **Genes Genet. Syst.**, 73: 243–254, 1998.
- ABE, H.; SHIMADA, T.; TSUJI, T.; YOKOYAMA, T.; OSHIKI, T.; KOBAYASHI, M. Identification of random amplified polymorphic DNA linked to the denonucleosis type-1 susceptibility gene of the silkworm, *Bombyx mori*. **J. Seric. Sci.**, 64: 262-264, 1995.
- ABE, H., SUGASAKI, T., KANEHARA, M., SHIMADA, T., GOMI, S.J., et al. Identification and genetic mapping of RAPD markers linked to the denonucleosis refractoriness gene, *nsd-2*, in the silkworm, *Bombyx mori*. **Genes Genet. Syst.**, 75: 93–96, 2000.
- ADAMS, J.R.; McCLINTOCK, J.T. Baculoviridae. nuclear polyhedrosis viruses. Part 1. Nuclear Polyhedrosis Viruses of Insects. *In*: ADAMS, J.R.; BONAMI, J. R. **Atlas of Invertebrate Viruses**. Florida: CRC Press, 1991. 89-180p.
- ANGELO, P.C.S.; TERENCE, M.F.; MEGLHIORATTI, F.A.; GOLDMAN, G.H.; GOLDMAN, M.H.S. A novel gene preferentially expressed in pistils of *Nicotiana tabacum* is identified. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.22, n.3, suplemento, 1999. 294p.
- ARATAKE, Y. Strain difference of the silkworm, *Bombyx mori* L. in the resistance to a nuclear polyhedrosis virus. **J. Sericulture Sci.**, 42(3): 230-238, 1973.
- AWASTHI A.K.; NAGARAJA, G.M.; NAIK, G.V.; KANGINAKUDRU, S.; THANGAVELU, K.; NAGARAJU, J. Genetic diversity and relationships in mulberry (genus *Morus*) as revealed by RAPD and ISSR marker assays. **Genetics**, 5:1-9, 2004.

- BILIMORIA, S.L. The biology of nuclear polyhedrosis viruses. *In*: Kurstak, E. **Viruses of Invertebrates**. New York: Marcel Dekker, 1991. 1p.
- BRANCALHÃO, R.M.C. Vírus entomopatogênicos no bicho-da-seda: Taxonomia e citopatologia causada por *Nucleopolyhedrovirus* em células de *Bombyx mori*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 24:54-58, 2002 (a).
- BRANCALHÃO, R.M.C.; SOUZA, V.B.V.; SOARES, M.A.M. Infecção causada por *Nucleopolyhedrovirus* nas células gordurosas de *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae) **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, 69 (2): 57-63, 2002 (b).
- CARRADELLO, E.F.A. Bicho-da-seda e amoreira: da folha ao fio a trama de um segredo milenar. **Coleção Brasil Agrícola**, 1987.
- CHATTERJEE, S.N.; MOHANDAS, T.P. Identification of ISSR markers associated with productivity traits in silkworm, *Bombyx mori* L. **Genome**, 46: 438-447, 2003.
- CHATTERJEE, S.N.; PRADEEP, A.R. Molecular markers (RAPD) associated with growth, yield and origin of the silkworm, *Bombyx mori* L. **Genetika**, 39:1612-1624, 2003.
- CHEN, K.; YAO, Q.; LI, M.; WANG, Y. Screening of RAPD markers for fluoride resistance in *Bombyx mori* L. **Int. Indust. Entomol.**, 7:11-14, 2003.
- CIANCIARULLO, A.M.; ABREU, O.C.; CAMPOS, A.R.; OLIVEIRA, J.M.; JULY, J.R. Flacidez infecciosa, primeira ocorrência em *Bombyx mori* L., no Brasil. **O Biológico XLIII**, 199-202, 1977.
- DATTA, R. K. Improvement of silkworm races (*Bombyx mori* L.) in India. **Sericologia**, 24(3): 393-415, 1984.
- DINGLE, J.G.; HASSAN, E.; GUPTA, M.; GEORGE, D.; ANOTA, L.; BEGUM, H. Silk production in Australia. **Rural industries research and Development Corporation**, ISBN 1741512085 Publication 05/145, 2005. 113p.
- EWING, B., HILLIER, L.; WENDL, M.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. I. Accuracy assessment. **Genome Res.** 8:186-194, 1998.

EGUCHI, R.; HARA, W.; SIMAZAKI, A.; HIROTA, K.; ICHIBA, M.; NINAGI, O.; NAGAYASU, K. Breeding of the silkworm race “Taisei” nonsusceptible to a denonucleosis virus type –1. **J. Sericulture Sci. Japan**. 67(5):361-366, 1998.

FERNANDEZ, M.A.; CIFERRI, R.R.; PATUSSI, E.V.; PEREIRA, M.F.; FELIPES, J.; BRAVO, J.P.; ZANATTA, D.B.; GOUVEIA, F.S.; BALANI, V.A. Utilização da biotecnologia na sericicultura brasileira. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 35: 56-61, 2005.

FERREIRA, D.F. Sisvar (Sistema para análise de variância para dados balanceados). **Lavras: UFLA**; 1992. 79p.

FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: **EMBRAPA/CENARGEN**, 1998. 220p.

GATTI, I.M.; SILVA, D.M.; MATYS, J.C.; NOGUEIRA, N.L.; OLIVEIRA, A.R. Constatação ao microscópio eletrônico de poliedroses em bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.). In: **Colóquio Brasileiro de Microscopia Eletrônica**, Piracicaba: 1976. 88-89 p.

GOLDSMITH, M.R., The Bombyx genome mapping project. **Sericologia**, 21:24-25, 1991.

GOLDSMITH, M.R.; SHIMADA, T.; ABE, H. The Genetics and genomics of the silkworm, *Bombyx mori*. **Ann. Rev. Entomol.**, 50:71-100, 2005.

GOMI, S.; MAJIMA, K.; MAEDA, S. Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus. **J. Gen. Virol.**, 80: 1323-1337, 1999.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, 8:195-202, 1998.

GRANADOS, R.R.; WILLIAMS, K.A. In Vivo Infection and Replication of Baculovirus. In: GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. **The Biology of Baculoviruses**. Florida: CRC Press, 1986. 89-108p.

IKUNO, A.A.; MARGATHO, L.F.F.; HARAKAVA, R.; AKAMATSU, M.A.; MARTINS, E.M.F.; PORTO, A.J.; FERREIRA, V.C.A. Direct Application of the New PCR Protocol for Evaluation and Monitoring of *Bombyx mori* Infection by *Nucleopolyhedrovirus*. **Arq. Inst. Biol.**, 71(3):309-315, 2004.

INCEOGLU, A.B.; KAMITA, S.G.; HINTON, A.C.; HUANG, QIHONG.; SEVERSON, T.F.; KANG, KYUNG-DON.; HAMMOCK, B.D. Recombinant baculoviruses for insect control *Pest Management Science*. **Pest. Manage. Sci.**, 57 (10):981-987, 2001.

JE Y. H.; JIN H.C.; KIM, M.H.; ROH, J.Y.; JIN, B.R.; O'REILLY, D R. The use of defective *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* genomes maintained in *Escherichia coli* for the rapid generation of occlusion-positive and occlusion-negative expression vectors. **Biotechnology Letters**, 23:1809-1817, 2001.

KRISHNASWAMI, S.; NARASIMHANNA, M.N.; SURYNARAYAN, S.K. et al. Sericulture manual 2-Silkworm rearing. Rome: **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 1979. 131 p.

LANKENAU, D.H.; HUIJSER, P.; JANSEN, E; MIEDEMA, K.; HENNIG, W. Micropia: a retrotransposon of *Drosophila* combining structural features of DNA viruses, retroviruses and non-viral transposable elements **Journal of molecular biology**, 204(2) 233-246, 1988.

MITA, K.; KASAHARA, M.; SASAKI, S.; NAGAYASU, Y.; YAMADA, T.; KANAMORI, H.; et al. The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. **DNA Res.**, 11:27-35, 2004.

MONESI, N.; JACOBS-LORENA, M.; PACO-LARSON, M.L. The DNA puff gene BhC4-1 of *Bradysia hygida* is specifically transcribed in early prepupal salivary glands of *Drosophila melanogaster*. **Chromosoma**, 107(8):559-569, 1998.

NAGARAJA, G.M.; NAGARAJU, J. Genomic fingerprinting of silkworm, *Bombyx mori* using random arbitrary primers. **Electrophoresis**, 16:1633-1638, 1995.

NAGARAJU, J. Recent advances in molecular genetics of the silk moth, *Bombyx mori*. **Current Science**, 78:151-161, 2000.

NAGARAJU, J.; GOLDSMITH, M.R. Silkworm genomics-progress and prospects. **Current Science**, 83(4):415-425, 2002.

NAGARAJU, J.; KATHIRVEL, M.; SUBBAIAH, E.V.; MUTHULAKSHMI, M.; KUMAR, L.D. FISSR-PCR: a simple and sensitive assay for high throughput genotyping and genetic mapping. **Mol. Cell Probes**, 16: 67-72, 2002.

- OKANO, K., SHIMADA, T., MITA, K.; MAEDA, S. Comparative expressed-sequence-tag analysis of differential gene expression profiles in BmNPV-infected BmN cells. **Virology**, 282 (2):348-56, 2001.
- OKINO, I. Manual de sericicultura. **Bauru**. 1982. 80p.
- PORTO, A.J.; OKAMOTO, F. Desempenho produtivo de quatro raças do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) e seus cruzamentos. **B. Industr. Anim.**, 60(2):179-184, 2003.
- PORTO, A.J.; OKAMOTO, F.; CUNHA, E. A. et. al. Caracterização de oito raças do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.). **Ciência Rural**, 34(1): 259-264, 2004.
- PRADEEP, A.R.; CHATTERJEE, S.N.; NAIR C.V. Genetic differentiation induced by selection in an inbred population of the silkworm *Bombyx mori*, revealed by RAPD and ISSR marker systems. **J. Appl. Genet.**, 46(3): 291–298, 2005.
- PROMBOON, A.; SHIMADA, T.; FUJIWARA, H.; KOBAYASHI, M. Linkage map of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in the silkworm, *Bombyx mori*. **Genet. Res.**, 66:1-7, 1995.
- RIBEIRO, L. de F.C.; ZANATTA, D.B.; BRAVO, J.P.; FELIPES, J.; BRANCALHÃO, R.M.C.; FERNANDEZ, M.A. Associated genomic marks for BmMNPV resistance in *Bombyx mori* L. (Lepidoptera:Bombycidae). In: XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Águas de Lindóia, 2006. **Anais da XXXV Reunião Anual da SBBq**. CD Room.
- RIBEIRO B.M.; PINEDO, F.J.R. Baculovírus recombinante para controle de praga. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 22:50-58, 2001.
- ROHLF, F.J. Ntsys: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.1. **Exeter Software**, Setauket, NY, 2001.
- SANGUINETTI, C.J.; NETO, E.D.; SIMPSON, A.J.G. Rapid Silver Staining and Recovery of PCR Products Separated on Polyacrylamide Gels. **BioTechniques**, 17 (5): 914-921, 1994.
- SENGUPTA, K.; KUMAR, P.; BAIG, M.; GOVINDAIA, H. **Handbook on pest and disease control of mulberry and silkworm**. Bangkok, Thailand: UNESCAP -

- United Nations Economic and Social Commission for Asia and the Pacific-1990. 88 p.
- SMITH, K.M. Insect virology. **New York: Academic Press**, 1967. 256 p.
- TAMURA, M.; NATORI, K.; KOBAYASHI, M.; MIYAMUTA, T.; TAKEDA, N. Interaction of recombinant Norwalk virus particles with the 105-kilodalton cellular binding protein, a candidate receptor molecule for virus attachment. **J. Virol.**, 74:11589-11597, 2000.
- TANADA, Y.; KAYA, H.K. Insect Pathology. *In: DNA-Viral Infections: Baculoviridae.* **Academic Press**, 1993. 171-244p.
- THIAGARAJAN, V.; BHARGAVA, S.K.; BABU, M.R.; NAGARAJ, B. Differences in seasonal performance of twenty six strains of silkworm, *Bombyx mori*, (Bombycidae). **Journal Lepidopterist's Society**, 47(4): 331-337, 1993.
- TINOCO, S.T.J. Manual de sericicultura. **Campinas: CATI**, 2000. (Manual técnico 75) 75p.
- TOSHIKI, T.; CHANTAL, T.; CORINNE, R.; TOSHIO, K.; EAPPEN, A.; MARI, K.; NATUO, K.; JEAN-LUC, T.; BERNARD, M.; GERARD, C. Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a *piggyBac* transposon-derived vector. **Nat. Biotechnol.**, 18: 81-84, 2000.
- TOYAMA, K. Breeding Methods of Silkworm. **Sango, Shimpo**, 158: 282-286, 1906.
- UZIGAWA, K.; ARUGA, H. On the selection of resistance strains of the infectious flacherie virus in the silkworm, *Bombyx mori* L. **J. Sericulture Sci.**, Japan. 35 (1): 23-26 1966.
- ZANETTI, R. Doenças e pragas do bicho-da-seda, notas de aula de ENT 100 – Sericicultura. Disponível em: <http://www.den.ufla.br/Professores/Ronald/Disciplinas/Notas%20Aula/Sericicultura%20doencasbicho.pdf>. DEN/UFLA, Lavras – MG, 2005a.
- ZANETTI, R. Bicho-da-seda, notas de aula de ENT 100 – Sericicultura. Disponível em: <http://www.den.ufla.br/Professores/Ronald/Disciplinas/Notas%20Aula/Sericicultura%20bichodaseda.pdf>. DEN/UFLA, Lavras – MG, 2005b.

- WATANABE, H. Genetic resistance of the silkworm, *Bombyx mori* to viral diseases. **Current Science**, 83 (4):25, 2002.
- WATANABE, H. Resistance of the silkworm, *Bombyx mori*, to viral infections. **Agric. Ecosyst. Environ.**, 15:131-139, 1986.
- WATANABE, H.. Development of resistance in the silkworm, *Bombyx mori* to preoral infection of a cytoplasmic polyhedrosis virus. **J. Invertebr. Pathol.**, 9(4): 474-479, 1967.
- WATANABE, H. Studies on difference in the variability of larval body and cocoon weights between single cross and three way- cross or double cross hybrids in the silkworm, *Bombyx mori*. **J. Sericult. Sci. Japan**. 30: 463-467, 1961.
- WATANABE, J.K.; YAMAOKA, R.S.; BARONI, S.A. Cadeia produtiva da seda: diagnósticos e demandas atuais. **Londrina/PR: IAPAR**, 30-33, 2000.
- WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V: DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic. Acids. Res.**, 18:6531-6535, 1990.
- XIA, Q. XIA, Q.; ZHOU, Z.; LU, C.; CHENG, D.; DAI, F.; et al. (Genome analysis group). A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). **Science**, 306:1937-1940, 2004.
- XU, J.P.; CHEN, P.K.; YAO, Q. LIU, X.Y. Fluorescent differential display analysis of gene expression for NPV resistance in *Bombyx mori* L. **J. Appl. Entom.**, 129(1):27-31, 2005.
- YAO, Q.; LIM, W.; WANG, Y.; WANG, W.B.; LU, J.; et al. Screening of molecular markers for NPV resistance in *Bombyx mori* L. (Lep., Bombycidae). **J. Appl. Entomol.**, 127:134-36, 2003.
- YASUKOCHI, Y. A dense genetic map of the silkworm, *Bombyx mori*, covering all chromosomes based on 1018 molecular markers. **Genetics**, 150(4):1513-1525, 1998.
- ZUROVEC, M.; YANG, C.; KODRÍK, D.; SEHNAL, F. Identification of a Novel Type of Silk Protein and Regulation of Its Expression. **Biol. Chem.**, 25: 15423-15428, 1998.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)