

**LUDIMILLA RONQUI**

**ANÁLISE GENÉTICA DE POLIMORFISMOS  
BIOQUÍMICOS EM LINHAGENS DO BICHO-DA-SEDA  
(*Bombyx mori* L.)**

**MARINGÁ  
PARANÁ - BRASIL  
DEZEMBRO - 2006**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

LUDIMILLA RONQUI

**ANÁLISE GENÉTICA DE POLIMORFISMOS  
BIOQUÍMICOS EM LINHAGENS DO BICHO-DA-SEDA  
(*Bombyx mori* L.)**

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  
DEZEMBRO - 2006

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

R773a Ronqui, Ludimilla  
Análise genética de polimorfismos bioquímicos em  
linhagens do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) /  
Ludimilla Ronqui. -- Maringá : [s.n.], 2006.  
36 f.

Orientador : Prof. Dr<sup>a</sup>. Maria Cláudia Colla  
Ruvolo-Takasusuki. Co-orientador Dr. Erasmo Renestro  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Maringá. Programa de Pós-Graduação em Genética e  
Melhoramento 2002.

1. Genética animal. 2. Sericicultura. 3.  
Marcadores bioquímicos. I. Universidade Estadual de  
Maringá. Programa de Pós-Graduação em Genética e  
Melhoramento

CDD 21.ed.691.35

Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte  
(A autora)

## AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu forças, oportunidade e condições para realização deste trabalho e de estar em um ambiente de trabalho agradável e familiar.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Estadual de Maringá pela oportunidade da realização deste trabalho.

À minha orientadora Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki, uma profissional tão querida, competente e dedicada nas horas de trabalho, com quem aprendi o quanto é rico conviver com a diferença e valorizar a diversidade.

Aos Professores que gentilmente fizeram parte da Banca Examinadora de minha dissertação: Maria Aparecida Fernandez e Jussara Ricardo de Oliveira e aos demais professores que de uma maneira indireta contribuíram para realização deste trabalho: ...

Aos Professores da Pós-graduação em Genética e Melhoramento, com alguns dos quais, por meio das disciplinas cursadas, aprendi muito.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Biologia Celular e Genética que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Reginaldo Constantino do Departamento de Zoologia da Universidade de Brasília pela identificação dos térmitas analisados neste trabalho.

Ao Secretário do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, Francisco, pela ajuda e trabalho indispensáveis.

Aos grandes amigos do curso de pós-graduação, pela companhia e dedicação nas disciplinas cursadas.

Aos meus amigos dos Laboratórios: Cultura de Tecidos Vegetais e Eletroforese e Genética de Animais: Tatiane, Adriana, Gleice Ana Lúcia e Luzia pela amizade e companheirismo e paciência durante essa corrida jornada de trabalho.

À Thaís que, mesmo longe, foi a pessoa fundamental na realização deste trabalho.

Às minhas grandes amigas Débora, Dionízia e Liriana pela amizade, confiança e carinho durante todos os momentos dedicados.

À minha grande família, principalmente, meus pais Graciete e Vitor que tiveram muita paciência e dedicação e apoiaram-me ao longo da realização deste trabalho e aos meus irmãos Fábio, Tico e Márcio, que foram os responsáveis por mais esta conquista e pelo apoio nos momentos difíceis.

Especialmente, agradeço ao grande amor da minha vida, Ana Beatriz que com a sua presença deu-me forças e serenidade para realização deste trabalho

## **BIOGRAFIA**

Ludimilla Ronqui, filha de Natal Ronqui e Dirce Albino Ronqui, nasceu em Umuarama, Estado do Paraná, no dia 18 de agosto de 1982.

Formou-se em Ciências Biológicas, pela Universidade Paranaense – UNIPAR, em 2005.

Em 2005, iniciou o Programa de Pós – Graduação em Genética e Melhoramento, em nível de mestrado, área de concentração genética animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudo na área de sericicultura.

Atualmente, é professora da Faculdade de Ciências Biomédicas de Cacoal – Rondônia.

## ÍNDICE

Resumo.....	v
Abstract.....	vii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1. Aspectos biológicos de <i>Bombyx mori</i> L.....	4
2.2. Características das glândulas sericígenas .....	8
2.3. Marcadores moleculares .....	10
2.4 Marcadores bioquímicos .....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	15
3.1. Material biológico .....	15
3.2. Métodos .....	15
3.2.1 Obtenção das glândulas sericígenas .....	15
3.2.2 Análise eletroforética .....	16
3.2.3. Preparo das amostras .....	17
3.2.4. Revelação das esterases (EST - EC 3.1.1.1) .....	17
3.2.5 Gel de amido.....	17
3.2.6. Revelações da fosfatase ácida (ACP – EC 3.1.3.2) .....	18
3.2.7. Revelações da fosfatase alcalina (AKP - EC 3.1.3.1) .....	18
3.2.8. Revelações da anidrase carbônica (CA – EC 4.2.1.1).....	18

3.3 Análise da genética de populações.....	18
4. Resultados e discussão .....	19
5. Conclusões .....	28
7. Referências bibliográficas .....	29

## RESUMO

RONQUI, Ludimilla. M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, Dezembro de 2006. Análise genética de polimorfismos bioquímicos em linhagens do bicho-da-seda (*Bombyx Mori* L.). Professor orientador: Dra. Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki. Professores Conselheiros: Dra. Maria Aparecida Fernandez, Dra. Claudete Aparecida Vangolin e Dr. Erasmo Renestro.

O bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) é considerado um inseto de grande importância econômica. Os híbridos atualmente explorados pelo aproveitamento da heterose são provenientes principalmente de raças japonesas e chinesas. Este trabalho teve como objetivo avaliar o polimorfismo em lagartas do bicho-da-seda de diferentes linhagens utilizando a eletroforese de isoenzimas para detectar marcadores bioquímicos e investigar a genética de populações para essas linhagens. Foram utilizados como amostras extratos individuais de glândulas sericígenas de lagartas do segundo dia da quinta idade, de sete linhagens japonesas e oito linhagens chinesas puras mantidas pela COCAMAR-Cooperativa Agroindustrial de Maringá. As isozimas fosfatase ácida (ACP), fosfatase alcalina (AKP) e anidrase carbônica (CA) foram avaliadas por meio de eletroforese em géis de amido de milho (Penetrose 30, Corn Products of Brazil) a 14%. As esterases (EST) foram analisadas por meio de eletroforese vertical em géis de poliacrilamida a 10% e coloração com  $\alpha$  e  $\beta$ -naftil acetato. A análise estatística foi realizada por meio do programa popgene 1.31. Foram observados 21 locos, dentre os quais quatro (19,05%) são polimórficos, *Est-11*, *Acp*, *Akp*, *Ca*. Os alelos da ACP apresentaram freqüências de 0,300; 0,3917 e 0,3083 respectivamente para *Acp-1<sup>A</sup>*, *Acp-1<sup>B</sup>* e *Acp-1<sup>C</sup>*. A freqüência dos alelos da AKP foi de 0,2500 para *Akp-1<sup>A</sup>*, 0,5333 *Akp-1<sup>B</sup>* e para *Akp-1<sup>C</sup>* 0,2167. Para a anidrase carbônica foram detectados dois alelos com freqüências de 0,4750 e 0,5250 para *Ca-1<sup>A</sup>* e *Ca-1<sup>B</sup>* respectivamente. E para a EST-11 as freqüências foram de 0,8974 e 0,1026 *Est-1<sup>A</sup>* e *Est-1<sup>B</sup>* respectivamente. A heterozigosidade média observada foi de 0,0350, enquanto a heterozigosidade esperada foi 0,0929. O índice de fixação ( $F_{is}$ ) para as isozimas analisadas foi - 0,0452, indicando que ainda há excesso de heterozigotos. O valor de  $F_{st}$

(0,676) permite sugerir que as linhagens estão bem diferenciadas e que não ocorre fluxo gênico entre elas (0,1194). O dendrograma obtido a partir dos valores de distância genética não separou totalmente as linhagens chinesas e japonesas analisadas. Essa avaliação preliminar das linhagens de *B. mori* mostra que elas apresentam material genético que pode ser utilizado em programas de cruzamentos que tenham a finalidade de produzir híbridos para produção de seda.

## ABSTRACT

RONQUI, Ludimilla. M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, December, 2006.

Análise genética bioquímica de polimorfismos em linhagens de lagarta-da-seda (*Bombyx mori* L.). Orientadora: Dra. Maria Cláudia Colla Ruvolo Takasusuki. Comissão Membros: Dra. Maria Aparecida Fernandez, Dra. Claudete Aparecida Vangolin e Dr. Erasmo Renestro.

The silkworm (*Bombyx mori* L.) it is an insect of great economical importance. The hybrid now explored by the use of the heterose are originating from Japanese and Chinese races. This work carried out to evaluates the polymorphism in the silkworm of different lineages using the isoenzymes electrophoresis to detect biochemical markers and to investigate the genetics of populations for those lineages. They were used as samples individual extracts of silk glands of second day old larvae of the fifth instar, originating from seven Japanese lineages and eight pure Chinese lineages maintained by the COCAMAR-Cooperativa Agroindustrial de Maringá. The isozymes acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (AKP) and carbonic anhydrase (CA) they were submitted to the electrophoresis in starch gels (Penetrose 30, Corn Products of Brazil) to 14%. The esterases (EST) they were analyzed in polyacrylamide gels to 10% and stained with  $\alpha$  and  $\beta$ -naphthyl acetate. The statistical analysis was accomplished through the software popgene 1.31. The total of 21 loci was detected, and four (19,05%) they are polymorphic, *Est-11*, *Acp*, *Akp*, *Ca*. The ACP alleles presented frequencies of 0,300; 0,3917 and 0,3083 respectively for *Acp-1<sup>A</sup>*, *Acp-1<sup>B</sup>* and *Acp-1<sup>C</sup>*. The frequency of the AKP alleles went from 0,2500 to *Akp-1<sup>A</sup>*; 0,5333 *Akp-1<sup>B</sup>* and for *Akp-1<sup>C</sup>* 0,2167. Frequency of the two alleles of CA it went 0,4750 and 0,5250 for *Ca-1<sup>A</sup>* and *Ca-1<sup>B</sup>* respectively. And for the EST-11 frequencies they were of 0,8974 and 0,1026 *Est-1<sup>A</sup>* and *Est-1<sup>B</sup>* respectively. The average heterozygosity observed was 0,0350, while the expected heterozygosity was 0,0929. The fixation index ( $F_{is}$ ) for the analyzed isozymes it was - 0,0452, indicating that there is heterozygous excess. The value of  $F_{st}$  (0,676) it shows that the lineages are well differentiated and that there is no gene flow among them (0,1194). The dendrogram obtained with the values

of genetic distance didn't separate the Chinese and Japanese lineages analyzed totally. That preliminary evaluation of the lineages of *B. mori* shows that they present genetic material that it can be used in breeding programs that have the purpose of producing hybrid for silk production.

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a sericicultura é uma importante atividade agroindustrial que contribui substancialmente para a economia rural, sendo o 4º produtor mundial de casulos verdes e de fios de seda (Brancahã, 2002).

A grande parte da produção nacional de fio de seda é exportada para diversos países como Japão, Taiwan e Coréia do Sul. Segundo Evangelista (1994) a qualidade dos fios será tanto maior quanto melhor for a qualidade genética das lagartas e sua alimentação.

O Paraná é o principal estado produtor, concentrando durante a safra de 2002/2003, 6.535 criadores do bicho-da-seda, com 7.343 barracões, explorando uma área de aproximadamente 21.110,33 hectares, obtendo uma produção de 8.929.076,8 Kg de casulos verdes, sendo responsável por 89,59% da produção nacional (Bratac, 2003). Além disso, é o maior produtor nacional de casulos verdes (90%) e, responsável por 53% da industrialização, com três grandes empresas de fiação – a Cocamar (Maringá), a Kanebo Silk do Brasil (Cornélio Procópio) e a Bratac (Londrina). A sericicultura é uma atividade desenvolvida por pequenos produtores, instalados principalmente na região Noroeste. Em 2002/2003 as regiões de Maringá, Umuarama e Paranavaí, juntas, produziram 5,5 milhões de quilos de casulos verdes (Agronline, 2004).

A sericicultura abrange o cultivo da amoreira (*Morus sp*), a produção e o preparo de ovos e a criação das lagartas do bicho-da-seda (*Bombyx mori L.*). Parte dessa fase do ciclo de vida do inseto é conduzida por produtores rurais produzindo os casulos que as indústrias transformam em fios e tecidos de seda (Fonseca e Fonseca, 1986; Watanabe et al., 2000). A cultura do bicho-da-seda também contribui expressivamente para a fixação do trabalhador no campo, gerando receitas mensais durante oito meses do ano. Na safra 2002/2003, a atividade foi desenvolvida em 225 municípios paranaenses (Agronline, 2004).

De acordo com Arnaut de Toledo (1992) as linhagens de bicho-da-seda, que atingem os objetivos dos criadores em termos de produtividade são as linhagens européias e orientais (subdivididas em raças chinesas e japonesas). Sendo que atualmente para exploração comercial, é utilizado o híbrido pelo

aproveitamento da heterose, principalmente entre as linhagens japonesas e chinesas.

Além da sua importância econômica, o bicho-da-seda tem sido usado como modelo para estudos em genética desde a descoberta da herança mendeliana no início do século passado devido ao seu grande tamanho, facilidade em manter em laboratório, e sua importância econômica (Nagaraju, 2000). Assim, de acordo com esse autor, o *B. mori* é o segundo inseto mais utilizado como modelo de estudos genéticos depois de *Drosophila melanogaster*. Os estudos genéticos bem sucedidos com essa espécie incluem mais de 400 mutações que têm sido mapeadas em 28 grupos de ligação ou cromossomos (Nagaraju, 2000).

Muitos dos estudos com *B. mori* estão relacionados com biologia molecular incluindo a clonagem de muitos genes desses insetos como o das enzimas sorbitol desidrogenase (Niimi et al., 1996), trealase (Su et al., 1996); homeoproteínas como antenapedia (Ueno et al., 1996) e ultrabithorax (Ueno et al., 1995); hormônio da diapausa (Sato et al., 1993; Kawano et al., 1992); sericina (Michaille et al., 1986; Michaille et al., 1990), cadeia pesada da fibroína (Suzuki e Brown, 1972; Mita et al., 1994) e cadeia leve da fibroína (Yamaguchi et al., 1989).

Desde 1995 vários marcadores moleculares como RAPD (Promboon et al., 1995; Yasukochi, 1998), RFLP (Shi et al., 1995), AFLP (Tan et al., 2001) e microsátélites (Miao et al., 2005) estão sendo empregados para detectar polimorfismos e construir mapas de ligação para o bicho-da-seda.

Além dos vários marcadores moleculares disponíveis na atualidade, marcadores bioquímicos como as isoenzimas, têm gerado uma enorme gama de informações práticas na identificação de espécies híbridas, populações naturais e cultivadas de diversos organismos vivos, devido a sua relativa simplicidade, rapidez e baixo custo das análises em relação aos outros marcadores (Teixeira et al., 2004).

Estudos realizados com marcadores bioquímicos em *B. mori* contaminados com nucleopolyhedrovírus (NPV) permitiram detectar prováveis marcadores para lagartas infectadas com essa doença.

Em larvas de *B. mori* sadias podem ser observadas 8 isoesterases. A análise das esterases (EST) de larvas do 5º instar desses insetos após infecção com NPV foi realizado por Ruiz (2004). Esse estudo permitiu verificar que a

atividade das esterases em larvas de 5ª idade foi alterada após a infecção viral, pois as esterases 1 e 2 não foram mais detectadas; ocorreu uma redução na intensidade das bandas das esterases 6 e 7; houve um aumento na intensidade das bandas da EST-8; e, foi observada uma nova região de atividade esterásica acima da EST-8.

Nas análises de extratos de glândulas sericígenas por meio de eletroforese SDS-PAGE de larvas de *B. mori* de 5º instar sadias, foram observadas sete regiões protéicas com pesos moleculares variando entre 10 KDa (P1) e 60 KDa (P7) (Ronqui, 2004). Nesse estudo após a infecção de larvas por NPV foi detectado em extratos de glândulas sericígenas de lagartas de 5º instar uma região extra denominada de P8 com peso molecular de 90 KDa.

Tendo em vista a importância no setor econômico, onde há grande procura pela seda, é necessária a realização de estudos de variabilidade nestas linhagens para melhor compreensão desta espécie. Os conhecimentos no grau de variabilidade genética e frequência alélica em determinadas espécies tornam-se essenciais para a compreensão dos fatores que levam a esta diversidade. Estudar a variabilidade destas linhagens contribui com uma melhoria no manejo e conseqüentemente com a produção da sericultura. A detecção de marcadores bioquímicos poderá ser útil para diferenciar as linhagens.

Dessa maneira esse estudo pretendeu avaliar o polimorfismo genético em lagartas do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) de linhagens japonesas e chinesas por meio de isoenzimas para detectar marcadores bioquímicos e investigar a genética de populações para essas linhagens.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Aspectos biológicos de *Bombyx mori* L.

O bicho-da-seda pertence à ordem Lepidoptera, família Bombycidae e espécie *Bombyx mori* L. sendo um inseto de grande importância econômica. Segundo Nakano (1994) a criação do bicho-da-seda originou-se na China por volta de 2.698 a.C.

De acordo com a distribuição geográfica, o bicho-da-seda pode ser ainda classificado e identificado como de origem Japonesa, Chinesa, Européia ou Indiana (Krishnaswami et al., 1979). Podem ser classificados como univoltinos, bivoltinos e multivoltinos, dependendo do número de gerações produzidas no ano, sob condições naturais; ou como tri – mudas, tetra – mudas, penta – mudas, de acordo com o número de mudas durante o crescimento larval, ou finalmente, como raça pura ou com os híbridos (Krishnaswami et al., 1979). O híbrido pode ser monohíbrido, onde estão envolvidas duas linhagens, ou polihíbrido, onde mais de duas linhagens estão envolvidas.

A duração do ciclo de vida de *B. mori* pode ser de 6 a 8 semanas dependendo das linhagens e condições climáticas. Linhagens multivoltinas, em áreas tropicais, tem um ciclo de vida reduzido com estágios de ovo (9 a 12 dias), larva (20 a 24 dias), pupa (10 a 12 dias) e adulto (3 a 6 dias) (Krishnaswami et al., 1973). De acordo com esse autor, em raças univoltinos, o período de ovo pode ser reduzido para 11 a 14 dias, o período larval de 24 a 28 dias, o período pupal de 12 a 15 dias e o estágio de adulto de 8 a 10 dias.

Okino (1982) descreveu variações nas características do ovo (cor, forma), da lagarta (resistência, tamanho, cor, número de gerações/ano, número de ecdises) e do casulo (forma, tamanho, cor, rendimento) do bicho-da-seda em função da sua origem.

Conforme Krishnaswami et al. (1973), a larva do bicho-da-seda origina-se do ovo, e o período larval está dividido em 5 estágios distintos. Os ovos recém postos pela mariposa fêmea possuem coloração amarelada, com o decorrer do tempo ocorrem modificações tornando-se cinza, esverdeado ou azul violeta, onde permanece em repouso na fase de hibernação.

Segundo Okino (1982) as larvas sofrem quatro ecdises (ou mudas) passando por períodos de repouso (ou sono) de 18 a 20 horas, totalizando 25 dias a fase larval. Em relação ao número de ínstaes na fase larval, há variação entre linhages e também entre os sexos (Takahashi, 1994).

A larva eclode após 11 a 14 dias de incubação do ovo, a 25°C. Os períodos entre as ecdises são denominados de ínstaes. O estágio de larva dura aproximadamente 25 dias, e é constituído por 5 ínstaes (idades), assim distribuídos: 1º instar: 3 a 4 dias, 2º instar: 2 a 3 dias, 3º instar: 3 a 4 dias, 4º instar: de 4 a 6 dias, 5º instar: 7 a 8 dias (Okino, 1982; Hanada e Watanabe, 1986).

O período larval é que tem importância direta no tempo de criação, onde as larvas recebem cuidados especiais (Krishnaswami et al., 1973).

A larva do bicho-da-seda quando eclode, em média, mede 3 mm de comprimento e pesa 0,0004 g. É coberta de pêlos escuros, o que lhe confere a cor escura, na fase máxima de desenvolvimento a larva chega a medir 9 cm, e com peso de 4 a 5 g, e assume a coloração branca leitosa (Coutinho Filho, 1967).

Takahashi (1994), comenta que após o 5º instar, a larva está 15.000 vezes mais pesada do que quando eclodiu do ovo e começa a tecer o casulo. Cerca de 3 dias depois, o casulo está pronto, então as larvas sofrem a última ecdise e se transformam em pupa dentro do casulo. Após 10 a 12 dias, a pupa se transforma em mariposa, que amolece os fios da seda na extremidade do casulo, através de um líquido expelido pelo aparelho bucal, permitindo sua saída do casulo, com auxílio das patas. O ciclo da eclosão da larva até o início da postura leva, em média, de 27 a 31 dias.

A metamorfose de uma larva para crisálida pode ser evidenciada ao cessar a alimentação (Doira et al., 1978). De acordo com Krishnaswami et al. (1973) o período de crisálida pode durar de 8 a 14 dias.

O período da eclosão das larvas até a comercialização dos casulos é de 30 a 35 dias, mas como atualmente a maioria dos institutos de produção de ovos, estão sob a responsabilidade das fiações que criam os dois primeiros ínstaes, o sericultor inicia a criação a partir do 3º instar, e a produção de casulos se dá em 25 a 28 dias Takahashi (2001).

Na quinta idade as características do bicho-da-seda mudam, tomando-se o principal objetivo, o crescimento quantitativo do seu corpo, e

conseqüentemente, é o período de produção de matéria prima, sendo que nesta idade quanto melhor a qualidade das folhas de amoreira melhor são os resultados em termos de quantidade e qualidade de casulo (Kohno e Hirakawa, 1991).

Atualmente a criação é feita em grandes sirgarias (barracões) que podem medir até 70 metros de comprimento e 9 metros de largura (Hanada e Watanabe, 1986). As larvas são colocadas sobre esteiras de criação que podem ser constituídas de diversas formas e materiais. A amoreira ainda é à base da alimentação; embora tenha havido progressos no sistema de cultivo, parte da planta e outras características agrônômicas, continua sendo o alimento fornecido em maior proporção para o bicho-da-seda (Hanada e Watanabe, 1986).

A esteira de criação é o local onde as larvas são colocadas para receberem os ramos com as folhas de amoreira para alimentação e pode ser construída de madeira, alvenaria, ou material alternativo, pode ser suspensa por cavalete ou montada diretamente no piso. A esteira de criação deve ter algumas características que facilitem o manejo, tais como: boa aeração, baixa umidade, distância suficiente para colocação dos bosques (suporte para confecção dos casulos) sem prejudicar o manejo, restrição a permanência ou desenvolvimento de agentes patogênicos as lagartas e apresentar características de durabilidade compatível. O tipo de esteira de criação vai interferir diretamente no conforto e sanidade das lagartas, refletindo na produção de casulos e qualidade da seda.

A divisão celular, crescimento celular, digestão das folhas de amoreira, metabolismo celular, processos de ecdise, síntese de material sérico dentre outras, são processos realizados por meio de reações que envolvem, por exemplo, proteínas, enzimas e hormônios cuja atividade é influenciada pela temperatura (Oguino, 2001).

A elevação da temperatura provoca um aumento na velocidade de uma reação química. Assim, a elevação da temperatura ambiente produz uma aceleração da atividade metabólica no bicho-da-seda e com isso o seu crescimento e desenvolvimento serão mais rápidos. Isso ocorre dentro de uma pequena faixa de temperatura, que no caso do bicho-da-seda é de 20 a 30 °C, como na grande maioria dos seres vivos sejam plantas ou animais. Nessa faixa de temperatura, o crescimento e o desenvolvimento desse inseto são cada vez mais rápidos, permitindo ciclos de produção cada vez menores, aumentando o número de criações por ano, mas isso não ocorre progressivamente. Dessa

maneira, cabe ao sericicultor regular a temperatura ambiente para que ela não fique na faixa inadequada às reações químicas, possibilitando assim, o bicho-da-seda viver bem, crescer e produzir bons casulos (Oguino, 2001).

Ito (1978) ao estudar a biologia do bicho-da-seda, concluiu que o crescimento da epiderme ocorre com o aumento do tamanho e no número de células, sendo que estas só aumentam antes da ecdise. As glândulas sericígenas, as glândulas salivares, glândulas acessórias e os túbulos de Malpighi possuem o número definitivo de células desde o nascimento, apenas tendem a se alongar com o crescimento.

Quando a larva está completamente “madura”, segundo Krishnaswami et al. (1973), pára de se alimentar, e excreta fezes moles contendo elevada quantidade de água. Neste estágio, a glândula sericígena da larva ocupa 30% do seu corpo. Segundo Takahashi (1988) as larvas, durante a confecção do casulo reduzem de 15 a 20% do seu peso, sendo que esta redução corresponde ao fio expelido, um total de 1000 a 1500 metros contínuos.

Para fazer o casulo, a larva toca uma superfície sólida com o órgão excretor de seda, fazendo com que o filamento grude nessa superfície, assim, os materiais séricos são arrastados para fora pela força do movimento contínuo da cabeça, até atingir um outro ponto sólido, onde a larva volta a tocar com o órgão excretor de seda, tecendo assim o casulo. É importante observar que sempre a sericina envolve a fibroína. Os materiais séricos dentro da glândula estão na forma coloidal e se torna fio de seda à medida que vão sendo arrastados para fora, e se solidificam em contato com o ar. Tal estrutura é formada porque as duas glândulas se unem num único tubo antes de ganhar o exterior (Ogino, 2002).

A larva faz um movimento de oscilação com a cabeça num padrão como se descrevesse continuamente a figura de um "8" ou "S" durante cerca de três dias, até formar completamente o casulo. A lagarta vai confeccionando o casulo "colando" o filamento na parte interna dos casulos graças à propriedade adesiva da sericina à medida que vai perdendo água por evaporação (Ogino, 2002).

Quando o encasulamento ocorre em ambientes úmidos e sem ventilação, a secagem da sericina será naturalmente lenta, e suas moléculas se organizam numa estrutura cristalina que condiciona um forte poder adesivo da sericina, formando casulos difíceis de serem transformados em fios, pois os filamentos aderem muito firmemente nos pontos de intersecção e se arrebentam ou formam

nós durante o processo de fiação. Ao contrário, se o encasulamento ocorre em ambiente seco e ventilado que possibilita uma secagem rápida da sericina, as suas moléculas formarão uma estrutura amorfa com baixo poder de adesão e, portanto fáceis de serem industrializados (Ogino, 2002).

Após a emergência, uma fêmea multivoltina, segundo Krishnaswami et al. (1973), põe em média 400 ovos, enquanto que nas variedades uni e bivoltinas essa média é de 500 a 600 ovos. Para Doira et al. (1978) e Kantaratanakul et al. (1987), uma mariposa fêmea põe, em média, de 300 a 600 ovos.

As fêmeas são em geral maiores pelo fato de acumularem os ovos, consomem uma maior quantidade de alimento apresentam um período maior de desenvolvimento (Slansky e Scriber, 1985).

Segundo Abreu (1971), o período de vida da mariposa é pequeno e varia de acordo com a linhagem e com a temperatura, sendo que as mariposas das linhagens japonesas vivem, em nosso meio, em média de 10 a 12 dias, enquanto as européias vivem, em média, 16 dias. Segundo Coutinho Filho (1967), dependendo da saúde e vigor da mariposa, ela pode viver de um a trinta dias, utilizando suas reserva de tecido adiposo.

O acasalamento controlado é geralmente, realizado entre mariposas de linhagens diferentes, obtendo-se os híbridos comerciais. Esses indivíduos apresentam maior vigor, são superiores aos das linhagens que lhe deram origem, no que se refere à resistência às moléstias e condições climáticas, facilidade nas criações, rendimento na produção de casulo, na produção de seda, na melhor qualidade e comprimento dos fios (Ono, s.d).

## **2.2. Características das glândulas sericígenas**

O órgão mais importante das lagartas são as glândulas sericígenas (um par), que ocupam a região látero-ventral, do corpo da lagarta. Essas glândulas desembocam em uma estrutura denominada fiadeira, entre os palpos labiais, sendo responsável pela formação do fio da seda, que é composto por 70 a 75% de fibroína, substância protéica elástica resistente e 20 a 25% de sericina, substância protéica gomosa solúvel em água quente ou solução alcalina (Nakano, 1994).

Segundo Ogino (2002) as glândulas sericígenas são divididas em três porções: anterior, mediana e inferior, sendo que o fio de seda é composto por dois filamentos, oriundos de cada uma das glândulas, denominadas de fibroína que são unidas por uma camada de sericina dando aparência de ser um único filamento, assim a fibroína é produzida na parte posterior da glândula sericígenas sob a forma de solução com cerca de 15% de proteína migrando para parte mediana, ela recebe a sericina, que a envolve, este filamento vai gradualmente perdendo água e a densidade aumenta, pouco antes de ganhar o exterior torna-se uma solução bem semelhante a um gel com cerca de 30% de água.

Quando a larva está completamente madura, ela pára de se alimentar, excretando fezes moles contendo elevada quantidade de água. Neste estágio, as glândulas sericígenas da larva ocupam 30% do seu corpo (Arnaut de Toledo, 1996). Durante a confecção do casulo reduzem de 15 a 20% do seu peso, sendo que esta redução corresponde ao fio expelido.

As glândulas sericígenas são constituídas por dois longos tubos que desembocam através de um ducto único no segmento labial. Cada ducto é uma glândula constituída por uma porção distal com função secretora, uma porção mediana com funções de secreção e acúmulo e, finalmente, uma porção proximal que constitui o ducto condutor. Próximo ao ponto de junção das duas glândulas (Porção anterior) há um par de glândulas acessórias, as glândulas de Filippi. (Ito e Kobayashi, 1978).

O fio da seda, produto da secreção das glândulas sericígenas é constituído, sobretudo de fibroína (72,38%) e sericina (22,89%) além de outros elementos secundários como sais minerais, corantes, ácidos graxos entre outros. A quantidade de fibroína e sericina encontradas no fio varia de acordo com a raça e a alimentação das lagartas do bicho-da-seda. A fibroína é produzida na porção posterior e armazenada na porção mediana, onde é envolvida pela sericina. O fio da seda na verdade, um fio único formado no final da porção anterior neste ponto das duas glândulas. Finalmente o fio formado é expelido através de uma proeminência cilíndrica do lábio inferior denominada de fiadeira (Takahashi et al., 2001).

### 2.3. Marcadores moleculares

Na revisão de literatura elaborada por Nagaraju (2000) foi discutido que os estoques genéticos de bicho-da-seda mantidos ao redor do mundo compreendem raças geográficas, mutantes e linhagens, que carregam numerosas características morfológicas, desenvolvimentais, comportamentais e bioquímicas. É estimado que mais de 3000 genótipos sejam mantidos na Ásia e Europa. A diversidade genética encontrada nos dias atuais de linhagens e estoques de elite é resultado principalmente de melhoramento geográfico de raças que apresentam uma variedade de traços qualitativos, quantitativos e bioquímicos. De modo geral, quatro grupos de raças geográficas são identificados: japonesa, chinesa, européia e tropical, que em adição a muitos caracteres visíveis, diferem amplamente em caracteres qualitativos e quantitativos que afetam a produção de seda. Os genótipos de origem temperada produzem altas quantidades de seda enquanto as raças tropicais são produtores pobres, mas são resistentes e capazes de sobreviver sob condições adversas.

Dessa maneira, os marcadores moleculares apresentam várias vantagens sobre os marcadores fenotípicos que estão disponíveis para os estoques genéticos de bicho-da-seda. Eles não são afetados pelo ambiente, podem ser detectados em todos os estágios do desenvolvimento e são ubíquos e cobrem todo o genoma. Muitas técnicas têm sido empregadas com o bicho-da-seda para revelar amplo polimorfismo do genoma (Nagaraju, 2000). As principais são: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), SSR (Simple Sequence Repeats, microsátélites) e ISSR-PCR (Inter Simple Sequence Repeats, utilizando PCR).

Shi e colaboradores (1995) desenvolveram um mapa preliminar para as linhagens p50 e C<sub>108</sub> do bicho-da-seda, utilizando o marcador molecular RFLP. Esses autores empregaram sondas de 15 seqüências de cópias únicas, 36 seqüências anônimas derivadas de uma biblioteca de cDNA folicular e 10 correspondentes a um pequeno número de cópias de retrotransposons. O mapa cobriu um total de recombinações de 413 cM dispersos em 15 grupos de ligação.

Utilizando as mesmas linhagens p50 e C<sub>108</sub>, Promboon et al. (1995), desenvolveram um mapa de ligação por meio de RAPD. O teste com 320 "primers" resultou em 243 produtos polimórficos para as duas linhagens, das quais 168 bandas apresentaram herança mendeliana.

Mapa de ligação de alta densidade contendo 1018 marcadores genéticos representando todos os 27 cromossomos autossômicos e o cromossomo Z foi construído (Yasukochi, 1998).

A maioria dos marcadores obtidos com pares de “primers” RAPD disponíveis comercialmente. Tal fato é um contraste com os estudos iniciais (Promboon et al, 1995; Nagaraja e Nagaraju, 1995) que usaram apenas “primers” randômicos únicos. O uso de pares de “primers” randômicos tem grandes vantagens na construção de um mapa por causa do aumento exponencial de combinações de pares de “primers” utilizando um número limitado de “primers” e maior reprodutibilidade quando comparado aos “primers” únicos. Contudo, esse mapa é um aperfeiçoamento do mapa reportado anteriormente com distâncias de 593 cM baseados em 60 marcadores RFLP, 897, 4 cM baseado em 168 marcadores RAPD e 900, 2 cM baseado em 207 marcadores fenotípicos. Considerando os 560 Mb do genoma do bicho-da-seda o intervalo médio de marcadores fica em torno de ~560 Kb e o parentesco entre as distâncias física e genética é ~250 kb/cM. Esse valor é intermediário entre abelhas melíferas (52 kb;cM) (Hunt e Page, 1995) e a *Drosophila melanogaster* (575 kb/cM) (Merriam et al., 1991). Esses valores estão de acordo com a hipótese de que as taxas de crossing-over são inversamente correlacionadas com o tamanho do cromossomo, porque o tamanho médio dos cromossomos de abelhas melíferas é de 11,1 Mb, 17,1 Mb para o bicho-da-seda e 47 Mb para a *Drosophila melanogaster* (Nagaraju, 2000). A distância geral de mapa de Yasukochi (1998) é de aproximadamente 2cM/marcador.

Marcadores genéticos baseados em microsátélites, que são distribuídos na maioria dos genomas eucarióticos, completam esse critério. Eles têm demonstrado ser extraordinariamente eficientes para realizar mapeamento genético. Estudos recentes têm mostrado que o genoma do bicho-da-seda é abundantemente intercalado com repetições CA/GT e GA/CT. As repetições (GT)<sub>n</sub> ocorrem a cada 49 Kb enquanto repetições (CT)<sub>n</sub> ocorrem, em média, a cada 104 kb no genoma do bicho-da-seda (Reddy et al., 1999). Essas freqüências são comparáveis com aquelas já bem caracterizadas em genomas de ratos e humanos onde mapas intensivos de microsátélites têm sido desenvolvidos. Estudos iniciais mostram que “primers” para locos flanqueadores de microsátélites revelaram freqüências alélicas diferentes entre diferentes linhagens de bicho-da-

seda e a herança no padrão mendeliano. Nas 13 populações de bicho-da-seda analisadas usando 14 locos microsatélite, o número de alelos variou entre três a 17 com valores PIC de 0,66 a 0,90.

O exame de microsatélite conservados entre parentes distantes mariposas *Saturniid* tais como *Antheraea mylitta*, *A. pernyi*, *Philosamia cynthia ricini*, *A. yamamai* e *A. polyphemus* e os padrões de polimorfismo de espécies cruzadas, revelaram que quase um terço dos locos microsatélites de *B. mori* testados são conservados em espécies heterólogas (Goldsmith et al., 1999). Esses resultados mostram que os locos microsatélites provêm-de outro potencial marcador para comparar genomas de Lepidoptera.

Os marcadores ISSR-PCR mostram padrão de herança mendeliana (Reddy et al., 1999). Embora a maioria dos locos ISSR sejam dominantes, eles oferecem várias vantagens sobre RFLP e RAPD para genotipagem. A principal delas é a produção rápida de um grande número de marcadores. Os marcadores ISSR oferecem alta reprodutibilidade devido ao uso de “primers” longos e maior temperatura de anelamento que as utilizadas para RAPD. Devido a essas vantagens acredita-se que essa técnica tem grande potencial na avaliação para acasalamentos e germoplasma do bicho-da-seda.

O DNA “satellite banded krait minor” (Bkm-2(8)) contendo uma seqüência de 545 pb consistindo de 22 repetições GATA foi usado com sonda para detectar polimorfismos de diferentes linhagens do bicho-da-seda. Contudo, foi encontrado um polimorfismo menor que aquele do SSR, a sonda Bkm se revelou muito limpa para perfis “fingerprint”. Essas informações serão úteis para estimar a diversidade genética de germoplasmas de bicho-da-seda (Nagaraju et al., 1995; Sharma et al., 1999).

#### **2.4. Marcadores bioquímicos**

O termo isoenzima foi proposto originalmente por Markert e Moller (1959) como um conceito operacional para designar as diferentes formas moleculares que uma enzima poderia apresentar. Posteriormente, uma definição precisa para o termo se tornou difícil, pois surgiram vários problemas. Por exemplo, as diferentes formas de LDH detectadas eletroforicamente podem ser facilmente

classificadas como isoenzimas; porém, as várias formas das carboxilesterases dificilmente poderiam ser assim consideradas.

Existem evidências de que essas diferentes formas enzimáticas apresentam papel fisiológico distinto nas células. As diversas formas de uma enzima em uma célula catalisam a mesma reação química, mas não necessariamente com a mesma eficiência ou sob as mesmas condições intracelulares. Constituem provas dessa afirmativa a velocidade de renovação das diferentes enzimas que comumente difere entre si, e a variada estabilidade entre essas enzimas sob diferentes condições de pH e força iônica (Markert, 1968).

Kaplan (1963) sugere que a multiplicidade molecular, pelo menos para certas enzimas, tem função na diferenciação das células durante o desenvolvimento embrionário, no aumento da adaptabilidade evolutiva dos organismos, na regulação da atividade celular e no crescimento.

Dessa maneira, as isoenzimas de *B. mori* têm sido estudadas em nível molecular para entendimento do seu papel na fisiologia de insetos. Inclusive, vários genes codificadores de isoenzimas têm sido clonados e suas funções estudadas individualmente.

A aminopeptidase N (APN) (EC 3.4.11.2) é uma enzima que cliva preferencialmente aminoácidos neutros da amina terminal de proteínas ou oligopeptídeos. Esta enzima é amplamente distribuída em animais e plantas. Nos animais, a APN é mais abundante na membrana em borda estriada (em escova) do intestino, e é uma enzima envolvida na digestão de proteínas do alimento. Em adição, a APN é o principal candidato a receptor da toxina Cry de *Bacillus thuriniensis* no intestino de insetos (Nakanishi et al, 2002). Dezoito isoformas de cDNAs de 8 lepidopteras tem sido clonadas e registradas na base de dados: *Bombyx mori*, *Heliothis virescens*, *Plutella xylostella*, *Helicoverpa punctigera*, *Manduca sexta*, *Limantria dispar*, *Plodia interpunctella* e *Epiphyas postvittana*. Oltean e colaboradores (1999) verificaram que as isoformas da APN podem ser agrupadas em pelo menos 4 classes de acordo com dendrograma obtido com análise de seqüências de APN.

A quitinase com 75 KDa é uma enzima com alto potencial para ser utilizada no controle biológico da broca do pinho (*Monochamus alternatus*), foi caracterizada por cromatografia após purificação do integumento em larvas de 5º instar de *B. mori*. A cinética química e análise de padrões de reação utilizando

glicoquitina e N-acetilquitoligossacarídeos como substratos indicaram que a quitinase com 75 KDa é uma enzima hidrolítica do tipo endo - ou random para produzir um produto  $\beta$  anomérico e que prefere os maiores N-acetilquitoligossacarídeos, sugerindo, juntamente com a seqüência de aminoácidos N-terminal, que a quitinase com 75 KDa pertence a família 18 das glicosil hidrolases (Kabir et al., 2006).

Muitas proteínas, incluindo peptídeos bacterianos da hemolinfa, são induzidas por infecções bacterianas. Shiotsuki e Kato (1999) detectaram duas carboxilesterases (CEs) bacterianas induzíveis na hemolinfa de *Bombyx mori*. As EST-1 e 2 foram induzidas por injeção de lipolissacarídeos após 6 horas de infecção por *E. coli*. Os autores verificaram que CEs induzidas por bactérias são diferentes daquelas CEs mono induzidas, incluindo esterases hormônio juvenil, em valores de pI, migração em eletroforese PAGE, e sensibilidade a inibidor.

Contudo, poucos estudos têm sido desenvolvidos com isozimas para avaliar o grau de polimorfismo existente nas linhagens de *B. mori* utilizadas na produção de seda, bem como sua utilização como marcadores bioquímicos dessas linhagens.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material biológico

Foram utilizadas larvas de *Bombyx mori* fornecidas pela COCAMAR – Cooperativa Agroindustrial de diferentes linhagens no segundo dia do 5º instar. Dentre as quinze linhagens analisadas, sete são de origem Japonesa e oito são de origem Chinesa como pode ser observado no Quadro 1. Estas linhagens foram doadas para Universidade Estadual de Maringá e estão mantidas em banco de germoplasma.

Quadro - 1. Linhagens de *Bombyx mori* analisadas e sua origem

Linhagem	Origem	Linhagem	Origem
Lin1	Japonesa HA-B	Lin8	Chinesa C14
Lin2	Japonesa M18-2	Lin9	Japonesa HA-A
Lin3	Chinesa C121-A	Lin10	Chinesa C122-B
Lin4	Japonesa M12-B	Lin11	Japonesa J-1
Lin5	Japonesa M 102	Lin12	Chinesa C24-2
Lin6	Chinesa C24-A	Lin13	Japonesa M19-2
Lin7	Chinesa C209	Lin14	Chinesa C25-B
		Lin15	Chinesa C21

#### 3.2. Métodos

##### 3.2.1. Obtenção das glândulas sericígenas

Após a coleta as larvas foram armazenadas em frascos fechados devidamente identificados, permanecendo em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para a análise laboratorial.

No momento da análise eletroforética as larvas foram dissecadas e tiveram suas glândulas sericígenas retiradas (Figura 1) sob estereomicroscópio em placa de dissecação.



Figura - 1. Glândulas sericígenas de *Bombyx mori* observadas sob estereomicroscópio. sendo: 1 – região anterior, 2 – região mediana, 3 – região posterior. Fonte: BRATAC. Informativo Técnico BRATAC. Departamento de Matéria Prima – Bastos: a. 4. n. 4. 2002.

### 3.2.2. Análise eletroforética

Foram utilizados géis de poliacrilamida (T= 30,8 %; C = 2,6 %) na concentração de 10% acompanhados de géis de empilhamento (T= 10.5 %; C = 4,8 %) a 5%. Os volumes empregados podem ser visualizados no Quadro 2.

Quadro - 2. Volumes dos componentes utilizados no preparo dos géis de separação (T= 30,8 %; C = 2,6 %) em poliacrilamida na concentração de 10% e dos géis de empilhamento (T= 10.5 %; C = 4,8 %)

Reagentes	Gel de separação (10%)	Gel de Empilhamento
Acrilamida 30%/ Bis 0,8%	5,0 mL	3,0 mL
Tampão Tris-HCl	4,0 mL 1,5 M; pH 8,8	3,0 mL 0,24 M; pH 6,8
Água destilada	5,9 mL	30 µL
Persulfato de amônia (2%)	320 µL	250 µL
TEMED	16 µL	3 µL

Os géis foram submetidos à eletroforese em uma voltagem de aproximadamente 200 V durante 4 horas e 30 minutos.

### **3.2.3. Preparo das amostras**

As amostras foram homogeneizadas em tubos para centrífuga (2 mL) em 150  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol e 40  $\mu$ L de tetracloreto de carbono com auxílio de um bastão de vidro e, em seguida, centrifugadas a 12000 gxG por 15 minutos em centrífuga não refrigerada. Foram retirados 20 $\mu$ L do sobrenadante e adicionados 20 $\mu$ L de solução Tris-HCl 0,1 M pH 8,8 contendo glicerol a 10%. Posteriormente 15  $\mu$ L dessa solução foram aplicados no gel.

Alíquotas de cada sobrenadante restante, foram absorvidas em papel de filtro Whatman número 3 e inseridas nos géis de amido.

### **3.2.4. Revelação das esterases (EST - EC 3.1.1.1)**

Após a corrida eletroforética o gel foi incubado por 30 min em 50 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,2. Decorrido esse período de tempo o gel foi incubado por  $\pm$  1 hora em estufa a 38°C, em solução de coloração contendo: 50 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 6,2; 5 mL de N-propanol; 0,06 g de Fast Blue RR Salt; 0,03 g de  $\alpha$ -naftil acetato e 0,02 g de  $\beta$ -naftil acetato.

### **3.2.5. Gel de amido**

Para gel de amido foi utilizada a técnica de eletroforese em sentido horizontal, em géis de amido de milho – Penetrose 30 (CORN PRODUCTS of BRAZIL) na concentração de 14%. A penetrose foi acondicionada em Kitassato, à qual foi adicionada solução tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 7,5 e a mistura foi cozida até adquirir uma consistência viscosa.

Em seguida, o gel foi despejado sobre uma placa de vidro. Após o tempo necessário para o seu resfriamento (1 hora e meia, aproximadamente), o mesmo foi cortado transversalmente a cinco cm de uma das extremidades, onde as amostras foram inseridas verticalmente com o auxílio de um pinça.

O gel foi submetido a um campo elétrico de 9V/cm de gel por 4:30 horas e, após a corrida, foi cortado horizontalmente, obtendo-se, desta forma, três partes homólogas que permitiu a análise de três sistemas enzimáticos.

O sistema tampão utilizado para o gel foi o Tris-HCl pH 7,5 0.02M e para corrida Tris - HCl de 0.3M pH 7,5.

### **3.2.6. Revelação da Fosfatase Ácida (ACP – EC 3.1.3.2)**

A detecção da atividade de fosfatase ácida (ACP) foi realizada empregando-se 0.5mL de cloreto de magnésio 1 M, tampão acetato de sódio 0,05M pH 5,5, 0,04g de Fast Blue RR Salt e 3,5mL de  $\alpha$ -naftil fosfato a 1% de acordo com a metodologia descrita por (Alfenas, 1998).

### **3.2.7. Revelação da fosfatase alcalina (AKP - EC 3.1.3.1)**

Para a visualização da fosfatase alcalina (AKP) foi utilizada solução composta por: 0,5mL de cloreto de magnésio 1 M, tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,5, 0,04g de Fast Blue RR Salt e 3,5ml de  $\alpha$ -naftil fosfato à 1% (Alfenas, 1998).

### **3.2.8. Revelação da anidrase carbônica (CA – EC 4.2.1.1)**

Essa isoenzima foi visualizada utilizando-se solução contendo 0,05g de diacetato de fluoresceína dissolvido em 1 mL de acetona em 8 mL de água.

## **3.3. Análise da genética de populações**

Após a revelação das regiões de atividade das isoenzimas, os locos que foram revelados tiveram seus fenótipos anotados e as frequências gênicas diretamente estimadas, bem como a medida da variabilidade genética, por determinação dos desvios das frequências genotípicas esperadas de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Foram calculados ainda os coeficientes de similaridade e distâncias genéticas para todas as linhagens analisados, utilizando-se o programa Popgene 1.32.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises realizadas em quatro sistemas enzimáticos com as quinze linhagens de *B. mori* L., (entre elas, oito linhagens chinesas e sete linhagens japonesas) foram observados 21 locos, dentre os quais quatro são polimórficos representando 19,05% de polimorfismo, os locos polimórficos são *Est-11*, *Acp*, *Akp*, *Ca*.

Do total de locos detectados 18 são das esterases, contudo apenas a EST-11 foi polimórfica. O alelo mais freqüente foi o *Est-11<sup>A</sup>* (0,8974) e o mais raro foi *Est-11<sup>B</sup>* (0,1026). A freqüência dos alelos para as isoenzimas analisadas podem ser observadas no Quadro 3.

As esterases são uma família de isoenzimas que apresentam uma ampla distribuição, sendo detectadas desde bactérias até humanos, apresentam ampla especificidade a substratos, possuem distribuição diferencial nos tecidos e nas diferentes fases do desenvolvimento.

Pedros e colaboradores (2002) detectaram sete regiões de atividade esterásica em extratos de glândulas sericígenas e da cabeça de *Bombyx mori*. As esterases 1, 2 e 7 foram observadas apenas nos extratos de cabeça, a esterase-5 foi detectada apenas nos extratos das glândulas da seda. Em ambos os extratos foram observadas as esterases 3, 4 e 6. A EST-3 apresentou maior atividade nos extratos das glândulas de seda, e as EST-4 e EST-6 nos estratos de cabeça. O autor afirma que as especificidades encontradas para as esterases em diferentes regiões do corpo e tecido nesses insetos, demonstram o seu papel diferencial durante o desenvolvimento ontogenético.

Além disso, essas isoenzimas apresentam grande número de locos e geralmente são polimórficos. Em *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, cambidae) foram observados oito locos de esterases sendo que a EST-3 foi polimórfica (Ruvolo-Takasusuki et al., 2002).

Em 13 linhagens de *B. mori* analisadas por Prasad et al. (2005), foram encontrados 23 locos microssatélites polimórficos com variação de dois a 14 alelos, com valor de heterozigosidade média de 0,54. Somente 36 (18.2%) de 198 locos microssatélites foram polimórficos entre as duas populações divergentes do bicho-da-seda e 10 (5%) locos apresentaram alelos nulos. O mapa gerado

utilizando esses marcadores polimórficos resultou em 8 grupos de ligação. Os locos microssatélites foram mais conservados no seu ancestral imediato, *B. mandarina*, seguido pelo bicho-da-seda selvagem, *Antheraea assama*.

Quadro - 3. Freqüência alélica dos locos analisados de *Bombyx mori*

Loco	Alelo A	Alelo B	Alelo C
Est-1	1,000	-----	-----
Est-2	1,000	-----	-----
Est-3	1,000	-----	-----
Est-4	1,000	-----	-----
Est-5	1,000	-----	-----
Est-6	1,000	-----	-----
Est-7	1,000	-----	-----
Est-8	1,000	-----	-----
Est-9	1,000	-----	-----
Est-10	1,000	-----	-----
Est-11	0,8974	0,1026	-----
Est-12	1,000	-----	-----
Est-13	1,000	-----	-----
Est-14	1,000	-----	-----
Est-15	1,000	-----	-----
Est-16	1,000	-----	-----
Est-17	1,000	-----	-----
Est-18	1,000	-----	-----
Acp	0,3000	0,3917	0,3083
Akp	0,2500	0,5333	0,2167
Ca	0,4750	0,5250	-----

A heterozigosidade média observada para todos os locos foi de 0,0350, enquanto a heterozigosidade esperada de acordo com Nei (1973) foi de 0,0929 (Quadro 4). Esses resultados sugerem que há baixa heterozigosidade para os

locos analisados. Os resultados mostram que essas linhagens podem ser cruzadas com outras linhagens para o melhoramento genético.

Quadro - 4. Heterozigosidade média de isoenzimas para os locos analisados das 15 linhagens de *Bombyx mori*

Loco	Número de Alelos	Heterozigosidade Observada	Heterozigosidade Esperada
Est-1	64	0,0000	0,0000
Est-2	112	0,0000	0,0000
Est-3	120	0,0000	0,0000
Est-4	66	0,0000	0,0000
Est-5	100	0,0000	0,0000
Est-6	96	0,0000	0,0000
Est-7	72	0,0000	0,0000
Est-8	18	0,0000	0,0000
Est-9	104	0,0000	0,0000
Est-10	22	0,0000	0,0000
Est-11	78	0,1026	1,1841
Est-12	4	0,0000	0,0000
Est-13	120	0,0000	0,0000
Est-14	82	0,0000	0,0000
Est-15	70	0,0000	0,0000
Est-16	12	0,0000	0,0000
Est-17	36	0,0000	0,0000
Est-18	38	0,0000	0,0000
Acp	120	0,2833	0,6615
Akp	120	0,1333	0,6061
Ca	120	0,2167	0,4988
Média	75	0,0350	0,0929
Desvio padrão		± 0,0808	± 0,2129

O índice de fixação ( $F_{is}$ ) para as isozimas analisadas foi - 0,0452, indicando que ainda há excesso de heterozigotos e que provavelmente não há endocruzamento entre linhagens. O alto valor de  $F_{st}$  (0,676) permite sugerir que as linhagens estão bem diferenciadas e que não ocorre fluxo gênico entre elas (0,1194). Esses resultados podem ser observados no Quadro 5.

Quadro - 5. Valores do Índice de Fixação ( $F_{is}$ ), grau de diferenciação ( $F_{st}$ ) e fluxo gênico ( $Nm$ ) para as linhagens analisadas de *Bombyx mori*

Loco	$F_{is}$	$F_{st}$	$Nm$
Est-1	-----	1,0000	0,0000
Est-2	-----	1,0000	0,0000
Est-3	-----	0,0000	-----
Est-4	-----	1,0000	0,0000
Est-5	-----	1,0000	0,0000
Est-6	-----	1,0000	0,0000
Est-7	-----	1,0000	0,0000
Est-8	-----	1,0000	0,0000
Est-9	-----	1,0000	0,0000
Est-10	-----	1,0000	0,0000
Est-11	- 0,4237	0,9020	0,0271
Est-12	-----	1,0000	0,0000
Est-13	-----	0,0000	-----
Est-14	-----	1,0000	0,0000
Est-15	-----	1,0000	0,0000
Est-16	-----	1,0000	0,0000
Est-17	-----	1,0000	0,0000
Est-18	-----	1,0000	0,0000
Acp	0,1656	0,4867	0,2637
Akp	0,0000	0,800	0,0705
Ca	- 0,5522	0,7201	0,0972
Média	- 0,0452	0,6767	0,1194

A análise de 15 locos microssatélite de 13 linhagens de *Bombyx mori* detectou um número de três a 17 alelos, com valor de heteroziguidade variando entre 0.66 a 0.90 foi obtido por Reddy et al. (1999). Esses microssatélites permitiram aos autores obterem alelos para linhagens que entram em diapausa e que não entram em diapausa.

Os cruzamentos para obtenção de híbridos de bicho-da-seda são realizados por meio de cruzamentos simples entre duas raças parentais do bicho-da-seda, normalmente raças japonesas cruzadas com raças chinesas, obtém-se os chamados híbridos diretos (Krishnaswami et al., 1979). Outra forma de produção de híbridos é feita pelo acasalamento de dois híbridos F1 produzidos por diferentes combinações de raças japonesas e chinesas do *Bombyx mori* L., podem ser definidos como híbridos de duplo cruzamento ou híbridos tetra-parentais (Nagaraju, 2002). Assim, o estudo realizado poderá contribuir com a indicação de quais linhagens japonesas e chinesas apresentam menor variabilidade, sendo consideradas puras e que, portanto, poderão ser utilizadas em cruzamentos para o desenvolvimento de híbridos que apresentem melhores resultados quanto ao seu desempenho na produção de seda.

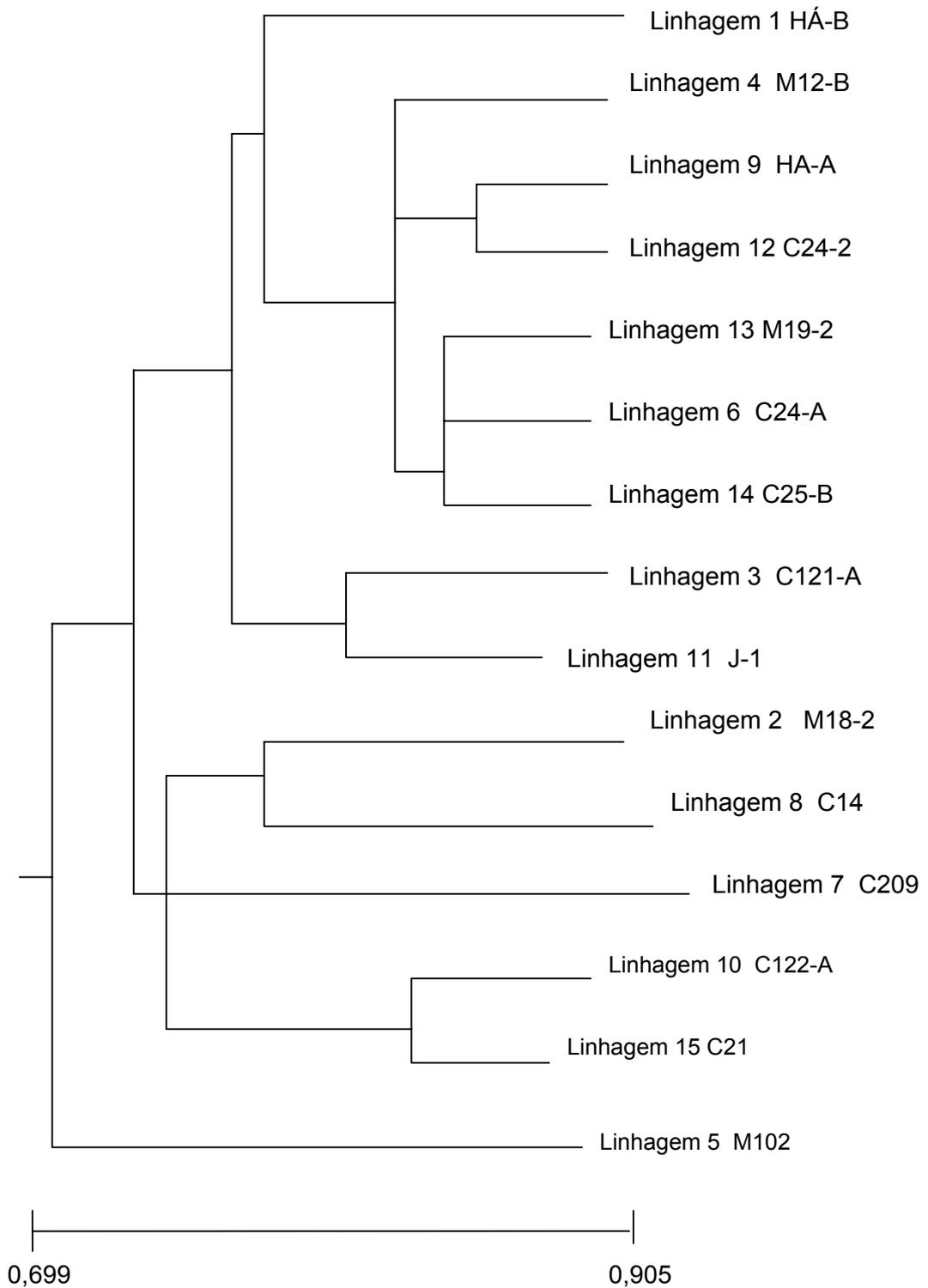
A maior distância genética observada ocorreu entre as linhagens 10 (C122-B) e 3 (C121-A) (0,8373) e a menor distância foi detectada entre as linhagens 5 (M102) e 1(HÁ-B) correspondendo a 0,1056 (Quadro 6). Os valores obtidos pela distância genética de Nei (1978) mostram que as linhagens são distintas

Contudo, quando observa-se o dendrograma baseado na distância de Nei (1978) obtido pelo método de UPGMA (Figura 5), pode-se verificar que as linhagens japonesas e chinesas não puderam ser totalmente separadas pelos sistemas isoenzimáticos analisados. Esses resultados indicam que essas matrizes ainda conseguem formar subpopulações, podendo produzir híbridos.

As matrizes que compõem essas linhagens estão sendo mantidas por cruzamentos que podem estar promovendo uma redução da variabilidade genética, seria importante continuar avaliando o grau de polimorfismo dessas linhagens, para que não ocorra um aumento acentuado da homozigose levando a expressão de genes deletérios que podem promover alta mortalidade das matrizes.

Quadro - 6. Identidade genética (diagonal superior) e distância genética (diagonal inferior) segundo Nei (1978) para linhagens chinesas e japonesas

Lin	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	****	0,6745	0,8742	0,8204	0,8998	0,6897	0,7694	0,8875	0,8725	0,6146	0,8116	8,8831	0,6684	0,6600	0,6232
2	0,33937	****	0,7522	0,7059	0,6912	0,5685	0,5463	0,6423	0,6595	0,4735	0,5665	0,6031	0,8626	0,6371	0,6795
3	0,1344	0,2848	****	0,7581	0,7653	0,5221	0,6852	0,7784	0,206	0,4329	0,5994	0,7603	0,6921	0,5601	0,5367
4	0,1980	0,3483	0,2770	****	0,7719	0,6467	0,8172	0,7201	0,7503	0,4541	0,6157	0,6897	0,7002	0,6737	0,7076
5	0,1056	0,3693	0,2675	0,2588	****	0,6949	0,7655	0,8220	0,8707	0,5883	0,8529	0,8270	0,6827	0,7051	0,5524
6	0,3715	0,5648	0,6499	0,4358	0,3640	****	0,6143	0,6954	0,7154	0,5687	0,6677	0,6159	0,6317	0,6517	0,7259
7	0,2621	0,6047	0,3780	0,2019	0,2672	0,4872	****	0,7713	0,7937	0,5165	0,6563	0,6789	0,5268	0,7187	0,5945
8	0,1194	0,4427	0,2505	0,3284	0,1960	0,3633	0,2597	****	0,8330	0,7405	0,7341	0,8841	0,6317	0,6748	0,7403
9	0,1364	0,4162	0,3277	0,2873	0,1385	0,3349	0,2311	0,1828	****	0,6347	0,8543	0,8373	0,6521	0,6785	0,5944
10	0,4868	0,7477	0,8373	0,7894	0,5304	0,5644	0,6608	0,3004	0,4546	****	0,7264	0,7357	0,5347	0,6078	0,6844
11	0,2087	0,5683	0,5118	0,4849	0,1591	0,4039	0,4212	0,3092	0,1574	0,3196	****	0,8859	0,6291	0,6436	0,5854
12	0,1243	0,5057	0,2740	0,3715	0,1899	0,4847	0,3837	0,1231	0,1775	0,3070	0,1212	****	0,6525	0,6736	0,6557
13	0,4028	0,1477	0,3680	0,3564	0,3818	0,4593	0,6410	0,4594	0,4275	0,6261	0,4635	0,4269	****	0,6721	0,7523
14	0,4155	0,4508	0,5797	0,3951	0,3494	0,4282	0,3303	0,3934	0,3879	0,4979	0,4406	0,3952	0,3974	****	0,6878
15	0,4729	0,3864	0,6224	0,3458	0,5935	0,3204	0,5200	0,3007	0,5202	0,3792	0,5355	0,4221	0,2846	0,3742	****



**Figura 3.** Dendrograma de distância genética construído pelo método UPGMA baseado em Nei (1978) entre linhagens chinesas e japonesas de *Bombyx mori*.

Vários estudos têm sido desenvolvidos com marcadores moleculares em bicho-da-seda, para detectar o grau de polimorfismo, desenvolver mapas de ligação para genes associados à produção de seda e mapeamento de genes de interesse econômico.

Prasad e colaboradores (2005) avaliaram a frequência e a distribuição de microssatélites em 21.76-Mb de seqüências randômicas do genoma, 0.67-Mb em seqüências BAC do cromossomo de Z, e 6.3-Mb de seqüências EST (Expressed Sequence Tags) de *Bombyx mori*. Nesse estudo foi realizada a estimativa de microssatélites em 0,31% do genoma desse inseto.

O primeiro mapa de ligação em *Bombyx mori* por meio do marcador AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) foi desenvolvido por Tan et al. (2001). O mapeamento por meio de AFLP foi realizado genotipando 47 progênies de uma população retrocruzada. Os autores encontraram um total de 1248 (60.7%) de polimorfismo detectado com 35 combinações de primers com adaptador PstI/TaqI. Sendo que cada uma das combinações de primer gerou uma média de 35.7 marcadores polimórficos. Um total de 44% dos marcadores polimórficos foi consistente com a relação de segregação de 1:1 com nível de significância  $P = 0,05$ . O comprimento total desse mapa AFLP foi de 6512 cM. As distâncias genéticas entre dois marcadores vizinhos variaram de 0.2 a 47 cM com uma média de 18.2 cM. O gene ligado ao sexo od foi situado entre os marcadores P1T3B40 e P3T3B27 na extremidade do grupo três, indicando que o grupo de ligação AFLP 3 estava no cromossomo Z (sexual).

Chatterjee e Pradeep (2004) desenvolveram um estudo para identificar marcadores moleculares associados com os parâmetros do crescimento e do rendimento no bicho-da-seda. Assim, foram gerados perfis de RAPD com os sete primers UBC para 14 linhagens de bicho-da-seda, originados de China, Japão, Índia, e Rússia, foram analisados estatisticamente. A análise regressão múltipla estabeleceu associação significativa de 45 marcadores com o desenvolvimento larval, os índices do crescimento e os quatro parâmetros do rendimento do casulo relevantes para a produção de seda.

Miao e colaboradores (2005) estabeleceram um denso mapa de ligação utilizando 518 seqüências SSR – “Simple Sequence Repeat” ou microssatélites em *Bombyx mori*, como parte de um programa genômico internacional. Nesse estudo foram utilizadas 6 linhagens representativas, tendo sido empregados 2500

marcadores microssatélites (CA)<sub>n</sub> e (CT)<sub>n</sub>. Esses marcadores revelaram um polimorfismo entre 17-24%, indicando um alto grau de homozigosidade resultante da longa história de endocruzamentos desses insetos.

Os estudos com marcadores moleculares indicam que o genoma do bicho-da-seda está sendo amplamente estudado, para o desenvolvimento de melhores linhagens desses insetos.

A análise desenvolvida com isoenzimas poderá contribuir com o entendimento da expressão de genes funcionais em diferentes momentos do desenvolvimento, no polimorfismo apresentado por diferentes locos e que podem contribuir com uma rápida caracterização das linhagens para seu manejo em cruzamentos e ser associada aos estudos moleculares para um conhecimento mais amplo do genoma de *Bombyx mori*.

## 5. CONCLUSÕES

A avaliação genética de oito linhagens chinesas e sete linhagens japonesas de *B. mori* permitiram verificar que elas apresentam baixa heterozigosidade média, as linhagens estão bem diferenciadas, mas, ainda conseguem formar subpopulações. Porém, o dendrograma representa as linhagens que estão próximas geneticamente e, sendo assim, estas não são importantes para os cruzamentos no melhoramento genético desta espécie.

As linhagens analisadas apresentam material genético que pode ser utilizado em estudos posteriores de melhoramento genético para obtenção de melhores híbridos para produção de seda.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, O.C. **Preparo técnico de ovos do bicho-da-seda**. São Paulo: Instituto de Zootecnia, 1971. 108 p.

AGRONLINE, 2004- <http://www.agronline.com.br/agronoticias/noticia.php?id=471>, (acesso em 30/05/2006).

ALFENAS, A.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: SIF, 1999. 242 p.

ARNAUT DE TOLEDO, J.O. **Análise do desempenho biológico e das características tecnológicas do casulo de raças puras e híbridos de bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.)**. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus Jaboticabal, 1992. 92 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia).

BRANCALHÃO, R.M.C. Vírus Entonopatogênicos no bicho-da-seda. **Revista Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento**, 24:54-58, 2002.

BRATAC. **Informativo Técnico BRATAC**. Departamento de Matéria Prima – Bastos, 2003.

CHATTERJEE, S.N.; PRADEEP, A.R. Molecular Markers (RAPD) Associated with Growth, Yield, and Origin of the Silkworm, *Bombyx mori* L. In India. **Russian Journal of Genetics**, 39:1365-1377, 2003.

COUTINHO FILHO, F. **Sericicultura**. Rio de Janeiro: Serviço de Informação Agrícola, 1967. 24 p.

DOIRA, H. **The silkworm: An important laboratory tool**. Tokyo: Kodansha, 1978. 307 p.

EVANGELISTA, A. **Índices nutricionais e desempenho do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) alimentados com diferentes cultivares de amoreira.** Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus Jaboticabal, 1994. 89 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia).

FONSECA, A.S.; FONSECA, T.C.; SCHAMMASS, E.A. Competição de híbridos naturais e artificiais de amoreira. **Boletim da Indústria Animal**, 43:367-373, 1986.

FONSECA, A.S.; FONSECA, T.C. Cultura da amoreira e criação do bicho-da-seda: **Sericicultura**. São Paulo: Nobel, 1986. 246 p.

GOLDSMITH, M.; SHIMADA, T.; YASUKOCHI, Y.; MITA, K.; NAGARAJU, J. **Intl. Conf. Inv. Transgenesis**, Crete:Greece, 20:29–31, 1999.

HANADA, Y.; WATANABE, J.K. **Manual de criação do bicho-da-seda**. Curitiba: COCAMAR, 1986. 224 p.

ITO, T.; KOBAYASHI, M. Rearing of the silkworm. In: TAZIMA, Y. **The silkworm: an important laboratory tool**. Tokyo: Kodansha, 1978. p.102.

HUNT, G.J.; PAGE, R.E. Linkage Map of the Honey Bee, *Apis mellifera*, based on RAPD markers. **Genetics**, 139:1371– 1382, 1995.

KABIR, K.E.; HIROWATARE, D.; WATANABE, K.; KOGA, D. Purification and characterization of a novel isozyme of chitinase from *Bombyx mori*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 70:252-262, 2006.

KANTARATANAKUL, S.; THARVORNANULKIT, C.; WONGTHONG, S.; CHAREONYING, S.; CAMPIRANON, A.; SAKSSONG, P. Heterosis in F1 hybrid between polyvoltine and bivoltine silkworm (*Bombyx mori*) L. **Sericologia**, 27:373 - 380, 1987.

KAPLAN, N.O. Symposium on multiple forms of enzymes and control mechanisms. I. Multiple forms of enzymes. **Bact. Rev.**, 27:155-169, 1963.

KAWANO, T.; KATAOKA, H.; NAGASAWA, H.; ISOGAI, A.; SUZUKI, A. cDNA Cloning and Sequence Determination of the Pheromone Biosynthesis Activating Neuropeptide of the Silkworm, *Bombyx mori*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 189:221–226, 1992.

KOHNO, A.; HIRAKAWA, F. **Yuuryoken zoosan no advice- Haissan Kara joozoku made**. In the Sanshi no Hikari:Japan, 1991. 26 p.

KRISHNASWAMI, S. **Sericulture manual**. 2-Silkworm rearing. Roma: F.A.O. 1973. 131 p.

KRISHNASWAMI, S. **Sericulture manual**. 2-Silkworm rearing. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1979. 131 p.

MARKERT, C.L. The molecular basis of isozymes. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 151:14-40, 1968.

MARKERT, C.L.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 45:753-763, 1959.

MIAO, X.; XU, S.; LI, M.; LI, M.; HUANG, J.; DAI, F.; MARINO, S.W.; MILLS, D. R.; ZENG, P.; MITA, K.; JIA, S.; ZHANG, Y.; LIU W.; XIANG, H.; GUO, Q.; XU, A.; KONG, X.; LIN, H.; SHI, Y.; LU, G.; ZHANG, X.; HUANG, W.; YASUKOCHI, Y.; SUGASAKI, T.; SHIMADA, T.; NAGARAJU, J.; XIANG, Z.; WANG, S.; GOLDSMITH, M.R.; LU, C.; ZHAO, G.; HUANG, Y. Simple Sequence Repeat-Based Consensus Linkage Map of *Bombyx mori*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 102:16303–16308, 2005.

MERRIAM, J.; ASHBURNER, M.; HARTL, D.L.; KAFATOS, F.C. Toward Cloning and Mapping the Genome of *Drosophila*. **Science**, 254:221–225, 1991.

MICHAILLE, J.J.; COUBLE, P.; PRUDHOMME, J.C.; GAREL, A. A single Gene Produces Multiple Sericin Messenger RNAs in the Silk Gland of *Bombyx mori*. **Biochimie**, 68:1165–1173, 1986.

MICHAILLE, J.J.; GAREL, A.; PRUDHOMME, J.C. Cloning and Characterization of the Highly Polymorphic Ser2 Gene of *Bombyx mori*. **Gene**, 86:177–184, 1990.

MITA, K.; ICHIMURA, S.; JAMES, T.C. Highly Repetitive Structure and its Organization of the Silk Fibroin Gene. **J. Mol. Evol.**, 38:583–592, 1994.

NAGARAJA, G.M.; NAGARAJU, J. Genome Fingerprinting of the Silkworm, *Bombyx mori*, Using Random Arbitrary Primers. **Electrophoresis**, 16:1633–1638, 1995.

NAGARAJU, J. Application of genetic principles for improving silk production. **Current Science**, 83:([www.cdfd.org.in/~swamy/jnag/409.pdf](http://www.cdfd.org.in/~swamy/jnag/409.pdf)), 2002.

NAGARAJU, J. Recent Advances in Molecular Genetics of the Silk Moth, *Bombyx mori*. **Current Science**, 78:151-161, 2000.

NAGARAJU, J.; SHARMA, A.; SETHURAMAN, B.N.; RAO, J.V.; SINGH, L. DNA Fingerprinting in Silkworm *Bombyx mori* Using Banded Krait Minor Satellite DNA-derived Probe. **Electrophoresis**, 16:1639–1642, 1995.

NAKANISHI, K.; YAOI, K.; NAGINO, Y.; HARA, H.; KITAMI, M.; ATSUMI, S.; MIURA, N.; SATO, R. Aminopeptidase N isoforms from the midgut of *Bombyx mori* and *Plutella xylostella* their classification and the factors that determine their binding specificity to *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin. **FEBS Letters**, 519:215-220, 2002.

NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S. **Entomologia agrícola**. Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiros: Piracicaba, 10:234-242, 1994.

NIIMI, T.; YAMASHITA, O.; YAGINUMA, T. Structure of the *Bombyx* Sorbitol Dehydrogenase Gene: A Possible Alternative Use of the Promoter. **Insect Mol. Biol.**, 5:269–280, 1996.

OGINO, R.K. **Manejo do bicho-da-seda**: Fundamentos Informativo Técnico BRATAC:Departamento de Matéria Prima. 2002.

OGUINO, R. **Manejo do bicho - da - seda**: Fundamentos. Informativo Técnico BRATAC:Bastos. 2001.

OKINO, I. **Manual de sericicultura**. Bauru. 1982. 80 p.

OLTEAN, D.I.; PULLIKUTH, A.K.; LEE, H.K.; GILL, S. **Appl. Environ. Microbiol.**, 65:4760-4766, 1999.

ONO, B.H. **Instituto de sementagem**. Paraná, s. d. 11 p. (Apostila).

PEDROS, RB. **Atividade das esterases em larvas de *bombyx mori* L.** In: 48º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 2002. Águas de Lindóia: SP. 2002.

PROMBOON, A.; SHIMADA, T.; FUJIWARA, F.; KOBAYASHI, M. Linkage Map of Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs) in the Silkworm, *Bombyx mori*. **Genet. Res. Camb.**, 66:1–7, 1995.

REDDY, K.D.; ABRAHAM, E.G.; NAGARAJU, J. Microsatellites in the Silkworm, *Bombyx mori*: Abundance, Polymorphism, and Strain Characterization. **Genome**, 42:1057-1065, 1999.

REDDY, K.D.; NAGARAJU, J.; ABRAHAM, E.G. Genetic Characterization of the Silkworm *Bombyx mori* by Simple Sequence Repeat (SSR)-anchored PCR Heredity. **Genome**, 42:681-687, 1999.

RONQUI, L. **Caracterização das Proteínas Totais em Lagartas do Bicho-da-seda (*Bombyx Mori* L.) Sadias e Infectadas por Nucleopolyhedrovírus e Utilização de P8 como Marcador da Infecção.** Umuarama:Universidade Paranaense, 2004. 18p. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas).

RUIZ, J. B. **Avaliação Eletroforética das Enzimas Esterases em Lagartas de *Bombyx mori* L. Sadias e Infectadas por Nucleopolyhedrovírus.** Umuarama:Universidade Paranaense, 2004. 18p. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas).

RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C.; MACHADO, M.F.P.S.; CONTE, H. Esterase-3 polymorphism in the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae). **Genetics and Molecular Biology**. 25:61-64, 2002.

SATO, Y.; OGUCHI, M.; MENJO, N.; IMAI, K.; SAITO, H.; IKEDA, M.; ISOBE, M.; YAMASHITA, O. Precursor Polyprotein for Multiple Neuropeptides Secreted from the Suboesophageal Ganglion of the Silkworm *Bombyx mori*: Characterization of the cDNA Encoding the Diapause Hormone Precursor and Identification of Additional Peptides. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 90:3251–3255, 1993.

SHARMA, A.; NIPHADKAR, M.P.; KATHIRVELU, P.; NAGARAJU, J.; SINGH, L. DNA Fingerprint Variability Within and Among the Silkworm *Bombyx mori* Varieties and Estimation of their Genetic Relatedness Using Bkm-derived Probe. **J. Hered.**, 90:315–319, 1999.

SHI, J.; HECKEL, D.G.; GOLDSMITH, M.R.A Genetic Linkage Map for the Domesticatedsilkworm, *Bombyx mori*, Based on Restriction Fragment Length Polymorphisms. **Genet. Res.**, 66:109–126, 1995.

SHIOTSUKI, T.; KATO, Y. Induction of carboxylesterase isozymes in *Bombyx mori* by *E. Coli* infection. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 29:731–736, 1999.

SLANSKY JR., F.; SCRIBER, J.M. Food consumption and utilization. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. eds., **Comprehensive insects physiology biochemistry and pharmacology**. Oxford, Pergamon Press, 4:87 – 163, 1985.

SU, Z.H., SATO, Y., YAMASHITA, O. Purification, cDNA Cloning and Northern Blot Analysis of Trehalase of Pupal Midgut Of The Silkworm, *Bombyx mori*, **Biochem. Biophys. Acta**, 1173:217–224, 1996.

SUZUKI, Y., BROWN, D.D. Isolation and Identification of the Messenger RNA for Silk Fibroin From *Bombyx mori*. **J. Mol. Biol.**, 63:409–429, 1972.

TAKAHASHI, R. **Sericicultura**. FCAV Jaboticabal, 1994. 134 p. (Apostila)

TAKAHASHI, R. **Sericicultura**: Amoreira (*Morus alba* L.) Bicho-da-Seda (*Bombyx mori* L.). Jaboticabal: FCAV/UNESP. 1988. 135 p., (Apostila).

TAKAHASHI, R.; TAKAHASHI, K.M.; TAKAHASHI, L.S. **Sericicultura uma promissora exploração agropecuária**. Jaboticabal: FUNEP, 2001. 126 p.

TAN, Y.D., WAN, C.L., ZHU, Y.F., LU, C., XIANG, Z.H., DENG, H.W. An Amplified Fragment Length Polymorphism Map of the Silkworm. **Genetics**, 157:1277–1284, 2001.

TEIXEIRA, A.S.; CHAVES, L. da S.; YUYAMA, K. Esterases no exame da estrutura populacional de camucamu (*Myrciaria dúbia* (Kunth) Mc Vaugh-Murtaceae). **Acta Amazônia**, 34:89-96, 2004.

UENO, K., HUI, C. C., FUKUTA, M., SUZUKI, Y. Molecular Analysis of the Deletion Mutants in the E Homeotic Complex of the Silkworm *Bombyx mori*. **Development**, 114:555–563, 1995.

UENO, K., NAGATA, K., SUZUKI, Y., Molecular Model Systems in the Lepidoptera (eds Goldsmith, M. R. and Wilkins, A. S.), Cambridge University Press, 1996, pp.

165–180. In: NAGARAJU, J. Recent Advances in Molecular Genetics of the Silk Moth, *Bombyx mori*. **Current Science**, 78:151-161, 2000.

XUE-XIA, M; XUB, S.; LIA, M.; HUANGA, I.; DAIE, A.; MARINOF, S.W.; MILLSF, D.R.; ZENGF, P.; MITAG, K.; JIA, S.; ZHANG, Y.; LIU, W.; XIANG, H.; GUO, Q.; XU, A.; KONG, X.; LIN, H.; SHI, Y.; LU, G.; ZHANG, X.; HUANG, W.; YASUKOCHI, Y.; SUGASAKI, T.; SHIMADA, T.; NAGARAJU, J.; XIANG, Z.; WANG, S.; GOLDSMITHF, M.; LUE, C.; ZHAOA, G.; HUANG, Y. Simple sequence repeat-based consensus linkage map of *Bombyx mori*. **PNAS**, 102:16303–16308, 2005.

YAMAGUCHI, K., KIKUCHI, Y., TAKAGAI, T., KIKUCHI, A., OYAMA, F., SHIMURA, K., MIZUNO, S. Primary Structure of the Silk Fibroin Light Chain Determined by cDNA Sequencing and Peptide Analysis. **J. Mol. Biol.**, 210:127–139, 1989.

YASUKOCHI, Y. A Dense Genetic Map of the Silkworm, *Bombyx mori*, Covering all Chromosomes Based on 1018 Molecular Markers. **Genetics**, 150:1513–1525, 1998.

WATANABE, J.K.; YAMAOKA, R.S.; BARONI, S.A. **Cadeia produtiva da seda: diagnóstico e demandas atuais**. Londrina, Paraná: IAPAR, 2000. p 33.

# 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](#)