

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO

ROXELLE ETHIENNE FERREIRA MUNHOZ

**Variabilidade genética de raças e híbridos simples de *Bombyx mori*  
L. do banco de germoplasma da Universidade Estadual de Maringá**

MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
SETEMBRO - 2010

ROXELLE ETHIENNE FERREIRA MUNHOZ

**Variabilidade genética de raças e híbridos simples de *Bombyx mori*  
L. do banco de germoplasma da Universidade Estadual de Maringá**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do Título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Fernandez.

MARINGÁ  
PARANÁ - BRASIL  
SETEMBRO - 2010

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Munhoz, Roxelle Ethienne Ferreira

F966v      Variabilidade genética de raças e híbridos simples de Bombyx mori L. do banco de germoplasma da Universidade Estadual de Maringá / Roxelle Ethienne Ferreira Munhoz. -- Maringá, 2010.

93 f. : il., figs.

Orientador: Prof.a Dr.a Maria Aparecida Fernandez.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro Ciências Agrárias, Departamento de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, 2010.

1. Bombyx mori - Melhormaneto genético. 2. Marcadores ISSR. 3. Bicho da seda I. Fernandez, Maria Aparecida, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro Ciências Agrárias. Departamento de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. III. Título.

Aos meus pais, Diogo Gomes Alves Munhoz e Elen Márcia Ferreira Munhoz, pelo amor e carinho com que conduziram minha formação.

Ao meu marido, Rogério Leandro Rodrigues, pelo apoio constante.

Às minhas avós, Ilza e Ubaldina, pela bondade comigo.

Às minhas queridas irmãs, que tanto amo, Babye e Thalita Munhoz, pelo carinho e atenção.

Aos meus sogros, Cleonice e João Carlos, e ao meu cunhado, Fernando, por toda a colaboração nos momentos difíceis.

E a todos os sericultores e demais trabalhadores do setor sericícola do Brasil por toda a dedicação despendida a esta atividade agropecuária, por vezes menosprezada, mas tão laborosa e relevante.

**Com carinho, dedico.**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade de realização deste curso e deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, seus funcionários e corpo docente, pelo apoio e ensinamentos.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (Capes), pela concessão de bolsa de estudos.

À minha orientadora, professora doutora Maria Aparecida Fernandez, pela confiança, pela orientação, disponibilidade, estímulo, dedicação e amizade. Agradeço imensamente a oportunidade de realizar este trabalho e a liberdade científica que tive para isso.

Ao co-orientador, professor doutor Carlos Alberto Scapim, pela paciência, orientação estatística e colaboração em diversas etapas do trabalho.

Ao Instituto de Zootecnia da Agência Paulista de Tecnologia em Agronegócios, regional do município de Gália-SP pela colaboração na criação dos genótipos de bicho-da-seda.

À pesquisadora, doutora Fumiko Okamoto pela amizade e pelas orientações indispensáveis.

À prefeitura do município de Nova Esperança, aqui representadas pela prefeita Mali Benatti, pelo vice-prefeito Júnior Mozer e pelo Secretário de Agricultura Laércio Salvaterra pelo suporte no desenvolvimento dos ensaios na sirgaria experimental.

Às empresas Fiação de Seda Bratac e Fujimura do Brasil, pela doação de lagartas de híbridos comerciais e pelo suporte técnico.

Ao lapar, nas pessoas de Ruy Yamaoka e Namir Filipin, pela doação de ramas de amoreira.

Ao senhor Jorge Susuki, pelos ensinamentos inestimáveis e pelo acompanhamento durante os trabalhos iniciais de obtenção das lagartas (incubação dos ovos).

Ao professor doutor Alberto José Prioli, meu primeiro orientador, pela ajuda na análise estatística da variabilidade genética e pelos ensinamentos fundamentais ao longo da minha carreira científica.

À professora doutora Maria Celeste Gonçalves Vidigal, pelo incentivo, apoio e amizade.

Aos professores doutores José Ricardo Falco, Odinete Murari, Ana Silvia Lapenta, Adriana Gonela, Maria Cláudia Ruvollo Takasusuki e ao pesquisador Antônio José Porto, pelas preciosas sugestões para este trabalho.

À Pedrina Gonçalves Vidigal, pelo auxílio na redação dos abstracts.

Ao meu marido, Rogério Leandro Rodrigues, pelo auxílio na formatação do texto e das figuras, pelo incentivo, amor e confiança no desenvolvimento desta etapa da minha vida. Sou grata pela paciência nos momentos de ausência e pelo suporte que me permitiu realizar este trabalho.

À amiga de longa data, Juliana Pereira Bravo, que me incentivou a não desistir do sonho de fazer doutorado e que me apresentou às pesquisas com bicho-da-seda. Serei eternamente grata por isso.

Aos colegas do Laboratório de Organização Funcional do Núcleo, pelas proveitosas conversas e pelas experiências trocadas. Agradeço especialmente aos colegas do Grupo de Pesquisas com Bicho-da-Seda, Karen, Simone, Jeronimo, Bruno, Lydia, Rafaela, Naiara, Amanda, Carlos, José Renato, Cláudia e Fabiana, pela preciosa ajuda na condução dos experimentos.

Às melhores amigas que uma pessoa pode ter: Rosana Rigonato, Andréia Assunção, Andréia Isaac, Elizabete Sekine, Patricia Zonetti, Bianca Lemos, Fabricie Wilbert e Kátia Ferreira por todas as palavras de estímulo e por fazer minha vida muito mais fácil e divertida.

Enfim, agradeço a todos que colaboraram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

## BIOGRAFIA

ROXELLE ETHIENNE FERREIRA MUNHOZ, filha de Diogo Gomes Alves Munhoz e de Elen Márcia Ferreira Munhoz, nasceu em 13 de setembro de 1976, em Maringá, Estado do Paraná.

Iniciou o Ensino Fundamental no Colégio Cristo Rei, em 1983, concluindo-o no Colégio Estadual Marechal Cândido Rondon, em 1990. Em 1991, iniciou o Ensino Médio, no Colégio Estadual Professor João de Oliveira Gomes, na cidade de Campo Mourão, Paraná, concluindo-o no ano de 1993.

Diplomou-se em Ciências Biológicas, Habilitações em Licenciatura e Bacharelado em 1998, na Universidade Estadual de Maringá.

Em março de 1999, iniciou o curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Melhoramento Genético Vegetal, na Universidade Estadual de Maringá, concluído o curso em 15 de março de 2001.

Atuou como professora de Ensino Superior, no período de 2003 a 2008, em diversas instituições do Paraná e de Mato Grosso.

Em março de 2007, matriculou-se no curso de Doutorado em Genética e Melhoramento, na Universidade Estadual de Maringá.

## ÍNDICE

RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. A espécie <i>Bombyx mori</i> .....	3
2.2. A atividade sericícola mundial e nacional .....	7
2.2.1. Produção mundial.....	7
2.2.2. Produção nacional e estadual .....	8
2.3. Melhoramento genético de bicho-da-seda.....	9
2.3.1. Bancos de germoplasma e variabilidade genética .....	10
2.3.2. Correlação entre caracteres quantitativos .....	13
2.3.3. Herdabilidade .....	14
2.3.4. Hibridação .....	15
2.4. Marcadores moleculares de DNA no melhoramento genético de bicho-da-seda.....	17
2.5. Marcadores ISSR.....	18
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
CAPÍTULO I - Caracterização produtiva, herdabilidade e correlação genética de raças de <i>Bombyx mori</i> L. do Banco de Germoplasma da Universidade Estadual de Maringá.....	29
RESUMO .....	29
1. INTRODUÇÃO .....	31
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
4. CONCLUSÕES .....	40
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
CAPÍTULO II - Avaliação do desempenho produtivo de híbridos de <i>Bombyx mori</i> L. do Banco de Germoplasma da Universidade Estadual de Maringá.....	43
RESUMO .....	43
1. INTRODUÇÃO .....	45
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	47



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
4. CONCLUSÕES .....	55
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56
CAPÍTULO III - Identificação de genótipos superiores de <i>Bombyx mori</i> L. utilizando método não-paramétrico .....	59
RESUMO .....	59
1. INTRODUÇÃO .....	61
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	63
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	66
4. CONCLUSÕES .....	71
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	72
CAPÍTULO IV - Caracterização genética de raças de <i>Bombyx mori</i> L. por meio de marcadores ISSR .....	74
RESUMO .....	74
1. INTRODUÇÃO .....	76
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	78
2.1. Material biológico e obtenção de DNA genômico .....	78
2.2. Obtenção dos marcadores ISSR .....	79
2.3. Análise dos marcadores ISSR .....	81
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	82
4. CONCLUSÕES .....	90
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	91
6. CONCLUSÕES GERAIS .....	93

## RESUMO

MUNHOZ, Roxelle Ethienne Ferreira Munhoz, D. Sc. Universidade Estadual de Maringá, julho, 2010. **Variabilidade genética de raças e híbridos simples de *Bombyx mori* L. do Banco de Germoplasma da Universidade Estadual de Maringá.** Professora Orientadora: Dra. Maria Aparecida Fernandez. Professores Conselheiros: Dra. Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuki e Dr. Carlos Alberto Scapim.

No presente estudo, são avaliados, utilizando-se metodologias genéticas e estatísticas, genótipos superiores para o programa de melhoramento genético de *Bombyx mori* (bicho-da-seda) pertencente ao Banco de Germoplasma da UEM. Quatro ensaios experimentais são relatados separadamente, seus objetivos são distintos, sendo que em cada um foram utilizados materiais biológicos e metodologias de análise independentes. No primeiro ensaio, raças de *B. mori* foram avaliadas quanto às suas características produtivas e genéticas. Nessa análise, foi determinado o coeficiente de herdabilidade e a correlação entre características biológicas e produtivas para a produção de casulos. Os resultados obtidos demonstraram que o teor de seda apresentou baixa herdabilidade e não houve nenhuma característica, dentro das avaliadas, que tenha se correlacionado significativamente entre si. No segundo ensaio, foram obtidas trinta e duas combinações híbridas entre parentais selecionados pela análise produtiva anterior e um híbrido comercial foi utilizado como testemunha, sendo os resultados submetidos à análise de variância e teste de medias Scott-Knott. As raças HA-A e C24-2 foram identificadas como distantes geneticamente pela distância de Mahalanobis e compõem os melhores híbridos obtidos pelos cruzamentos, C122-B X HA-A e HA-A X C24-2. No terceiro ensaio experimental foi utilizado método estatístico não paramétrico, baseado em um índice de avaliação múltipla para identificar genótipos superiores do Banco de Germoplasma de *B. Mori* da UEM. Trinta e quatro genótipos foram avaliados e um ranking de desempenho conjunto de cinco variáveis quantitativas foi estabelecido. Os resultados mostraram que três genótipos mais promissores são híbridos simples derivados de mãe pertencentes ao conjunto de raças de origem japonesa. A vantagem desta metodologia estatística de avaliação é a criação de um único índice para classificação dos genótipos. Entretanto, a mesma apresenta a desvantagem de

não considerar as diferenças significativas entre eles. O quarto ensaio foi realizado com dez raças, as quais são candidatas a germoplasma elite do programa de melhoramento genético da UEM, onde sua diversidade genética foi analisada por meio de marcadores ISSR. Nesses experimentos, foram selecionados nove primers que produziram 109 fragmentos de DNA, cujos tamanhos variaram de 200 pares de base (pb) a 2.000pb com 100% de polimorfismo entre as populações. Os resultados demonstraram que diferentes grupos heteróticos poderão ser formados com base nos agrupamentos realizados. As raças B106, M12-2, M11-2 e J1 devem compor um grupo, enquanto outro é composto por C24, C25, M18 e B82. A raça M19-2 forma um terceiro grupo, devido à discrepância nos agrupamentos com base na distância de Nei e Coeficiente de Jaccard obtidos. Todos os ensaios experimentais realizados e metodologias empregadas colaboraram para o avanço do programa de melhoramento genético de *B. mori* do Banco de Germoplasma da UEM.

Palavras-chave: bicho-da-seda, melhoramento genético de *Bombyx mori*, marcadores ISSR.

## ABSTRACT

MUNHOZ, Roxelle Ethienne Ferreira Munhoz, D. Sc. Universidade Estadual de Maringá, July, 2010. **Genetic variability of matrices and simple hybrids obtained from *Bombyx mori* Universidade Estadual de Maringá's Germplasm Bank.** Adviser: Dra. Maria Aparecida Fernandez. Committee members: Dra. Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuki and Dr. Carlos Alberto Scapim.

In the present study we evaluated, using genetic and statistical methods, superior genotypes for genetic breeding program of *Bombyx mori* (silkworm), from germplasm bank of Universidade Estadual de Maringá (UEM). For that, four distinguished experimental designs were carried out separately, using different biological material, and independent objectives and analysis methods. For the first assay, *B. mori* strains were evaluated regarding their genetic and yield characteristics. This analysis was determined by heritability coefficient and correlation analysis between biological and yield characteristics important for cocoon production. The results demonstrated that silk content has low heritability and no significant correlation was observed between the evaluated characteristics. For the second assay, 32 hybrid combinations were made between selected parents by a previous productivity analysis and a commercial hybrid was used as control, considering that the results were submitted to variance analysis and Scott-Knott test. Strains HA-A and C24-2 were identified by Mahalanobis' distance as the most divergent ones, thus, we obtained the best hybrids from the following crosses: C122-B x HA-A and HA-A x C24-2. The third experimental design used a non-parametric statistical method based on multiple evaluation index to identify superior genotypes of UEM's germplasm bank. A total of 34 genotypes were evaluated and a scaled interpretation ranking based on five quantitative variables was established. According to the results, the three most promising genotypes are simple hybrids derived of female parent that belongs to matrices of Japanese origin. The advantage of this evaluation statistical methodology is the creation of a single index to classify genotypes. However, it can also show disadvantage to not consider the significant differences among themselves. The fourth assay, conducted with ten matrices, selected as candidates to compose the elite silkworm genetic breeding program from UEM, were investigated regarding their genetic diversity through ISSR molecular markers. For these experiments, nine primers

were chosen to run reactions, and produced 109 DNA fragments that varied from 200 base pair (bp) to 2,000bp; revealing 100% of polymorphism among the populations. The results revealed that different heterotic groups were formed based on clustering analyses. Parental races B106, M12-2, M11-2 and J1 were allocated in group I; whereas C24, C25, M18 and B82 composed group II. On the other hand, only race M19-2 composed group III, due to discrepancy observed on clustering analyses obtained by Nei's distance and Jaccards' Coefficient. All experimental assays conducted and used methodologies aimed for the progress of *B. mori* (silkworm) genetic breeding program of UEM.

Key words: silkworm, genetic breeding of *Bombyx mori*, ISSR markers.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O bicho-da-seda (*Bombyx mori* Linneaus) é um lepidóptero domesticado da família Bombycidae, cujos casulos são utilizados para a produção de fios de seda. Essa prática se chama sericicultura e vem sendo desenvolvida em diversas regiões do mundo há cerca de 5.000 anos (Hanada e Watanabe, 1986; Nagaraju e Goldsmith, 2002).

No Brasil, a sericicultura iniciou-se no ano de 1848 (Hanada e Watanabe, 1986), sendo atualmente direcionada quase que em sua totalidade à exportação, uma vez que o mercado interno consome somente 3% da produção nacional.

Esta atividade agroindustrial reveste-se de grande importância, uma vez que possui uma função econômica e social, por ser voltada às pequenas propriedades que empregam o trabalho familiar, contribuindo para a renda dessas famílias e diminuindo o êxodo rural; além de ser uma atividade desenvolvida de forma sustentável e ecologicamente correta, pois apresenta baixo impacto ao meio ambiente (Pennacchio, 2006).

O estado do Paraná, nos últimos 10 anos, destaca-se como o maior produtor nacional de casulos verdes. Na safra de 2008/2009, foi responsável por mais de 92% da produção nacional. Segundo consta no Relatório Takii, o segmento agroindustrial da seda contribuiu com quase trinta milhões de reais na formação do Valor Bruto da Produção Paranaense (SEAB, 2010).

O maior beneficiado no desenvolvimento desta atividade é o pequeno produtor, o qual poderá desenvolver uma atividade rentável em sua propriedade, sem os altos custos da produção mecanizada.

Reconhecendo a importância da sericicultura nas cidades de sua abrangência, a Universidade Estadual de Maringá (UEM) iniciou no ano de 2006 o Programa de Melhoramento Genético do Bicho-da-seda, cujo marco inicial foi a doação de seu acervo genético pela Cocamar (Cooperativa Agroindustrial e Controladas) e, posteriormente, no ano de 2010, pela doação das raças-origem da empresa FUJIMURA para composição do Banco de Germoplasma de *B. mori*. Desta forma, este acervo genético consolida-se como o único público desta espécie no país.

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 ser exploradas em seu completo potencial. As raças parentais (matrizes) devem ser meticulosamente mantidas e sistematicamente multiplicadas.

A manutenção e multiplicação das raças é uma operação especializada, na qual há uma necessidade emergencial em se tomar medidas de precaução para evitar a mistura das raças, a multiplicação desenfreada, o uso das raças parentais para as combinações híbridas não autorizadas e a biopirataria. Portanto, a situação exige caracterização sistemática dessas novas raças, não só morfológicamente, mas também em nível molecular, para distinguir as raças de forma inequívoca.

A caracterização da variabilidade genética das raças de *B. Mori* do banco de germoplasma poderá servir como fonte de informações para futuras seleções de parentais em programas de hibridação (Rao et al., 2006). Neste contexto, as raças do acervo UEM já vêm sendo caracterizadas, tanto em caracteres qualitativos, como em quantitativos (Zanatta et al., 2009), assim como também quanto a resistência ou susceptibilidade ao BmMNPV (*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus subgrupo múltiplo) no campo (Brancahão et al., 2009; Pereira et al., 2008; Ribeiro et al., 2009a; 2009b; Santos, et al., 2010).

No Brasil, os híbridos de importância comercial são produzidos e distribuídos aos produtores rurais exclusivamente por uma única empresa. Para buscar uma alternativa a este cenário, o Programa de Melhoramento de Bicho-da-Seda da UEM objetiva além da promoção e efetivação do estudo da variabilidade genética do banco de germoplasma, a viabilização do melhoramento genético e criação do primeiro híbrido público do país.

Para tanto, o presente estudo tem por objetivo analisar o desempenho produtivo de diferentes raças de *B. mori* do Banco de Germoplasma da UEM, assim como de seus híbridos simples em cruzamentos conduzidos por meio de parâmetros de produtividade e de variabilidade genética gerada por marcadores ISSR.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A espécie *Bombyx mori*

O bicho-da-seda é classificado na ordem Lepidoptera, família Bombycidae e é, juntamente com a abelha, o único inseto domesticado com finalidade comercial (Kellogg, 1910). A domesticação do bicho-da-seda ocorreu por volta de 2700 a.C. na China.

Há hipóteses de que o *B. mori* evoluiu de *Bombyx mandarina*, prova disso é a semelhança morfológica e fisiológica entre as duas espécies, embora ainda haja controvérsias a respeito do número de cromossomos (Goldsmith et al., 2005). Presumivelmente, a espécie *B. mori* originou-se pelo processo de domesticação ocorrido há cerca de cinco mil anos de sua espécie selvagem *Bombyx mandarina*. Existem diversas características bioquímicas e morfológicas que diferenciam as duas espécies relacionadas. Por exemplo, *B. mandarina* pode voar e produz casulos 10 a 20 vezes menor que os genótipos comerciais de *B. mori* (Martinez et al., 2004).

A espécie domesticada foi propagada em larga escala e utilizada para a produção de seda na China, Japão e Europa, chegando ao Brasil apenas no ano de 1.740 (Hanada e Watannabe, 1986). Devido ao seu antigo processo de domesticação, as lagartas não conseguem se alimentar em seu ambiente natural, necessitando que o alimento seja fornecido pelo homem. As mariposas de *B. mori* apresentam asas e aparelho mastigatório degenerados e não podem mais voar ou se alimentar, ou seja, esta espécie é totalmente dependente do homem, o que caracteriza a completa domesticação.

O bicho-da-seda é hoje um organismo modelo em estudos científicos, devido às 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 400 mutações (Nagaraju, 2002)



que afetam diversos aspectos do organismo, como morfologia, desenvolvimento, comportamento e, sobretudo, as características consideradas de importância econômica (Nagaraju e Goldsmith, 2002).

Existem diferentes raças de bicho-da-seda que podem ser classificadas de diversas maneiras, como, por exemplo, de acordo com a sua origem geográfica, o voltinismo, o número de ecdises ou até mesmo a cor do casulo (Aruga, 1994):

**a) Classificação de acordo com a origem geográfica:**

- Japonesa: apresenta ovos de cor cinza-arroxeados; casulo branco, alongado e de tamanho médio; ciclo uni e bivoltino com quatro ecdises;
- Chinesa: ovos esverdeados; lagartas jovens e pouco resistentes ao calor, corpo branco; casulo elíptico ou esférico, branco, amarelo-ouro, ou verde; fibra fina e comprida; ciclo menor que a japonesa; uni, bi e polivoltino, com até três ecdises;
- Européia: ovos maiores do que de outras origens da espécie; lagartas maiores com manchas no corpo, pouca resistência ao calor, maior ciclo, mais susceptíveis às doenças pebrina e poliedrose; casulo oval ou alongado, branco ou rosado; ciclo monovoltino;
- Indiana ou Equatorial: ovos brilhantes; lagartas menores, mais resistentes ao calor, ciclo curto; casulo cônico, pequeno, branco ou esverdeado, pouco teor de seda; fibra fina; ciclo polivoltino;
- Coreana: ciclo curto da lagarta; casulo alongado, branco ou amarelo; univoltino com três ecdises.

**b) Classificação de acordo com o voltinismo (número de criadas anuais)**

- Monovoltino (um ciclo anual): ocorre nas regiões frias; ciclo larval mais longo, maior crescimento do corpo; boa qualidade dos casulos; menor resistência a doenças e altas temperaturas e umidade;
- Bivoltino (dois ciclos anuais): ocorre nas regiões subtropicais; ciclo e lagartas menores; maior resistência ao calor; qualidade inferior dos casulos; mais utilizadas pelos sericultores;
- Polivoltinismo (vários ciclos anuais): ocorre nas regiões tropicais; ciclo curto de lagarta; maior resistência ao calor e doenças; casulos pequenos; baixo teor de seda.

### c) Número de ecdises ou de mudas

- Três ecdises: ciclo larval mais curto; resistente a doenças; lagartas e casulos pequenos; fibra mais fina; espécie de origem coreana e chinesa;
- Quatro ecdises: mais utilizada pelos criadores; lagartas e casulos médios;
- Cinco ecdises: mutação da origem de quatro ecdises; lagarta de ciclo longo; casulos maiores; fibra mais grossa.

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, o adulto (Watanabe et al., 2000). Na fase larval apresentam, em geral, quatro ecdises com cinco ínstars. Durante as ecdises entram em estado de repouso, cessam a alimentação e trocam de tegumento. A larva ou lagarta aumenta quase que setenta vezes seu tamanho original, ocupando quatro vezes mais o espaço inicial. Ao final do 5º ínstar, a lagarta pára de se alimentar, inicia a fiação do casulo e se converte em pupa que, mais tarde, se transformará em uma mariposa (Figura 1).

A metamorfose ocorre por um conjunto integrado de processos em que a larva se desenvolve e transforma-se em pupa. Durante a fase pupal a ecdisona ativa a expressão gênica em vários tecidos larvais, como as glândulas sericígenas e pró-trorácicas, culminando na morte celular programada e subsequente histólise, enquanto novas partes do adulto são formadas por meio da proliferação e diferenciação celular (Tsuchida e Wells, 1988).

Os casulos são formados pela fibroína (cadeia leve e pesada), sericina e a p25 ou fibrohexamerina, produtos de secreção da glândula sericígena. As cadeias de fibroína, que são proteínas fibrosas, formam filamentos rígidos juntamente com a sericina e a fibrohexamerina, constituindo os fios de seda (Corradello, 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).

A espécie *B. mori* é susceptível a vários agentes patogênicos, incluindo protozoários, fungos, bactérias e vírus. As doenças virais representam um grande problema mundial para a sericultura, sendo responsável por quase 70% da perda dos casulos (Sengupta et al, 1990). No Paraná, foi descrito por Brancalhão

(2002) um isolado geográfico do vírus nucleopoliedrovírus subgrupo múltiplo (BmMNPV) que constitui a principal ameaça à produção de seda no estado.

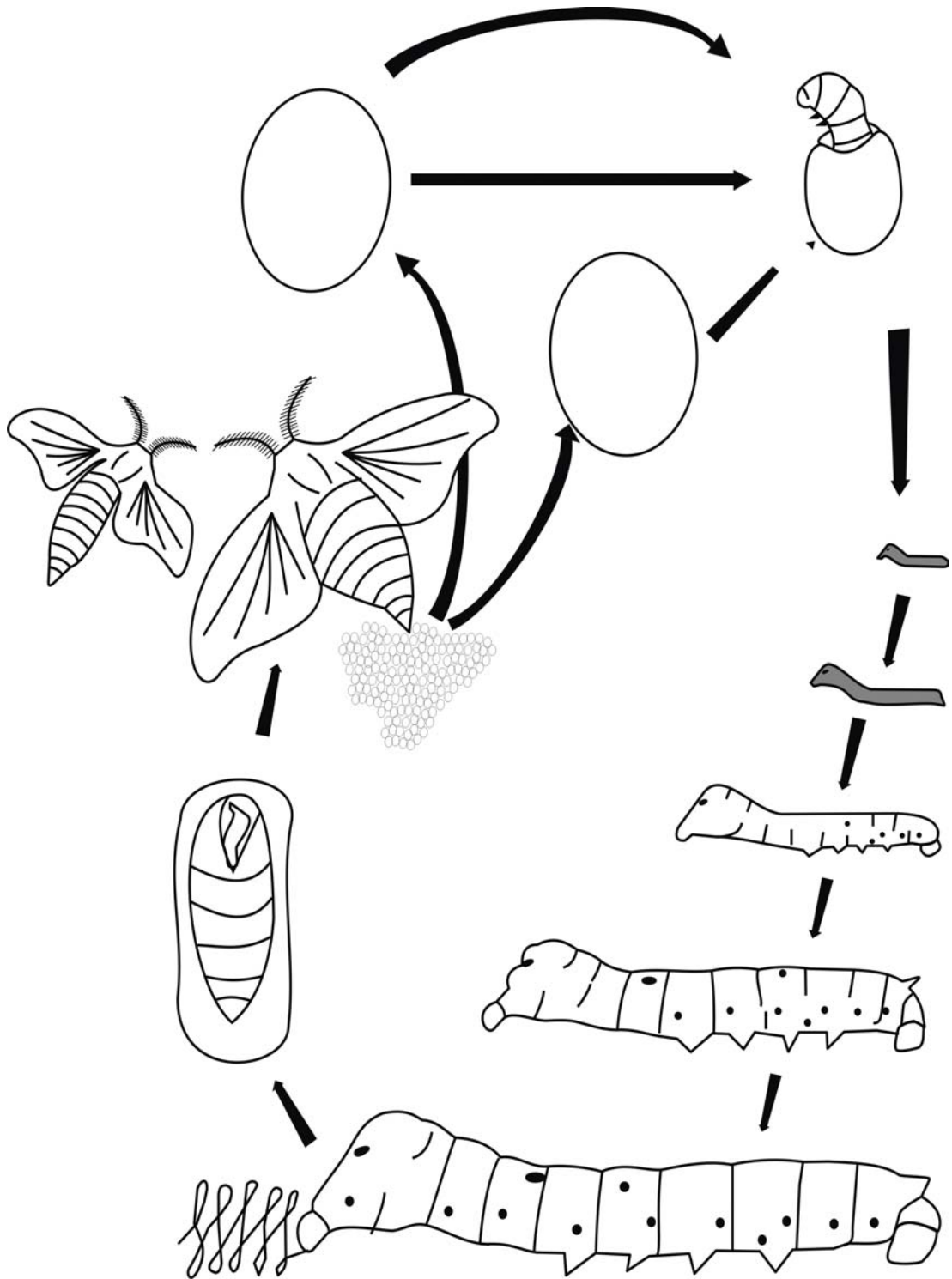


Figura 1 - Ciclo de vida do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.). As lagartas de diferentes tamanhos representam os cinco instares, que culminam na pupa no interior do casulo. A mariposa menor representa o macho adulto e a maior a fêmea.

## **2.2. A atividade sericícola mundial e nacional**

A sericicultura é a arte de criação do bicho-da-seda e está intimamente relacionada com a cultura da amoreira, uma vez que o inseto é monofágico, alimentando-se exclusivamente de folhas frescas de amoreiras.

Há oito espécies que são criadas para a produção do fio de seda: *B. mori* que pertence à família *Bombycidae* e as outras sete que pertencem à família Saturniidae, *Antheraea pernyi* Guerin, *A. millita* Drury, *A. yamamai* Guerin, *A. assama* Helfer, *Atacus ricini* Boisduval, *Philosamia ricini* Drury e *Eryogima pyretorum* Wood. A mais importante é *B. mori*, que responde por mais de 95% da seda produzida em todo o mundo.

Estima-se que existem 3000 genótipos de *B. mori* em países de clima temperado e tropical (Nagaraju, 2002), mantidos na Ásia e Europa, diferindo entre si, principalmente quanto às suas preferências ambientais e ao número de gerações que podem ser obtidas anualmente.

### **2.2.1. Produção mundial**

A seda é um tecido de valor elevado, porém de baixo volume comercial, representando apenas 0,2% do total mundial de produção têxtil. A produção de seda é considerada como uma importante ferramenta para o desenvolvimento econômico de países em desenvolvimento.

Geograficamente, a Ásia é o principal produtor de seda do mundo e produz mais de 95% do total da produção mundial. O Brasil é o sexto maior produtor mundial de casulos e o quarto de fios de seda (Quadro 1). Em 2006 a produção brasileira foi de 8.051 toneladas de casulos, sendo que o estado do Paraná nos últimos 10 anos destaca-se como o maior produtor nacional de casulos verdes. Nessa última safra de 2008/2009, o estado foi responsável por mais de 92% da produção nacional.

Atualmente, a sericicultura é a principal fonte econômica para mais de 30 milhões de famílias em países como a China, Índia, Vietnã e Tailândia. E não seria diferente para o agronegócio brasileiro, contribuindo para o desenvolvimento sustentável do país, por meio da inclusão social associada ao fato de ser uma atividade de baixo impacto ambiental. Esta atividade é típica de áreas de

agricultura familiar, gerando renda ao proporcionar postos de trabalho no campo, com a criação do bicho da seda e o cultivo da amoreira e na cidade, com a indústria de fiação e o comércio têxtil. A sericicultura proporciona importantes aspectos sócio-econômicos: é uma criação alternativa, gera produto de exportação, fixa o homem no campo, apresenta pouca dependência climática, tem pequeno custo de produção, além da racionalização da mão-de-obra.

### **2.2.2. Produção nacional e estadual**

A sericicultura iniciou-se no Brasil em 1848, sendo atualmente esta atividade basicamente para exportação, uma vez que o mercado nacional consome tão somente 2-3% de sua produção.

A cadeia produtiva da seda brasileira envolve produtores, empresas e o governo de alguns estados. Determinado setor empresarial fica responsável pela distribuição de mudas de amoreiras e lagartas na terceira idade para os produtores conveniados e garantem a compra dos casulos produzidos. Os produtores conveniados são responsáveis por comprarem as lagartas e produzirem os casulos verdes (casulos com as crisálidas ainda vivas em seu interior) que serão vendidos ao setor empresarial conveniado responsável pela fiação de seda. O governo do Estado fica responsável por disponibilizar crédito aos produtores para possibilitar a atividade sericícola e tais empréstimos poderão ser saldados com a venda dos casulos (SEAB, 2010).

A região de Maringá, Paraná, é composta por 21 municípios produtores, com 1223 criadores, 1674 barracões, 3614 empregos no campo, 5.204,83 ha com amoreiras, 1.948.809,9 kg de casulos verdes.

O valor bruto de produção (V.B.P.) é de R\$10.757.429,00/ano, representando 27% da produção do Estado, tendo o município de Nova Esperança como o maior produtor de casulos verdes do Brasil e do Estado do Paraná, com 654 criadores, 899 barracões, 1977 empregos no campo, 3.172 ha de amoreira, 1.211.420 kg de casulos verdes com V.B.P. igual a R\$6.687.040,60.

O Quadro 1 lista os principais produtores mundiais tanto de casulos verdes quanto de fibras de seda durante os anos de 2002 a 2006.

Quadro 1 - Produção mundial de casulos e de fibras de seda (em toneladas)

País	Ano											
	2002		2003		2004		2005		2006			
<b>Produção mundial de casulos (toneladas)</b>												
China	1º	545.497	1º	480.774	1º	547.091	1º	621.461	1º	739.715	79,12%	
Índia	2º	128.000	2º	117.000	2º	120.000	2º	126.000	2º	135.000	14,44%	
Vietnam	3º	21.000	3º	21.000	3º	21.000	3º	21.000	3º	21.000	2,25%	
Uzbekistão	4º	20.000	4º	20.000	4º	20.000	4º	20.000	4º	20.000	2,14%	
Tailândia	7º	3.473	5º	10.500	5º	10.650	5º	10.650	5º	10.100	1,08%	
Brasil	5º	10.238	6º	9.966	6º	8.005	6º	7.146	6º	8.501	0,86%	
Japão	8º	880	8º	780	8º	683	8º	626	7º	505	0,05%	
Turquia	10º	100	9º	169	9º	169	9º	170	8º	350	0,04%	
Grécia	11º	60	10º	60	10º	70	10º	70	9º	100	0,01%	
Bulgária	12º	50		0	12º	20	12º	42	10º	65	0,01%	
Filipinas	13º	28	11º	23	11º	22	11º	14	11º	16	0,00%	
Irã	6º	3.500	7º	3200	7º	3.200	7º	2.543			-	
Indonésia	9º	691									-	
<b>Total</b>		<b>733.517</b>		<b>663.472</b>		<b>730.910</b>		<b>809.722</b>		<b>934.902</b>	<b>100%</b>	
<b>Produção de fibras de seda (toneladas)</b>												
China	1º	73.585	1º	83.763	1º	80.230	1º	87.761	1º	93.105	80,54%	
Índia	2º	14.617	2º	13.970	2º	14.620	2º	15.445	2º	16.525	14,29%	
Vietnam	3º	2.250	3º	2.250	3º	2.250	3º	2.250	3º	2.250	1,95%	
Brasil	4º	1.607	4º	1.563	4º	1.512	5º	1.285	4º	1.387	1,20%	
Uzbekistão	6º	1.100	6º	1.100	6º	1.100	6º	1.100	5º	1.100	0,95%	
Tailândia	5º	1.500	5º	1.500	5º	1.420	4º	1.420	6º	1.080	0,93%	
Japão	8º	391	8º	287	8º	263	8º	151	7º	119	0,10%	
Turquia	10º	17	9º	28	9º	28	9º	30	8º	25	0,02%	
Bulgária	11º	7		0	11º	3	10º	6	9º	5	0,00%	
Grécia	12º	4	10º	4	10º	5	11º	4	10º	4	0,00%	
Filipinas	13º	3	11º	3	11º	3	12º	1	11º	2	0,00%	
Irã	7º	630	7º	500	7º	500	7º	395			-	
Indonésia	9º	91									-	
<b>Total</b>		<b>95.802</b>		<b>104.968</b>		<b>101.935</b>		<b>109.848</b>		<b>115.602</b>	<b>100%</b>	

Fonte: FAO (2010).

### 2.3. Melhoramento genético de bicho-da-seda

O bicho-da-seda é um inseto com grande importância econômica, sendo que a análise científica de *B. mori* foi iniciada antes dos anos 1900, impulsionada pelo incentivo da indústria da seda. Por volta de 1930, já havia vários estudos genéticos reportados e atualmente cerca de 400 mutações relacionadas a

caracteres biológicos e de interesse produtivo são conhecidas (Nagaraju, 2002). Este lepidóptero é um modelo genético como a já clássica *Drosophila melanogaster* (Reddy et al., 1999; Nagaraju, 2002; Nagaraju e Goldsmith, 2002; Mita et al., 2004).

O artigo pioneiro de Kellog (1910) mencionava o bicho-da-seda como inseto domesticado e melhorado geneticamente. Li et al. (2007) menciona que no início de 1900 já era usado bichos-da-seda híbridos na sericultura e enfatiza a importância da manutenção e caracterização dos germoplasmas para facilitar os programas de melhoramento genético.

*B. mori* apresenta alta variabilidade genética entre as diferentes raças, que afeta diversos aspectos morfológicos do organismo, correlacionados ao desenvolvimento, comportamento e, sobretudo, às características consideradas de importância econômica (Nagaraju, 2002).

### **2.3.1. Bancos de germoplasma e variabilidade genética**

De acordo com a distribuição geográfica, o bicho-da-seda pode ser classificado e identificado como de origem Japonesa, Chinesa, Européia, Indiana ou Coreana. Foram identificadas, em função de sua origem, variações nas características do ovo (cor, forma), da lagarta (resistência ao cultivo no campo, tamanho, cor, número de gerações/ano, número de ecdises) e do casulo (forma, tamanho, cor, rendimento). Os atributos qualitativos e quantitativos, intrínsecos de cada raça ou linhagens, são normalmente estudados, visando selecionar os melhores para programas de melhoramento e formação de híbridos (Porto et al., 2004).

Um banco de germoplasma pode ser definido como uma unidade conservadora de material genético. Os bancos de germoplasmas podem ser utilizados a qualquer momento em uma pesquisa científica e devem ter manutenção constante e devem ser descritos quanto a variações fenotípicas e genotípicas por meio de descritores quantitativos e qualitativos. Mais recentemente, ferramentas moleculares permitem uma melhor investigação genotípica e correlacioná-la com características fenotípicas (Ferreira e Grattapaglia, 1995). Além de fazer a conservação, os bancos também fazem a caracterização e avaliação do germoplasma. Para cada espécie existe um grupo

de descritores mínimos que deve ser relatado para cada genótipo (Bespalhok Filho et al., 2009a).

Devido ao fato da sericicultura ser uma prática muito antiga e devido a sua grande distribuição geográfica, existem diversos bancos de germoplasma de *B. mori* no mundo. O Banco de Germoplasma Central da China possui mais de 600 raças de bicho-da-seda (FAO, 2003); na Índia (CSB, 2010), que é um país com tradição na produção de seda, e no Japão (Silkworm Base, 2010) também há grandes bancos de germoplasma, cujas raças são bem descritas e documentadas (Figura 2). Esses bancos são de extrema importância, pois a partir deles são avaliadas, selecionadas e cruzadas as raças que apresentarem as melhores características qualitativas e quantitativas, formando híbridos com potencial comercial.

Várias características vêm sendo melhoradas visando o produto final, ou seja, a maior produção de casulos de boa qualidade, alto rendimento de casulos por grama de ovo, resistência a condições adversas e a doenças, maior adaptabilidade das lagartas, tamanho e formatos dos casulos adequados principalmente à fiação industrial, assim como a qualidade do fio de seda. Uma maior diversidade no banco de germoplasma permite ao melhorista explorar a variabilidade genética natural.

Devido à heterose manifestada pelos híbridos de bicho-da-seda, métodos de melhoramento genético baseados na hibridação vêm sendo usados em todo o mundo para a produção de melhores casulos. Porém, este processo de melhoramento envolve a seleção artificial visando ao incremento da produção da seda, podendo, devido ao aumento da pressão de seleção, acarretar em perda do potencial genético. Genes perdidos ao longo de vários processos consecutivos de seleção artificial podem ocasionar aumento na adaptação às condições em campo em detrimento à resistência a doenças, levando a espécie à chamada erosão genética. A manutenção de raças em bancos de germoplasma permite aos melhoristas o resgate de alguns genes perdidos durante a seleção ou hibridação.

O germoplasma conservado serve como um reservatório de genes aos quais os melhoristas podem acessar quando da necessidade de resolver problemas específicos, tal como a resistência a uma doença (Bespalhok Filho et al., 2009a).



A avaliação das raças de bicho-da-seda em coleções de germoplasma é uma das etapas mais importantes na manutenção destes estoques genéticos, pois com base nesses dados é que se torna possível a criação de híbridos comerciais de bicho-da-seda assim como para genótipos destinados à pesquisa científica (FAO, 2003).



Figura 2 - Variabilidade genética de diferentes raças de *B. mori*. Estão representados os ovos (A), lagartas (B) e os respectivos casulos (C) de quatro diferentes raças.

Fonte: <http://www.shigen.nig.ac.jp/silkwormbase>.

### 2.3.2. Correlação entre caracteres quantitativos

Diferentes caracteres quantitativos são de importância econômica e apresentaram incremento significativo em resposta ao melhoramento genético em *B. mori*. Entre eles de destacam: número de ovos (Boyko et al., 2004; Ahsan e Rahman, 2008), peso de lagartas (Farooq et al., 2006); peso da casulo (Rajanna e Reddy, 1990; Jialong e Jun, 1994; Porto et al., 2004; Mirhosieni et al., 2004), peso da casca sérica (Porto et al., 2004; Goel et al., 2007; Porto e Okamoto, 2008), peso da pupa ou crisálida (Rajanna e Puttaraju, 1998; Porto e Okamoto, 2003; comprimento do fio de seda (Nagaraju e Kumar, 1995; Goel et al., 2007), teor líquido de seda (Porto, 2004, Farooq et al., 2006).

O grau de associação entre duas variáveis pode ser mensurado por meio do coeficiente de correlação ( $r$ ), que pode ser negativo ou positivo. Positivo indica que duas variáveis estão variando na mesma direção e negativo indica que o comportamento das variáveis segue direções opostas (Cruz e Regazzi, 2001).

A variação simultânea de duas características pode ser explicada por meio de mecanismos genéticos, tais como ligação e pleiotropia. O conhecimento das correlações entre os diferentes caracteres possui grande importância nos programas de melhoramento genético visando facilitar os trabalhos de seleção. Além disso, o conhecimento da influência de um caráter sobre outros permite a realização da seleção indireta para aquele de difícil mensuração (Ramalho et al., 2008).

Quadro 2 - Características significativamente correlacionadas em *Bombyx mori* L.

Associação entre os caracteres	Correlação
Fecundidade x Produtividade	Negativa
Fecundidade x Peso da Pupa (Fêmea)	Positiva
Fecundidade x Peso da Mariposa	Positiva
Produtividade x Peso do Casulo	Positiva
Produtividade x Comprimento do Fio	Positiva
Peso do Casulo x Peso do Ovo	Positiva
Peso do Casulo x Peso da Casca Sérica	Positiva
Peso do Casulo x Comprimento do Fio	Positiva
Bobinagem x Comprimento do Fio	Negativa
Bobinagem x Tenacidade do Fio	Positiva

Adaptado de Singh et al. (1998)

Singh et al. (1998) reportaram o sucesso da seleção no melhoramento de *B. mori* utilizando o conhecimento prévio da correlação e da herdabilidade para as características de interesse econômico. Neste trabalho, foi apresentada uma revisão da correlação entre as principais características produtivas empregadas em programas de melhoramento do bicho-da-seda (Quadro 2).

### **2.3.3. Herdabilidade**

A herdabilidade ( $h^2$ ) refere-se à proporção da variabilidade observada que é herdável e não ambiental, sendo esta atribuída aos efeitos aditivos dos genes (Allard, 1971). Pode-se defini-la como um coeficiente genético que expressa a relação entre a variância genotípica e a variância fenotípica, ou seja, mede o nível da correspondência entre o fenótipo e o valor genético (Falconer, 1987).

O fato é que a proporção herdável de uma variável é alterada pelo efeito do ambiente. Portanto, com o aumento da variabilidade proporcionado pelo efeito do ambiente, a seleção de novos genótipos torna-se mais difícil (Bespalhok Filho et al., 2009b).

A estimativa da herdabilidade de determinada característica é fundamental em programas de melhoramento genético, pois características de baixa herdabilidade, exceto quando a intensidade de seleção é alta, não apresentam respostas satisfatórias ao trabalho de seleção dos animais. A separação da fração genética da ambiental e a determinação da importância relativa dos efeitos aditivos genéticos diretos são necessárias quando se pretende formular planos de melhoramento animal (Bolígon et al., 2006).

A estimação da correlação e da herdabilidade em estudos genéticos de características quantitativas é de suma importância para a seleção, refletindo o potencial do genoma do organismo em sua expressão fenotípica (Singh et al., 1998). Este conhecimento não poderia ser diferente em programas de melhoramento do bicho-da-seda (Jayaswal et al., 1990).

A principal importância da herdabilidade para um programa de melhoramento está em seu papel preditivo, expressando a confiança do valor fenotípico como um guia para o valor genético ou o grau de correspondência entre o valor fenotípico e o valor genético. Desta forma, o melhorista pode se subsidiar deste coeficiente para a escolha adequada do critério de seleção a ser adotado (Singh et al., 1998).

A herdabilidade é uma das principais estimativas avaliadas para análise de produtividade em *B. mori* (Quadro 3). Peso da casca sérica, peso do casulo, porcentagem de encasulamento e teor de seda são importantes variáveis que tem alta herdabilidade em bicho-da-seda. Estas são afetadas por ação gênica aditiva e, portanto, respondem melhor à seleção do que as com baixa herdabilidade (Hosseini Moghaddam et al., 2005).

Quadro 3 - Valores de herdabilidade correlacionada a variáveis economicamente importantes em *Bombyx mori* L.

Variável	Herdabilidade	Referência bibliográfica
Nº de ovos/fêmea	99,50	Ahsan e Rahman (2008)
Fecundidade	20,97	Kuramesan et al. (2007)
Peso de 10 lagartas maduras	35,93	Kuramesan et al. (2007)
Nº de casulos/10.000 lagartas	05,64	Kuramesan et al. (2007)
Peso do casulo	73,60	Singh et al. (1998)
Peso da pupa	78,50	Singh et al. (1998)
Peso da casca sérica	80,20	Singh et al. (1998)
Bobinagem	28,00	Singh et al. (1998)
Teor de seda	79,00	Singh et al. (1998)

Características que possuem baixa herdabilidade, como o “número total de casulos/10.000 lagartas maduras”, indicam alta influência ambiental, sendo pouco indicadas para seleção direta ou para caracterização da variabilidade genética (Kumaresan et al., 2007).

Nagaraju (2002) menciona também a baixa herdabilidade encontrada em variáveis relacionadas à resistência a doenças ou saúde das lagartas, dificultando assim o melhoramento do bicho-da-seda neste quesito.

#### 2.3.4. Híbridação

Quando diferentes linhagens são cruzadas, freqüentemente os descendentes possuem características balanceadas derivadas de ambos os parentais, sendo mais resistentes ao campo, ou se destacam em produtividade. Este fenômeno é conhecido como heterose ou vigor do híbrido. Conhecer a extensão e magnitude da heterose auxilia na escolha dos melhores cruzamentos para formação de gerações mais avançadas, onde predominam combinações genéticas superiores (Siddiqui, 1997).

A utilização de estratégias genéticas envolvendo cruzamentos entre raças ou linhagens de *B. mori*, objetivando explorar o efeito da heterose na produção de seda, é bem conhecida no meio sercícola (Porto e Okamoto, 2008).

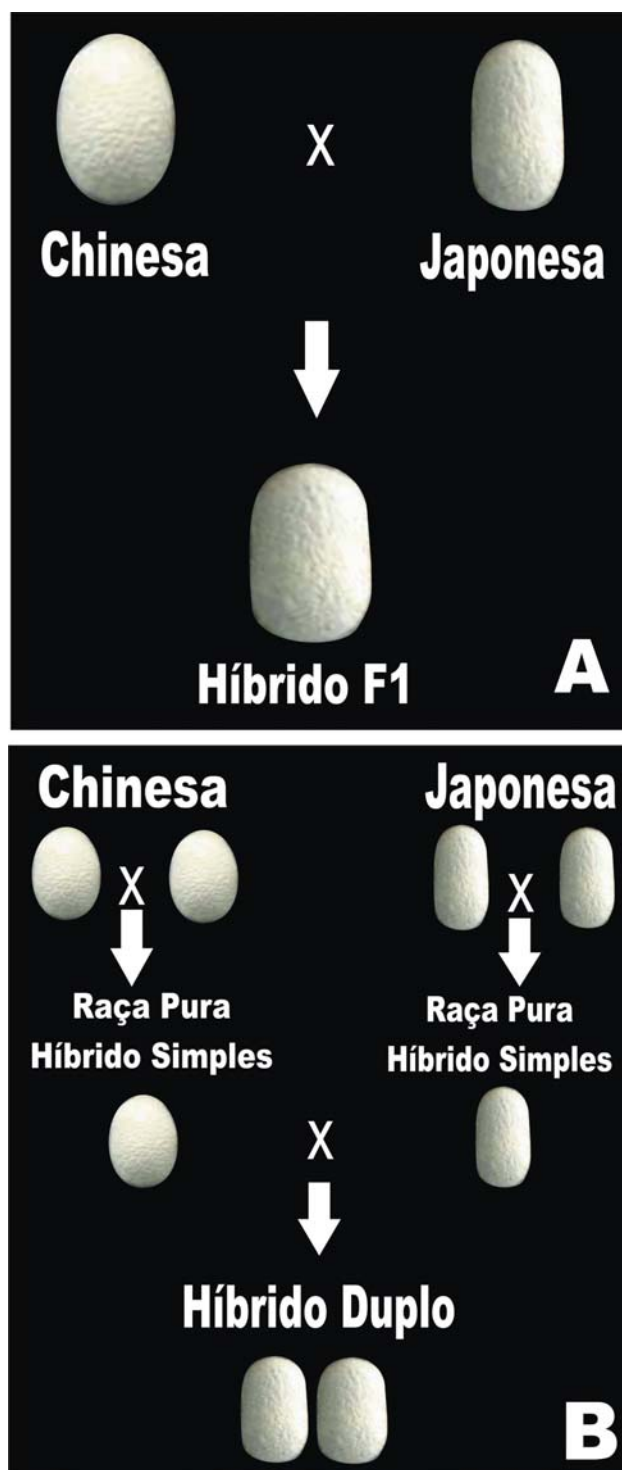


Figura 3 - Esquema de cruzamento para obtenção de híbridos simples (A) e híbridos duplos (B) em *Bombyx mori* (Adaptado de Nagaraju, 2002).

A hibridização convencional, onde o vigor da geração  $F_1$  é explorado, é recurso ainda muito utilizado em países produtores de seda como forma de promover a elevação das taxas de crescimento e melhorar a estabilidade de produção, em virtude de aumentar a resistência ao estresse biótico e abiótico (Nagaraju e Goldsmith, 2002).

Indivíduos mais divergentes geneticamente, de modo geral, produzem híbridos melhores. Para isso, é importante que o programa de melhoramento realize avaliações das capacidades de combinação, tanto geral quanto a específica, dos progenitores pré-selecionados, assim como a heterose manifestada por seus descendentes

Nagaraju (2002) relaciona que os híbridos mais utilizados na sericicultura são os híbridos simples, originados normalmente pelo cruzamento direto de duas raças de origem geográficas diferentes. Outra estratégia de hibridação muito utilizada é o cruzamento duplo para formação de híbrido duplo ou tetraparental. Neste caso, duas raças próximas ou que tenham a mesma origem geográfica são cruzadas entre si produzindo os híbridos  $F_1$ . Posteriormente, dois híbridos  $F_1$  provenientes de raças de origem diferentes são cruzados entre si (Figura 3).

Há no mundo diversos programas de melhoramento genético do bicho-da-seda, assim como um esforço mundial na manutenção dos germoplasmas. No entanto, os métodos de melhoramento tradicionais não vêm obtendo êxito na junção dos caracteres de alta produtividade de raças provenientes de regiões temperadas com a resistência a doenças e adaptabilidade dos genótipos procedentes de países tropicais (Nagaraja e Nagaraju, 1995). Para tornar a seleção artificial mais eficiente, marcadores moleculares se tornaram uma importante ferramenta biotecnológica no melhoramento do bicho-da-seda

#### **2.4. Marcadores moleculares de DNA no melhoramento genético de bicho-da-seda**

Durante as últimas três décadas, o aumento da produção de seda se deve à aplicação de métodos de melhoramento genético convencionais na sericicultura, tais como teste de progênie, exploração de vigor híbrido, interação genótipo *versus* ambiente. Para a utilização da biotecnologia nos programas de melhoramento, é necessário desenvolver análises com marcadores de DNA para

a construção de mapas de características economicamente importantes, resistência virótica e obtenção de transgênicos (Nagaraju, 2002).

Diversos marcadores moleculares vêm sendo utilizados como ferramenta no melhoramento genético do bicho-da-seda, tais como, RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA* (Williams et al., 1990; Nagaraja e Nagaraju, 1995; Srivastava et al., 2007), AFLP – *Amplified fragment length polymorphisms* (Vos et al., 1995), SSR- *Simple Sequence Repeats* (Tautz, 1989) e ISSR – *Inter Simple Sequence Repeat* (Chatterjee e Mohandas, 2003; Li et al., 2007).

Dentre os marcadores moleculares com grande potencial para a identificação de espécies e estudo da diversidade genética em insetos, destaca-se o RAPD e mais recentemente a técnica de ISSR (Zietkiewicz et al., 1994). Esta última se destaca devido ao elevado grau de polimorfismo, reprodutibilidade e baixo custo (Salimath et al., 1995).

As seqüências ISSR, especialmente as ricas em (TAA) são onipresentes no genoma de bicho-da-seda, apresentando vantagens como o RAPD, mas sendo ainda mais informativa e com maior especificidade.

Neste sentido, diversos marcadores ISSR vêm sendo testados, visando a correlação com caracteres fenotípicos de interesse, assim como a estimativa da diversidade genética (Pradeep et al., 2005).

No Brasil, alguns estudos vêm sendo publicados sobre a avaliação da heterose em cruzamentos de bicho-da-seda, com raças oriundas de diferentes locais (Porto e Okamoto, 2003; Porto et al., 2004). Nestes casos, os caracteres biológicos e produtivos são avaliados fenotipicamente, havendo escassez de trabalhos que associem estes caracteres a marcadores moleculares com raças disponíveis no país.

## **2.5. Marcadores ISSR**

De modo geral, genomas de organismos eucariotos são densamente povoados por microssatélites ou seqüências simples repetidas (SSRs), as quais consistem de 1 a 6 nucleotídeos repetidos *em tandem* (Tautz, 1989; Reddy et al., 1999).

Os microssatélites possuem um alto polimorfismo, decorrente das altas taxas de mutação nestes locos, que variam de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  por geração. No

entanto, são flanqueados por sequências únicas e por isso podem ser amplificados por meio de PCR, que os tornam ótimos marcadores moleculares.

Os marcadores microssatélites apresentam vantagens, pois são co-dominantes e são altamente reprodutíveis, porém são extensivamente laboriosos e custosos devido à necessidade do conhecimento prévio da seqüência que originará os primers que deverão ser desenhados (Rakoczy et al., 2004).

Para aproveitar as vantagens dos SSRs e driblar suas desvantagens, Zietkiewicz et al. (1994) criaram uma técnica baseada em amplificação das regiões que são ancoradas por microssatélites. Esta foi mais tarde denominada de *Inter Simple Sequence Repeat* ou ISSR.

Pode-se definir a técnica ISSR como a amplificação de DNA, via PCR, usando um primer arbitrário ancorado nas extremidades 5' e 3' (Figura 4), freqüentemente com nucleotídeos degenerados, visando o estudo da variabilidade genética (Qian et al., 2001).

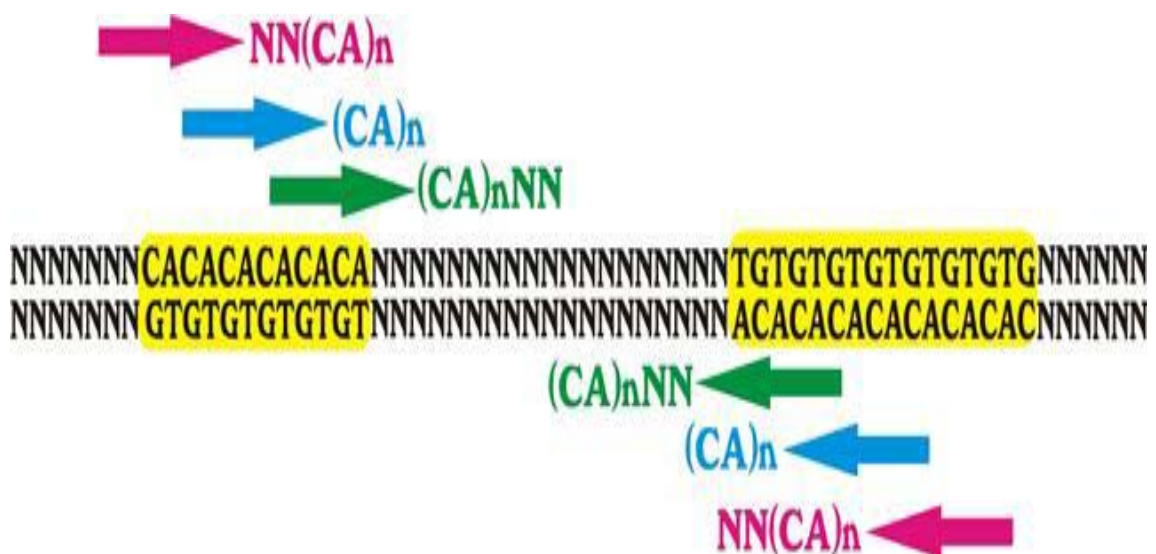


Figura 4 - Esquema representando a técnica de ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*).

As primeiras publicações com ISSR relatam seu uso destinado à demonstração da hipervariação natural em espécies cultivadas (Albani e Wilkinson, 1998; Wolfe e Liston, 1998). Mais tarde, surgiram trabalhos que demonstram a aplicação desta técnica no estudo de populações naturais (Maunder et al., 1999) e como ferramenta auxiliar no melhoramento genético (Rakoczy et al., 2004).



Reddy et al. (1999) fizeram o primeiro relato da utilização destes marcadores para caracterização genética em *B. mori*. A técnica foi então chamada de ISSR-PCR (*Inter-Simple Sequence Repeat Anchored Polymerase Chain Reaction*) e foi considerada uma ferramenta em potencial para avaliação genética nesta espécie.

Chatterjee e Mohandas (2003) buscaram correlacionar a produtividade em bicho-da-seda com os marcadores ISSR e encontraram associação significativa em algumas raças, embora haja dificuldade devido ao caráter poligênico das variáveis quantitativas.

Pradeep et al. (2005) compararam os marcadores gerados pelas técnicas de RAPD e ISSR quanto à diversidade genética na linhagem Nistari e concluíram que os últimos são mais eficientes na geração de polimorfismo, porém que os dois tipos de marcadores podem ser empregados concomitantemente, gerando resultados ainda mais precisos.

Em um estudo posterior, Pradeep et al. (2007) avaliaram associação com características de biomassa tanto da lagarta quanto dos casulos de *B. mori*. Alguns marcadores tiveram correlação de Pearson significativa, positiva ou negativa, com as características avaliadas em 14 linhagens, o que suporta a eficiência da utilização dos marcadores ISSR associados a caracteres envolvidos na produtividade.

Srivastava et al. (2007) reportam a identificação de raças polivoltinas resistentes ao estresse térmico por meio de análise por ISSR. Estas raças produzem menos seda que as mono ou bivoltinas, porém sua produtividade se mantém em climas tropicais, além de serem resistentes a doenças. Neste estudo, de 15 primers avaliados, 6 correlacionaram-se fortemente com o período de ocorrência da fase de pupa nas raças de bicho-da-seda.

Li et al. (2007) empregaram este mesmo marcador para avaliar as distâncias genéticas de 42 linhagens com diferentes origens geográficas. A aplicação de 19 primers nestas linhagens ofereceu uma nova explicação filogenética em *B. mori*.

De modo geral, todos os trabalhos consideram os marcadores ISSR como uma ferramenta poderosa no estudo da diversidade genética de bichos-da-seda, desempenhando, assim, uma importante função em programas de melhoramento com Seleção Assistida por Marcadores Moleculares (SAMM).

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHSAN, M.K.; RAHMAN, S.M. Genetic variability and correlation analysis in hybrids of mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. for egg characters. **University Journal of Zoology**, 27:13-16, 2008.

ALBANI, M.C.; WILKINSON, M.J. Inter simple sequence repeat polymerase chain reaction for the detection of somaclonal variation. **Plant Breeding**, 117:573-575, 1998.

ALLARD, R.W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blüchner, 1971. 381p.

ARUGA, H. **Silkworm and its Strains**. Oxford: CRC Press, 1994. 367p.

BESPALHOK FILHO, J.C.; GUERRA, E.P.; OLIVEIRA, R.A. **Noções de genética quantitativa**. [2009b]. Disponível em: <http://www.bespa.agrarias.ufpr.br/paginas/livro/capitulo%205.pdf>. Acesso em: 11, abril, 2010.

BESPALHOK FILHO, J.C.; GUERRA, E.P.; OLIVEIRA, R.A. **Uso e conservação de germoplasma**. [2009a]. Disponível em: <http://www.bespa.agrarias.ufpr.br/paginas/livro/capitulo%203>. Acesso em: 11 abr. 2010.

BOLIGON, A.A.; RORATO, P.R.N.; WEBER, T.; EVERLING, D.M.; LOPES, J.S. Herdabilidades para ganho de peso da desmama ao sobreano e perímetro escrotal ao sobreano e tendências genética e fenotípica para ganho de peso da desmama ao sobreano em bovinos Nelore-Angus. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 35:1323-1328, 2006

BOYKO, Y.A.; SUKHANOV, S.V.; SHAKHBAZOV, V.G. The effect of heterosis and inheritance of quantitative traits in silkworm exposed to electromagnetic irradiation. **Genetika**, 40:1209–1214, 2004.

BRANCALHÃO R.M.C.; TORQUATO, E.F.B.; FERNANDEZ, M. A. Cytopathology of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) silk gland caused by multiple nucleopolyhedrovirus. **Genetics and Molecular Research**, 8:162-172, 2009.

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

CHATTERJEE, S.N.; PRADEEP, A.R. Molecular markers (RAPD) associated with growth, yield and origin of the silkworm, *Bombyx mori* L. **Genetika**, 39:1612-24, 2003.

CHATTERJEE, S.N.; MOHANDAS, T.P. Identification of ISSR markers associated with productivity traits in silkworm, *Bombyx mori* L. **Genome**, 46:438-447, 2003.

CORRADELLO, E.F.A. Bicho-da-seda e amoreira: da folha ao fio a trama de um segredo milenar. **Coleção Brasil Agrícola**, 1987. 101p.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 2001. 390p.

CSB. Central Silk Board. **Silks type**. Disponível em: <http://indiansilk.kar.nic.in/>. Acesso em: 15, abril, 2010.

FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa: UFV, 1987. 279p.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Conservation status of silkworm germplasm resources in China**. 2003. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/005/AD108E/ad108e01.htm#TopOfPage>. Acesso em: 14, abril, 2010

FAROOQ, M.; MALIK, M. A.; KUKILOO, F.A. Combining ability analysis of some bivoltine silkworm (*Bombyx mori* L.) genotypes. **Applied Biological Research**, 8:11-14, 2006.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1995, 220p.

GOEL, A.K.; CHANDRASHEKHARAIHAH, REDDY, YS. Development and characterization of productive bivoltine inbred lines of silkworm *Bombyx mori* L. **Indian Journal of Animal Research**, 41:157-166, 2007.

GOLDSMITH, M.R.; SHIMADA T.; ABE, H. The genetics and genomics of the silkworm, *Bombyx mori* L. **Annual Review of Entomology**, 50:71-100, 2005.

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

HOSSEINI MOGHADDAM, S.H.; EMAM JOMEH, K.; MIRHOSSEINI, S.Z.; GHOLAMI, M.R. Genetic Improvement of Some Traits in Four Strains of Silkworm, *Bombyx mori* L. **International Journal of Industrial Entomology**, 10:95-99, 2005.

JAYASWAL, K.P.; SINGH, T.; SEN, S.K. Correlations between economic parameters and their application in silkworm breeding. **Indian Silk**, 29:25-27, 1990.

JIALONG, D.; JUN, Z. Analysis of gene effects on some cocoon characters in silkworm. **Journal of Biomathematics**, 9:10-17, 1994.

KELLOGG, V. Insect Breeding. **Journal of Heredity**, 1:133-135, 1910.

KURAMESAN, P.; SINHA, R.K.; URS, R.S. An analysis of genetic variation and divergence in Indian tropical polyvoltine silkworm (*Bombyx mori* L.) genotypes. **Caspian Journal Environmental Sciences**, 5:11-17, 2007.

LI, M.; HOU, C.; MIAO, X.; XU, A.; HUANG, Y. Analyzing Genetic Relationships in *Bombyx mori* Using Intersimple Sequence Repeat Amplification. **Molecular Entomology**, 100: 202-208, 2007.

MARTINEZ, L.; ALMAGRO, J.C.; COLL, J.L.; HERRERA, R.J. Sequence variability in the fibroin-H intron of domesticated and wild silk moths. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 34:343-352, 2004.

MAUNDER, M.A.; CULHAM, A.; BORDEU, J.; ALLAINGUILLAUME, M. WILKINSON. Genetic diversity and pedigree for *Sophora toromiro* (Leguminosae): a tree extinct in the wild. **Molecular Ecology**, 8:725-738, 1999.

MIRHOSIENI, S.Z.; SEIDAVI, A.R.; GHANIPOOOR, M.; ETEBARI, K. Estimation of General and Specific Combining Ability and Heterosis in New Varieties of Silkworm, *Bombyx mori* L. **Journal of Biological Sciences**, 4:725-730, 2004.

MITA, K.; KASAHARA, M.; SASAKI, S.; NAGAYASU, Y.; YAMADA, T.; KANAMORI, H.; NAMIKI, N.; KITAGAWA, M.; YAMASHITA, H.; YASUKOSHI, Y.;

KADONO-OKUDA, K.; YAMAMOTO, K.; AJIMURA, M.; RAVIKUMAR, G.; SHIMOMURA, M.; NAGAMURA, Y.; SHIN-I, T.; ABE, H.; SHIMADA, T.; MORISHITA, S.; SASAKI, T.. The Genome Sequence of Silkworm, *Bombyx mori*. **DNA Research**, 11:27–35, 2004.

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

NAGARAJU, J. Recent advances in silkworm biology. **Current Science**, 83:4, 2002.

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

NAGARAJU, J.; KUMAR, T.P. Effects of selection on cocoon filament length in divergently selected line of the silkworm, *Bombyx mori* **Journal of Sericulture Science of Japan**, 64:103-109, 1995.

PENACCHIO, H.L. **Casulo de seda**: proposta de preço mínimo safra 2006/2007. Disponível em: [www.conab.gov.br/conabweb/download/precos\\_minimos/proposta\\_de\\_precos\\_minimos\\_safra\\_2006\\_07.pdf](http://www.conab.gov.br/conabweb/download/precos_minimos/proposta_de_precos_minimos_safra_2006_07.pdf). Acessado em: 20, outubro, 2007.

PEREIRA, E.P.; CONTE, H.; RIBEIRO, L.F.C.; ZANATTA, D.B.; BRAVO, J.P.; FERNANDEZ, M.A.; BRANCALHÃO, R.M.C. Cytopathological process by multiple Nucleopolyhedrovirus in the testis of *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, 99:4-7, 2008.

PORTO, A.J.; OKAMOTO, F. Desempenho produtivo de quatro raças do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) e seus cruzamentos. **Boletim da Indústria Animal**, 60:179-184, 2003.

PORTO, A.J.; OKAMOTO, F. Estratégias de cruzamentos do bicho-da-seda com vistas à manifestação da heterose. **Veterinária e Zootecnia**, 15:299-311, 2008.

PORTO, A.J.; OKAMOTO, F.; CUNHA, E.A.; OTSUK, I.P. Caracterização de oito raças do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.). **Ciência Rural**, 1:34-37, 2004.

PRADEEP, A.R.; JINGADE, A.H.; URS, R.S. Molecular markers for biomass traits: Association, interaction and genetic divergence in silkworm *Bombyx mori*. **Biomarker Insights**, 2:197-217, 2007.

PRADEEP, A.; CHATERGEE, S.; NAIR, C. Genetic differentiation induced by selection in an inbred population of the silkworm *Bombyx mori*, revealed by RAPD and ISSR marker systems. **Journal of Applied Genetics**, 46:291-298, 2005.

QIAN W.; GE, S.; HOUNG, D-Y. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 102:440–449, 2001.

RAJANNA, G.S.; REDDY, G.S. Studies on the variability and interrelationship between some quantitative characters in different breeds of silkworm, *Bombyx mori* L. **Sericologia**, 30:67-74, 1990.

RAJANNA, K.L.; PUTTARAJU, H.P. Heterosis among lines selected for pupal weight in the interline hybrids of the silkworm *Bombyx mori* L. **Sericologia**, 38:587-595, 1998.

RAKOCZY–TROJANOWSKA, M.; BOLIBOK, H. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. **Cellular and Molecular Biology Letters**, 9:221-238, 2004.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.P. **Genética na agropecuária**. Lavras: UFLA, 2008. 463p.

RAO, C.G.; SESHAGI, S.V.; RAMESH, C.; IBRAHIM, B.K., NAGARAJU, H.;CHANDRASHEKARAIAH. Evaluation of genetic potential of the polyvoltine silkworm (*Bombyx mori* L.) germplasm and identification of parents for breeding programme. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)**, 7:215-220, 2006.

REDDY, K.D.; NAGARAJU, J.; ABRAHAM, E.G. Genetic characterization of the silkworm *Bombyx mori* by simple sequence repeat (SSR)-anchored PCR. **Heredity**, 83:681-687, 1999.

RIBEIRO, L.F.C.; BRANCALHÃO, R.M.C.; TORQUATO, E.F.B; FERNANDEZ, M. A. Susceptibility of the *Bombyx mori* cardia cells to nucleopolyhedrovirus, multiple subgroup, BmMNPV. **Journal of Invertebrate Pathology**, 100:195–198, 2009a.

RIBEIRO, L.F.C.; ZANATTA, D.B.; BRAVO, J.P.; BRANCALHÃO, R.M.C.; FERNANDEZ, M.A. Molecular markers in commercial *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) hybrids susceptible to multiple nucleopolyhedrovirus. **Genetics and Molecular Research**, 8:144-153, 2009B.

SALIMATH, S.S.; OLIVEIRA, A.C.; GODWIN, I.D.; BENNETZEN, J.L. Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers. **Genome**, 38:757-763,1995.

SANTOS, S.A.; SILVA, J.L.C.; BALANI, V.A.; SEIXAS, F.A.V.; FERNANDEZ, M.A. Conserved baculoviral ORFs 10 and 14 from *Bombyx mori* multiple nucleopolyhedrovirus. **Genetics and Molecular Research**, 9:457-470, 2010.

SEAB. SECRETARIA DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO DO PARANÁ. **Análise da conjuntura agropecuária - Safra 2009/2010 Curitiba: SEAB**, 2010.

SEAB. SECRETARIA DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO DO PARANÁ. **Produção de casulos de seda aumenta 11,47% no Paraná**. Disponível em: [www.seab.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=3047](http://www.seab.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=3047). Acessado em: 20, outubro, 2007.

SENGUPTA, K.; KUMAR, P.; BAIG, M. **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. 88p.

SIDDIQUI, A.A. Studies on heterosis and heterobeltiosis in the tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D. **Sericologia**, 37:59-69, 1997.

SILKWORMBASE. **Strain list**. Disponível em: [http://www.shigen.nig.ac.jp/ilkwormbase/ViewStrain.do;jsessionid=A224165F7072290BC7ABBAB018DEC855.4\\_8?group=1](http://www.shigen.nig.ac.jp/ilkwormbase/ViewStrain.do;jsessionid=A224165F7072290BC7ABBAB018DEC855.4_8?group=1). Acesso em: 22, agosto, 2010.

SINGH, H.; NAGARAJU, J.; KALPANA, G.V. Studies on hybrid vigour in different crosses of the silkworm *Bombyx mori*. **Sericologia**, 38:155-158, 1998.

SRIVASTAVA, P.P.; KAR, P.K.; AWASTHI, A.K.; URS, R.S. Identification and Association of ISSR Markers for Thermal Stress in Polyvoltine Silkworm *Bombyx mori*. **Russian Journal of Genetics**, 43:858–864, 2007.

SRIVASTAVA, P.P.; VIJAYAN, K.; AWASTHI, K.; KAR, P.K.; THANGAVELU, K.; SARATCHANDRA, B. Genetic analysis of silkworms (*Bombyx mori* L.) through RAPD markers. **Indian Journal of Biotechnology**, 4:389-395, 2005.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, 17:6463-6471, 1989.

TSUCHIDA, K.; WELLS, M.A.; Digestion, absorption, transport and storage of fat during the last larval instar of *Manduca sexta*. Changes in the role of lipophorin in the delivery of dietary lipid to the fat body. **Insect Biochemistry**, 18:263–268, 1988.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRITERS, A.; POT, J.; PALEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, 23:4407-4414, 1995.

WATANABE, J.K.; YAMAOKA, R.S.; BARONI, S. A. **Cadeia produtiva da seda: diagnósticos e demandas atuais**. Londrina: Iapar, 2000. 129p.

WILLIAMS, J.G.K.; HANAFEY, M.K.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY S.V. DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18:6531-6535, 1990.

WOLFE, A.D.; LISTON, A. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: SOLTIS, D.E; SOLTIS, P.S.; Doyle, J.J. (eds.). **Plant Molecular Systematics II**. Boston: Kluwer, 1998. p. 43-86.

ZANATTA, D.; BRAVO, J.P.; BARBOSA, J.F.; MUNHOZ, R.E.F.; FERNANDEZ, M.A. Evaluation of economically important traits from sixteen parental strains of



the silkworm *Bombyx mori* L (Lepidoptera: Bombycidae). **Neotropical Entomology**, 38:327-331, 2009.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, 20:176-183, 1994.

ZUROVEC, M.; YANG, C.; KODRÍK, D.; SEHNAL, F. Identification of a novel type of silk protein and regulation of its expression. **Biological Chemistry**, 25:15423-15428, 1998.

## CAPÍTULO I

### **Caracterização produtiva, herdabilidade e correlação genética de raças de *Bombyx mori* L. do Banco de Germoplasma da Universidade Estadual de Maringá**

#### **RESUMO**

A avaliação de raças de *Bombyx mori* (bicho-da-seda) dos bancos de germoplasma é uma das etapas mais importantes na manutenção dos genótipos. O objetivo deste trabalho foi avaliar onze raças de bicho-da-seda visando sua caracterização produtiva, estimativa de herdabilidade e correlação genética. Foram determinados o coeficiente de herdabilidade e a correlação entre características biológicas e produtivas importantes para a produção de seda. As características comprimento e peso de lagartas, do par de glândulas sericígenas, da pupa, do casulo e de sua casca sérica e do comprimento e largura do casulo, apresentaram alta herdabilidade, demonstrando baixa variância do ambiente em relação à variância fenotípica. Por outro lado, o teor de seda apresentou baixa herdabilidade e não houve nenhuma característica que tenha se correlacionado significativamente com esta importante variável.

## ABSTRACT

### **Characterization productive, heritability's and genetic correlation, of silkworm strains from UEM's Germplasma Bank**

The characterization of the *Bombyx mori* from germplasm banks is important in genotypes maintenance programs. The objective of this study was to evaluate the heritability and genetic correlation from eleven silkworm strains. Silk production biological and productive relevant characters were analyzed. The larval characteristics larval length, silk glands weight, cocoon weight, cocoon length, cocoon width, pupa weight and shell weight showed high heritability, indicating low variance of the environment in relation the phenotypic variance. Moreover, the raw silk percent showed low heritability and there was no feature that has correlated significantly with this important variable.

## 1. INTRODUÇÃO

O bicho-da-seda, *Bombyx mori* Linnaeus, classificado como da família Bombycidae, é um lepidóptero muito estudado e usado como sistema-modelo com rico repertório de informações genéticas sobre mutações que afetam seu desenvolvimento, morfologia e comportamento (Arunkumar et al., 2006). Esta espécie tem sido utilizada como fonte produtora de seda e perdeu algumas características devido a muitos anos de criação em condições artificiais e ao processo de domesticação.

Um banco de germoplasma pode ser definido como a unidade conservadora de material genético. Os bancos de germoplasma podem ser utilizados a qualquer momento em uma pesquisa científica e devem ter manutenção constante e ser descritos quanto a variações fenotípicas e genotípicas por intermédio de descritores quantitativos e qualitativos. Mais, recentemente, ferramentas moleculares permitem a análise genotípica e correlacioná-la com características fenotípicas (Ferreira e Grattapaglia, 1995).

Sendo a sericicultura uma prática muito antiga e de extensa distribuição geográfica, existem diversos bancos de germoplasma de *B. mori* no mundo. Por exemplo, o Banco de Germoplasma Central da China possui mais de 600 raças de bicho-da-seda (FAO, 2003). Na Índia (CSB, 2010), um país com tradição na produção de seda, e no Japão (Silkwormbase, 2010) também há grandes bancos de germoplasma, cujas raças são bem descritas e documentadas. Esses bancos são de extrema importância, pois a partir deles são avaliadas, selecionadas e cruzadas as raças que apresentem as melhores características qualitativas e quantitativas, formando híbridos potencialmente comerciais.

A avaliação das raças de *B. mori* dos bancos de germoplasma é uma das etapas mais importantes na manutenção dos bancos, facilitando a conservação e a utilização destes recursos genéticos (FAO, 2003). Com base nos dados de caracterização dos germoplasma e sua possível correlação com diferentes origens geográficas torna-se possível a criação de híbridos comerciais de bicho-da-seda e também para a pesquisa científica (Srivastava et al., 2005).

Exemplares do bicho-da-seda não são mais observados na natureza, sendo estes totalmente dependentes da intervenção humana para sua

sobrevivência. As reservas genéticas desta espécie somente são encontradas em bancos de germoplasma. O problema é que muitos países tradicionais na sericicultura são hoje países industrializados e conseqüentemente menos envolvidos na manutenção dos bancos de germoplasma de *B. mori*. Dessa forma, boa parte do estoque genético e da garantia de sobrevivência da espécie está concentrada apenas em países como China, Índia e Brasil que tem a sericicultura como atividade agropecuária mais relevante.

Neste contexto, a pesquisa científica tem papel vital na manutenção dos acervos genéticos desta espécie, seja para o fornecimento de germoplasma para programas de melhoramento, seja para a multiplicação das raças visando a manutenção da espécie.

No Brasil, com exceção do Banco de Germoplasma da Universidade Estadual de Maringá, os demais acervos genéticos nacionais pertencem ao setor privado, que hoje é constituída de uma única empresa, a Fiação de Seda BRATAC S/A.

Essas raças devem ser mantidas e multiplicadas sistematicamente, para que não ocorra a perda de viabilidade de nenhuma raça, o que poderia comprometer projetos em desenvolvimento e novas propostas. A manutenção do banco de germoplasma das raças é uma tarefa especializada, onde há grande precaução em evitar a mistura das mesmas e a multiplicação aleatória.

Por tratar-se de um patrimônio genético de relevância, a manutenção e caracterização do banco de germoplasma exigem avaliações qualitativas e quantitativas quanto a diversas características produtivas, além da estimação da correlação e da herdabilidade destas. A realização de estudos de parâmetros genéticos de características quantitativas possibilita a seleção, refletindo o potencial do genoma do organismo em sua expressão fenotípica (Singh et al., 1998). Este conhecimento não poderia ser diferente em programas de melhoramento do bicho-da-seda (Jayaswal et al., 1990).

A principal importância da herdabilidade para um programa de melhoramento está em seu papel preditivo, expressando a confiança do valor fenotípico como um guia para o valor genético ou o grau de correspondência entre o valor fenotípico e o valor genético. Desta forma, o melhorista pode se subsidiar deste coeficiente para a escolha adequada do critério de seleção a ser adotado (Singh et al., 1998).

O objetivo deste trabalho foi avaliar onze raças de bicho-da-seda pertencentes ao Banco de Germoplasma da UEM, visando sua caracterização produtiva, estimativa de herdabilidade e correlação genética, fornecendo assim informações básicas para a descrição e manutenção deste acervo genético.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos na sirgaria experimental de Nova Esperança, Paraná, com raças que pertencem ao Banco de Germoplasma da UEM, nos meses de fevereiro e março de 2008.

Foram avaliadas 11 raças de *B. mori* de diferentes origens geográficas: M12-2, M11-A, M19-2, M18-2, M11-2, M8, B106 e J1, de origem japonesa e C211, C24 e C25, de origem chinesa.

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

Os onze genótipos de bicho-da-seda foram analisados em função de caracteres biológicos de grande influência genética, que estão direta ou indiretamente relacionados com a produção de seda. As medidas métricas foram obtidas com auxílio de paquímetro digital e as de pesagem foram realizadas em balança semi-analítica. Foram analisadas as variáveis: comprimento de lagartas (CL); peso do par de glândulas sericígenas (PG); peso de 10 lagartas no 5º dia do 5º instar (P10L); peso (PC), largura (LC) e comprimento de casulos (CC); peso de casca sérica (PCS) e peso de pupas (PP). O cálculo de teor de seda líquido (TS), foi realizado segundo a equação:  $PCS/PC \times 0,76$ , devido ao desconto de 14% com as perdas na fiação.

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições de parcelas de trinta casulos ou lagartas. Os resultados foram analisados pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância. As mesmas características consideradas na análise de variância e testes de médias foram estimadas quanto à sua herdabilidade no sentido amplo. Visando estudar o grau de associação entre as variáveis estudadas com a intenção de avaliar a viabilidade da seleção indireta entre características fortemente correlacionadas positivamente, foi obtido o coeficiente de correlação de Pearson. A estimativa da correlação e da herdabilidade foi realizada com auxílio do software estatístico GENES (Cruz, 2001).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As raças de *B. mori* foram analisadas em função de caracteres biológicos de grande influência genética e que estão direta ou indiretamente relacionados com a produção de seda. O Quadro 1 apresenta estes dados.

Quadro 1 - Valores médios de caracteres biológicos<sup>1</sup> de onze raças do Banco de Germoplasma de *Bombyx mori* da Universidade Estadual de Maringá

Raças	CL	PG	P10L	PC	LC	CC	PCS	PP	TS
M12-2	5,72 b	0,50 a	26,85 a	1,33 c	1,46 d	3,17 a	0,27 a	1,07 c	16,70 a
M11-A	6,14 a	0,54 a	27,78 a	1,34 c	1,56 c	3,17 a	0,28 a	1,08 c	15,86 a
M19-2	5,99 a	0,46 a	23,70 b	1,33 c	1,58 c	3,12 b	0,26 a	1,05 c	15,08 a
M18-2	5,84 b	0,44 b	26,28 a	1,32 c	1,52 d	3,11 b	0,26 a	1,03 c	14,88 a
B106	6,10 a	0,51 a	27,28 a	1,40 b	1,49 d	3,19 a	0,28 a	1,12 b	15,28 a
M11-2	4,89 c	0,37 b	17,48 c	1,37 b	1,88 b	2,95 d	0,29 a	1,11 b	16,36 a
M8	5,56 b	0,38 b	23,65 b	1,12 d	1,28 e	3,02 c	0,22 b	0,89 d	14,86 a
J1	6,32 a	0,48 a	27,23 a	1,38 b	1,52 d	3,19 a	0,30 a	1,14 b	16,70 a
C211	6,02 a	0,37 b	25,28 b	1,49 a	1,98 a	3,08 b	0,28 a	1,21 a	14,32 a
C24	5,89 b	0,41 b	23,40 b	1,49 a	1,65 c	3,03 c	0,27 a	1,09 c	13,62 a
C25	5,07 c	0,31 b	19,40 c	1,40 b	1,87 b	2,93 d	0,27 a	1,13 b	14,78 a
Média Geral	5,78	0,43	24,39	1,36	1,62	3,09	0,27	1,08	15,18
CV	4,53	13,93	9,52	3,36	4,21	1,76	8,81	4,57	9,53

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna mostram diferenças significativas pelo teste Scott-knott ( $P < 0.05$ ). <sup>1</sup>(CL) comprimento da lagarta, em centímetros; (PG) peso do par de glândulas sericígenas, em gramas; (P10L) peso de 10 lagartas do 5º instar, em gramas; (PC), peso, em gramas, (LC), largura e (CC), comprimento do casulo, em centímetros; (PCS), peso da casca sérica, em gramas; (PP), da pupa, em gramas; (TS), teor de seda líquido, em porcentagem.

Todas as características (Quadro 1), com exceção do TS, apresentaram variação significativa, de 5% de probabilidade.

O teor de seda é uma característica importante para os produtores e para as empresas de tecelagem, porém não tão relevante quando usada com a finalidade de caracterização de genótipos, uma vez que não é discriminatória. Para este objetivo, são mais indicadas características como peso do casulo e da casca sérica, que costumam ter desempenho diferenciado de acordo com o genótipo. Resultados semelhantes, onde não houve diferença significativa entre os genótipos e/ou tratamentos quanto ao TS, também foram relatados para outras raças (Belizzi et al. 2001; Porto et al., 2004; Porto e Okamoto, 2008). O teor de seda médio apresentado pelas raças aqui analisadas é inferior quando



comparado com 16,5% e 16,4% descritos por Porto e Okamoto (2003) e Porto et al. (2004), respectivamente. Zannata et al. (2009), avaliando 16 raças do mesmo Banco de Germoplasma da UEM, descreveram TS médio de 18,3%.

Os caracteres aferidos nas fases larvais estão indiretamente relacionados com a produtividade, porém são de fundamental importância quando usados como descritores de germoplasmas. As raças M11-A, B106 e J1 destacaram-se positivamente nestes quesitos, apresentando as maiores médias de CL, P10L e PG (Quadro 1).

Os valores de PC, PCS estão diretamente ligados à produtividade. Quanto ao PC, duas raças chinesas despontaram, com 1,49g, como portadoras dos maiores casulos. Por outro lado, a raça japonesa M8, cujos casulos apresentaram em média 1,12g, foram os menos pesados. De modo geral, os valores médios encontrados nesta variável foram similares aos encontrados por Porto e Okamoto (2003), cujo valor de PC foi de 1,36g, estudando 4 linhagens do bicho-da-seda e por Porto et al. (2004), caracterizando 8 linhagens com casulos pesando em média 1,34 g.

Quanto ao peso da casca sérica (PCS), uma medida mais refinada da produção de seda, nota-se que o desempenho só foi menor na raça japonesa M8, que também apresentou o menor valor para PC.

Os caracteres associados com o tamanho e forma do casulo, CC e LC, devem ser mensurados devido à necessidade dos casulos serem produtivos e apresentarem o formato ideal para a tecelagem industrial. Novamente a raça M8 destacou-se por apresentar os menores casulos. A raça chinesa C211 apresentou, em média, os casulos mais largos. Esses dados eram esperados desde que é conhecido que as raças de origem Japonesa produzem casulos médios e de forma alongada, enquanto as raças chinesas produzem casulos de forma esférica a oval (Okino, 1982).

Os caracteres avaliados obtiveram coeficientes de herdabilidade superior a 70% (Quadro 2), com exceção do teor de seda, dando um indicativo de que a variância de ambiente apresenta contribuição inferior à variância total.

Estudos sobre atributos qualitativos e quantitativos, intrínsecos de cada raça, 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.

Quadro 2 - Valores de herdabilidade em características biológicas e produtivas em raças de *Bombyx mori*

Variável	Herdabilidade (%)
Comprimento da Lagarta	91,36
Peso de 10 lagartas maduras	88,06
Peso da Glândula sericígena	82,62
Peso do casulo	94,74
Comprimento do casulo	91,63
Largura do casulo	97,36
Peso da pupa	90,34
Peso da casca sérica	70,54
Teor de seda	32,21

Os elevados coeficientes de herdabilidade das variáveis, com exceção do teor de seda, as tornam passíveis de utilização em programas de seleção de parentais para hibridação com elevado grau de expressão genética nestes atributos.

Dessa forma, destaca-se o desempenho das raças em quesitos com alta herdabilidade, como peso do casulo e comprimento da lagarta, que são apontadas nas raças estudadas como características com menor influência ambiental. A raça que se destaca nestas duas variáveis é a chinesa C211, seguida pelas raças japonesas M11-A, M11-2 e B106, que podem ser selecionadas com maior segurança para prosseguir em programas de melhoramento. O resultado está apresentado no Quadro 3.

Foram investigadas as correlações entre trinta e seis possíveis associações entre as nove características avaliadas. Destaca-se a significativa correlação entre as variáveis em apenas onze possíveis associações: comprimento da lagarta x peso de 10 lagartas, comprimento da lagarta x peso do par de glândulas sericígenas, comprimento da lagarta x comprimento do casulo, peso de 10 lagartas no 5º instar x peso do par de glândulas sericígenas, peso de 10 lagartas no 5º instar x comprimento do casulo, peso do par de glândulas sericígenas x comprimento do casulo, largura do casulo x peso do casulo, largura

do casulo x peso da pupa, peso do casulo x peso da pupa, peso do casulo x peso da casca sérica e peso da pupa x peso da casca sérica.

Quadro 3 - Correlação de Pearson entre as características<sup>1</sup> analisadas para onze raças do Banco de Germoplasma de *Bombyx mori* da Universidade Estadual de Maringá

Variáveis	Correlação
CL x P10L	89,92*
CL x PG	70,62*
CL x LC	-39,05
CL x PC	16,94
CL x CC	85,31*
CL x PP	13,54
CL x PCS	15,62
CL x TS	-0,54
P10L x PG	79,91*
P10L x LC	-55,64
P10L x PC	-3,76
P10L x CC	92,10*
P10L x PP	-20,80
P10L x PCS	17,00
P10L x TS	50,60
PG x LC	-57,52
PG x PC	-8,63
PG x CC	91,27*
PG x PP	-6,69
PG x PCS	20,51
PG x TS	37,90
LC x PC	71,54*
LC x CC	-50,01
LC x PP	76,40*
LC x PCS	52,79
LC x TS	-12,54
PC x CC	01,35
PC x PP	90,45*
PC x PCS	70,72*
PC x TS	-22,93
CC x PP	09,81
CC x PCS	25,72
CC x TS	32,21
PP x PCS	84,82*
PP x TS	07,55
PCS x TS	52,57

<sup>1</sup>(CL) comprimento da lagarta; (PG) peso do par de glândulas sericígenas; (P10L) peso de 10 lagartas do 5º instar; (PC), peso, (LC), largura, (CC), comprimento do casulo; (PCS), peso da casca sérica; (PP), da pupa; (TS), teor de seda líquido.

\* Significativo a 0,05%.

O principal objetivo deste estudo de correlação foi verificar a característica que se associasse positivamente ao teor de seda, propiciando a seleção indireta e o ganho no teor de seda, uma vez que isto é pouco indicado por seleção direta devido à sua baixa herdabilidade. No entanto, nenhuma característica se correlacionou significativamente com TS, sendo que as variáveis que mais se aproximaram foram o P10L e PCS, com coeficientes de correlação iguais a 50,60% e 52,57%, respectivamente (Quadro 3).

A ação de cientistas envolvidos na pesquisa sericícola é de vital importância para a manutenção dos estoques genéticos desta espécie, seja pelo fornecimento de germoplasma para programas de melhoramento, seja pela multiplicação das raças visando a manutenção da espécie.

As informações levantadas neste estudo permitem uma avaliação preliminar do material genético disponível, de forma a direcionar um programa de seleção e formação de um híbrido comercial do bicho-da-seda. É possível a obtenção de ganho genético nas características comprimento da lagarta, peso de 10 lagartas maduras, peso da glândula sericígena, peso, comprimento e largura do casulo, peso da casca sérica e peso da pupa que apresentaram elevados valores de herdabilidade.

#### 4. CONCLUSÕES

As raças M11-A, B106 e J1 destacaram-se positivamente nos quesitos CL, P10L e PG, apresentando as maiores médias.

Quanto aos valores de peso de casulo, duas raças chinesas, C211 e C24, apresentaram os maiores casulos. Por outro lado, a raça japonesa M8, cujos casulos apresentaram em média 1,12g, foram os menos pesados.

Os caracteres avaliados nessas onze raças apresentaram alta herdabilidade, demonstrando baixa variância do ambiente em relação à variância fenotípica, exceto na variável teor líquido de seda.

Não é possível realizar a seleção indireta para o teor de seda, uma vez que não houve correlação entre esta característica com todas as demais.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARUNKUMAR, K.P.; METTA, M.; NAGARAJU, J. Molecular phylogeny of silkmoths reveals the origin of domesticated silkmoth, *Bombyx mori* from Chinese *Bombyx mandarina* and paternal inheritance of *Antheraea proylei* mitochondrial DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 40:419-427, 2006.
- BELLIZZI, N.C.; MARCHINI, L.C.; TAKAHASHI, R. Mulberry hybrids fertilized with organic matter and gypsum on silkworm production. **Scientia Agricola**, 58:349-355, 2001.
- CRUZ, C.D. **Programa Genes (Versão Windows)**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV. 2001.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Conservation status of silkworm germplasm resources in China**. 2003. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/005/AD108E/ad108e01.htm#TopOfPage>. Acesso em: 14/04/2010
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1995. 220p.
- JAYASWAL, K.P.; SINGH, T.; SEN, S.K. Correlations between economic parameters and their application in silkworm breeding. **Indian Silk**, 29:25-27.
- OKINO, I. **Manual de sericicultura**. Bauru: ni, 1982. 80p.
- PORTO, A.J.; OKAMOTO, F. Desempenho produtivo de quatro raças do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) e seus cruzamentos. **Boletim da Indústria Animal**. 60:179-184, 2003.
- PORTO, A.J.; OKAMOTO, F.; CUNHA, E.A.; OTSUK, I.P. Caracterização de oito raças do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.). **Ciência Rural**, 34:259-264, 2004.
- PORTO, A.J.; OKAMOTO, F. Estratégias de cruzamentos do bicho-da-seda com vistas à manifestação da heterose. **Veterinária e Zootecnia**, 15:299-311, 2008.

SINGH, H.; NAGARAJU, J.; KALPANA, G.V. Studies on hybrid vigour in different crosses of the silkworm *Bombyx mori*. **Sericologia**, 38:155-158, 1998.

SRIVASTAVA, P.P.; VIJAYAN, K.; AWASTHI, K.; KAR, P.K.; THANGAVELU, K.; SARATCHANDRA, B. Genetic analysis of silkworms (*Bombyx mori* L.) through RAPD markers. **Indian Journal of Biotechnology**, 4:389-395, 2005.

ZANATTA, D.; BRAVO, J.P.; BARBOSA, J.F.; MUNHOZ, R.E.F.; FERNANDEZ, M.A. Evaluation of economically important traits from sixteen parental strains of the silkworm *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). **Neotropical Entomology**, 38:327-331, 2009.

## CAPÍTULO II

### Avaliação do desempenho produtivo de híbridos de *Bombyx mori* L. do Banco de Germoplasma da Universidade Estadual de Maringá

#### RESUMO

Neste estudo, foram conduzidos cruzamentos entre matrizes previamente selecionadas. Foram utilizadas quatro matrizes de origem japonesas (HA-A, J1, M12-B e M18-2) e quatro matrizes de origem chinesa (C24-2, C24-A, C122-B e C209), originando 32 híbridos simples, classificados de acordo com a sua origem materna. Os cruzamentos recíprocos foram realizados. Um híbrido comercial foi usado como testemunha. Foram avaliadas as características: peso de 30 casulos, peso de 30 cascas séricas, peso unitário do casulo e teor de seda. O delineamento experimental foi o completamente casualizado, com 4 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (Teste de Fischer) e as medias foram comparadas pelo teste Scott-Knott. A dissimilaridade morfológica entre as matrizes parentais foi calculada pela distância generalizada de Mahalanobis usando o software *GENES*. As matrizes HA-A e C24-2 foram identificadas como distantes geneticamente pela distância de Mahalanobis e compõem melhores híbridos, C122-B x HA-A e HA-A x C24-2 nos quesitos investigados. O desempenho dos híbridos confirmou a influência de efeito materno sobre as combinações híbridas devendo-se sempre conduzir cruzamentos recíprocos para a avaliação de híbridos simples de *B. mori*.



## ABSTRACT

### **Productive performance evaluation of the *Bombyx mori* Hybrids from UEM's Germplasm Bank**

In this study, we conducted single crosses between four silkworm strains, previously selected. Four Japanese origin (HA-A, J1, M12 and M18-2) and four strains of Chinese origin (C24-2, C24-A,-B C122 and C209) was used, resulting in 32 hybrids, classified according to their maternal origin. Reciprocal crosses were performed. A commercial hybrid was used as control. The characteristics evaluated were: 30 cocoon weight, 30 cocoon shell weight, cocoon weight and raw silk percentage. The experimental design was a completely randomized with four replications. Data were subjected to analysis of variance (Fischer's test) and the average was compared by Scott-Knott test. The morphological dissimilarity between the parental arrays was calculated by the Mahalanobis distance using the GENES software. HAA and C24-2 strains were identified as genetically distant by by Mahalanobis distance and they compose the best hybrids and the C122-B x HA-A and HA-A x C24-2 in the traits analyzed. The performance of the hybrids confirmed that there is the influence of maternal effect the influence on the hybrid combinations and should always conduct reciprocal crosses for the evaluation of *Bombyx mori* hybrids.

## 1. INTRODUÇÃO

Os programas de melhoramento genético do bicho-da-seda objetivam reunir genes desejáveis em combinações apropriadas, a fim de melhorar o desempenho genético para maximização da produção e da produtividade por unidade de área (Singh et al., 2003). Sistemas de cruzamentos conduzidos são utilizados no melhoramento genético, pois permitem a avaliação das combinações híbridas e permitem também a análise do potencial heterótico de matrizes parentais.

A definição de parentais para serem cruzados é uma estratégia utilizada na formação de híbridos de bicho-da-seda. A variação genética acumulada mediante a adaptação ao longo de centenas de anos pode ser usada para medir a diversidade existente e, portanto, monitorar e promover a conservação do germoplasma e sua eficiente utilização (Kumaresan et al., 2007).

A hibridação e a seleção convencional foram e ainda são amplamente utilizados para melhorar o potencial de rendimento do fio de seda. Diversos estudos reportam a eficiência da hibridação em programas de melhoramento de diferentes países (Zhu e Weir, 1996; Porto e Okamoto, 2003; Mirhosieni et al., 2004; Porto e Okamoto, 2008) e para determinar os melhores germoplasmas (Raju e Krishnamurthy 1993; Das et al., 1994; Kuramesan et al., 2003; Rao et al., 2006; Talebi e Subramanya, 2009).

No Brasil, os híbridos de importância comercial pertencem a uma empresa particular. A Universidade Estadual de Maringá (UEM) possui o único acervo público desta espécie no país, preservando os estoques genéticos de raças de origens chinesas e japonesas, das quais pouco se conhece sobre seu desempenho genotípico e fenotípico (Fernandez et al., 2005). O estudo genético-exploratório de raças de bicho-da-seda aplicado ao melhoramento genético é de suma importância para o desenvolvimento de híbridos adaptados às condições climáticas regionais, contribuindo assim para a agricultura familiar do Paraná.

Parte do Banco de Germoplasma de *B. mori* da UEM foi caracterizada nos aspectos produtivos e morfológicos por Zanatta et al., 2009. Dados destas matrizes serviram de base para a condução de cruzamentos e obtenção de híbridos simples avaliados neste trabalho.

No presente estudo foram avaliados 32 híbridos simples por meio de parâmetros de produtividade em bicho-da-seda.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos na sericaria experimental do Instituto de Zootecnia da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (Apta-regional de Gália, no estado de São Paulo) com matrizes que pertencem ao Banco de Germoplasma da UEM, nos meses de fevereiro e março de 2007.

O material biológico foi obtido por meio de cruzamentos de quatro matrizes de origem japonesas (1. HAA, 2. J1, 3. M12-B e 4. M18-2) com quatro matrizes de origem chinesa (5. C24-2, 6. C24-A, 7. C122-B e 8. C209). Estas matrizes foram numeradas e o esquema de cruzamentos foi parcial com cruzamentos recíprocos. Este procedimento originou 32 híbridos simples, classificados de acordo com a sua origem materna, conforme Quadro 1.

Procedeu-se o esquema de cruzamentos parciais, em que cruzamentos entre matrizes de mesma origem geográfica não foram considerados. Além disso, foram realizados cruzamentos recíprocos com a finalidade de investigar-se o efeito materno nas variáveis analisadas. Um híbrido comercial foi usado como testemunha. As matrizes foram selecionadas pelo bom desempenho apresentado em ensaios experimentais anteriores (Zanatta et al., 2009).

Os cruzamentos conduzidos que originaram híbridos simples entre matrizes diferentes só foram possíveis devido ao rigoroso manejo conduzido durante o período reprodutivo. Os casulos foram abertos e as pupas foram separadas de acordo com o sexo. As mariposas do sexo masculino são, geralmente, as primeiras a nascerem e, por isso, foram armazenadas a 4° C, até o nascimento das fêmeas. Após o cruzamento, as fêmeas fecundadas foram colocadas em papéis especiais para ovoposição e os ovos tratados por banho químico para avaliação da F<sub>1</sub>.

Foram mantidos, de cada híbrido F<sub>1</sub>, 2000 exemplares de cada raça, sob condições ambientais semi-controladas (temperatura de 25±2 °C, umidade relativa do ar de 75±2% e fotoperíodo de 16:8 hora), sendo que todos os híbridos receberam o mesmo manejo tanto alimentar e sanitário.

Os híbridos foram analisados em função de características diretamente relacionadas à produção de seda. As medidas métricas foram obtidas com auxílio de paquímetro digital e as de pesagem foram realizadas em balança semi-

analítica. Foram analisadas as variáveis: peso de 30 casulos (PC30); peso de 30 cascas séricas (PCS30) e peso unitário do casulo (PC). O cálculo de teor de seda líquido (TS) foi realizado segundo a equação:  $PCS/PC \times 0,76$ , devido ao desconto de 14% com as perdas na fiação.

Quadro 1 - Híbridos simples de bicho-da-seda (*Bombyx mori*) classificados de acordo com a origem geográfica materna.

Cruzamentos	Cruzamentos recíprocos
Origem materna Japonesa	Origem materna Chinesa
HAA x C24-2	C24-2 x HAA
HAA x C24-A	C24-A x HAA
HAA x C122-B	C122-B x HAA
HAA x C209	C209 x HAA
J1 x C24-2	C24-2 x J1
J1 x C24-A	C24-A x J1
J1 x C122-B	C122-B x J1
J1 x C209	C209 x J1
M12-B x C24-2	C24-2 x M12-B
M12-B x C24-A	C24-A x M12-B
M12-B x C122-B	C122-B x M12-B
M12-B x C209	C209 x M12-B
M18-2 x C24-2	C24-2 x M18-2
M18-2 x C24-A	C24-A x M18-2
M18-2 x C122-B	C122-B x M18-2
M18-2 x C209	C209 x M18-2

O delineamento experimental foi o completamente casualizado, com 4 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (Teste de Fischer) e as médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de significância, usando o software *GENES*.

A dissimilaridade morfológica entre as matrizes parentais foi calculada pela distância generalizada de Mahalanobis (1936), que é uma extensão da distância Euclidiana. O método de agrupamento empregado foi UPGMA (ligação média entre grupos), no programa estatístico *GENES* (Cruz, 2001).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As matrizes usadas como parentais nos cruzamentos conduzidos para a obtenção de híbridos simples foram previamente descritas e analisadas por Zanatta et al. (2009), utilizando sete diferentes caracteres biológicos e produtivos. O agrupamento empregado nestas raças parentais permitiu dividir um grupo original de observações em diversos subgrupos, de maneira que foram obtidos homogeneidade dentro dos subgrupos e heterogeneidade entre os subgrupos.

A análise de agrupamento revelou uma clara divisão em três grupos (Figura 1) e considerando apenas oito raças e não dezesseis como analisados anteriormente (Zanatta et al., 2009), as matrizes de mesma origem agruparam-se entre si indicando maior similaridade morfológica e produtiva. As matrizes que apresentaram as maiores distâncias genéticas foram as originárias do Japão: HA-A e M12-B em relação às originárias da China: C24-2 e C209.

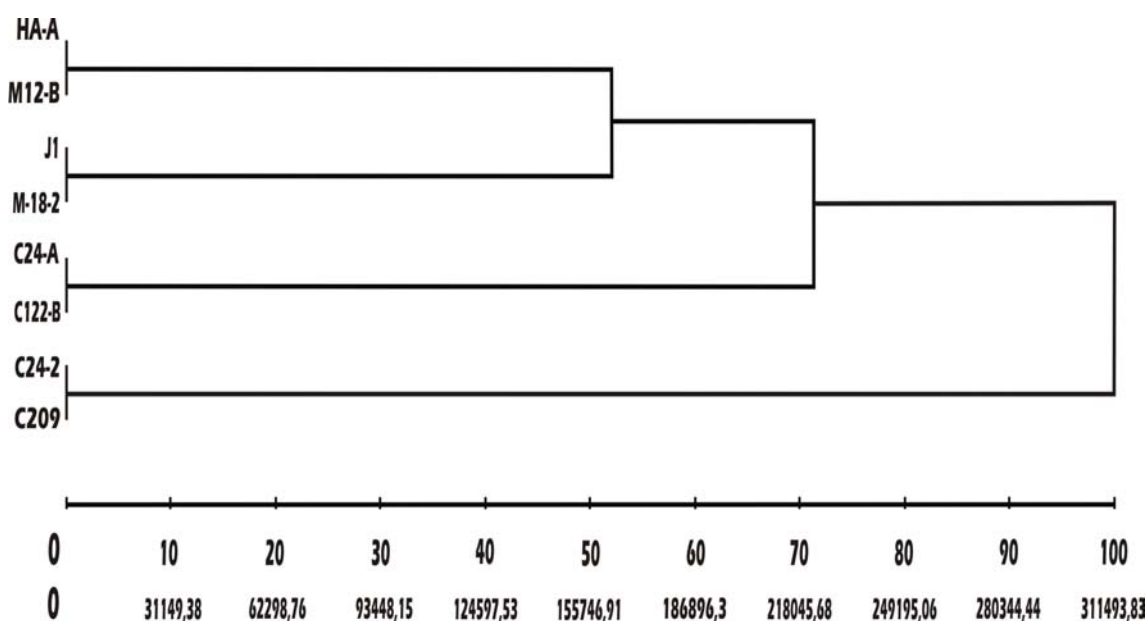


Figura 1 - Dendrograma de oito matrizes de bicho-da-seda de acordo com a distância de Mahalanobis (1936) agrupadas pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method Average).

A análise de variância resultou na caracterização de aspectos produtivos, conforme apresentado no Quadro 1. Os resultados foram significativos estatisticamente em todas as variáveis analisadas.

O teste de médias evidenciou a diferença no desempenho dos híbridos de acordo com a origem materna, ressaltando a importância de se considerar o efeito materno em cruzamentos conduzidos. Desse modo, é necessário realizar o cruzamento recíproco uma vez que a origem geográfica da mãe envolvida na hibridação pode elevar a produtividade. Zhu e Weir (1996) reportam que em ensaios experimentais de melhoramento genético animal os efeitos maternos e ligados ao sexo são os principais responsáveis pelo efeito materno.

Em *B. mori* a maior contribuição da matriz materna envolvida no cruzamento para algumas características pode ser atribuída ao fato de que nesta espécie as fêmeas não realizam crossing over, sendo o cromossomo W isolado de eventos de recombinação do cromossomo Z e outros autossomos (Doira, 1975; Goldsmith et al., 2005)

O melhor desempenho de PC ocorreu em híbridos cujo parental materno é de origem japonesa, sendo que sete das dezesseis combinações híbridas tiveram desempenho equivalente ao híbrido comercial usado como testemunha.

A média geral para PC foi de 1,72g neste esquema de criação de verão, estando em conformidade com resultados obtidos por diversos autores. Arnaut de Toledo et al. (2002) reportaram médias de 1,53g na primavera e 1,90g no outono. Goel et al. (2007) estudaram o desempenho de híbridos de origem geográfica chinesa na Índia e os valores de PC variaram de 1,627 g a 1,810 g. Por outro lado, Porto (2004) obteve casulos mais leves com híbridos simples, cujo peso médio foi de 1,26 g. Entretanto, é necessário ressaltar que este trabalho foi desenvolvido com híbridos cujos parentais possuem a mesma origem geográfica.

A diversidade genética de *B. mori* é derivada da hibridação entre diferentes matrizes de distintas origens geográficas, quais sejam: japonesas, chinesas, européias e indianas. Dentre estas quatro, pode-se destacar que as de origem temperada produzem maior quantidade de fibra, com alta qualidade e fios mais resistentes, enquanto as raças tropicais são mais resistentes às condições adversas, a patógenos e a doenças em geral. No entanto, estas raças de origem tropical produzem menores quantidades de seda, com fios grossos e mais fracos. Portanto, cruzamentos entre raças de diferentes origens geográficas são de suma importância em programas de melhoramento do bicho-da-seda, sendo que esta hibridação configura importante fonte de variabilidade genética passível de

aprimoramento e conseqüente aumento da tolerância aos fatores adversos aliada a maiores valores de produtividade, (Goldsmith et al., 2005; Zanatta et al., 2009).

Quadro 2 - Avaliação produtiva por meio de quatro características biológicas<sup>1</sup> de híbridos simples de bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.)

Combinação/ maternal original	Híbrido	PC30	PCS30	TS	PC
<i>Japão</i>					
1x5	HAA x C24-2	54,62 a	11,14 b	15,51 c	1,82 a
1x6	HAA x C24-A	52,18 b	10,47 c	15,25 c	1,73 b
1x7	HAA x C122-B	51,83 b	11,17 b	16,38 a	1,72 b
1x8	HAA x C209	54,31 a	11,08 b	15,51 c	1,81 a
2x5	J1 x C24-2	50,08 b	10,35 c	15,73 b	1,67 b
2x6	J1 x C24-A	52,04 b	9,98 d	14,58 d	1,73 b
2x7	J1 x C122-B	54,17 a	11,07 b	15,54 c	1,80 a
2x8	J1 x C209	53,28 a	10,10 c	14,41 d	1,77 a
3x5	M12-B x C24-2	51,04 b	10,55 c	15,72 b	1,70 b
3x6	M12-B x C24-A	56,46 a	11,60 a	15,64 b	1,88 a
3x7	M12-B x C122-B	50,82 b	10,56 c	15,79 b	1,68 b
3x8	M12-B x C209	53,66 a	10,54 c	14,92 d	1,78 a
4x5	M18-2 x C24-2	51,80 b	10,15 c	14,88 d	1,73 b
4x6	M18-2 x C24-A	50,24 b	9,88 d	14,96 d	1,67 b
4x7	M18-2 x C122-B	53,38 a	11,08 b	15,77 b	1,78 a
4x8	M18-2 x C209	49,89 b	9,36 e	14,26 d	1,66 b
<i>China</i>					
	Híbrido	PC30	PCS30	TS	PC
5x1	C24-2 x HAA	49,77 b	10,78 b	16,47 a	1,66 b
5x2	C24-2 x J1	48,27 c	9,82 d	15,47 c	1,60 c
5x3	C24-2 x M12-B	51,36 b	10,44 c	15,45 c	1,71 b
5x4	C24-2 x M18-2	51,96 b	10,34 c	15,13 c	1,73 b
6x1	C24-A x HAA	55,63 a	11,81 a	16,13 b	1,86 a
6x2	C24-A x J1	50,17 b	9,85 d	14,97 d	1,66 b
6x3	C24-A x M12-B	46,95 c	9,50 e	15,39 c	1,56 c
6x4	C24-A x M18-2	51,96 b	10,17 c	14,90 d	1,73 b
7x1	C122-B x HAA	53,53 a	11,73 a	16,66 a	1,78 a
7x2	C122-B x J1	51,31 b	11,29 b	16,73 a	1,71 b
7x3	C122-B x M12-B	51,81 b	10,94 b	16,05 b	1,72 b
7x4	C122-B x M18-2	49,71 b	10,72 b	16,38 a	1,66 b
8x1	C209 x HAA	51,70 b	10,44 c	15,34 c	1,72 b
8x2	C209 x J1	50,03 b	9,72 d	14,76 d	1,67 b
8x2	C209 x M12-B	46,88 c	9,54 e	15,45 c	1,56 c
8x4	C209 x M18-2	51,54 b	10,55 c	15,56 c	1,72 b
Híbrido comercial	Testemunha	55,10 a	11,49 a	15,87 b	1,84 a
Média Geral		51,70	10,54	15,49	1,72
CV		3,19	2,63	4,07	4,35

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna são diferentes pelo teste Scott-knott ( $P < 0,05$ ). <sup>1</sup> (PC30), peso de 30 casulos, em gramas; (PCS30), peso de 30 cascas séricas, em gramas; (TS), teor líquido de seda, em porcentagem; (PC), peso unitário do casulo, em gramas.



As características que possuem maior importância do ponto de vista econômico são: peso do casulo (PC), peso da casca sérica (PCS) e teor líquido de seda (TS). Estas variáveis são altamente herdáveis, com exceção do TS, e afetadas pela ação aditiva dos genes e desta forma apresentam boa resposta à seleção (Petkov e Nguyenvan 1987). Possuem caráter quantitativo e são controladas em conjunto por vários genes e fatores ambientais, de modo que é difícil distinguir o efeito de múltiplos genes dos fatores ambientais. Porém, a seleção pode ser conduzida de acordo com o desempenho real do genótipo ou pela predição do desempenho em raças do bicho-da-seda com comprovada eficiência (Zhao et al., 2007).

O teor líquido de seda é a variável mais importante comercialmente. Neste estudo, as médias deste quesito variaram de 14,76% no híbrido C209 x J1 a 16,73% no híbrido C112-B x J1. A média geral para o TS foi de 15,49%, enquanto que a média da testemunha foi de 15,87%. Cinco combinações híbridas, HA-A x C122-B, C24-2 x HA-A, C122-B x HA-A, C122-B x J1 e C122-B x M18-2 tiveram desempenho superior ao do híbrido comercial, nesta variável, com teores de seda superiores a 16%. Os valores são suportados com outras pesquisas publicadas (Porto e Okamoto, 2003; Hariraj e Somashekar, 2006; Goel et al., 2007; Porto e Okamoto, 2008). Este resultado deve ser confirmado em outros ensaios experimentais, porém, preliminarmente, podem-se considerar estes cinco híbridos simples como promissores no programa de melhoramento. Vale ressaltar que, neste ensaio experimental, os genótipos foram submetidos à mesma alimentação e manejo sanitário.

Os dados também indicam que as matrizes fêmeas de origem chinesa contribuíram de maneira positiva para TS em um número maior de combinações híbridas, sendo que quatro híbridos com parental materno de origem da China foram superiores ao híbrido comercial. Para a variável PC, os maiores valores foram encontrados em cruzamentos cuja mãe tem origem japonesa. A discrepância entre os melhores desempenhos em TS e PC está no fato de que casulos pesados não refletem diretamente o potencial teor de seda e sim a somatória deste fator com o peso da pupa e espólio.

A predição do desempenho dos híbridos tem ocupado posição primária nos programas de melhoramento que visam à hibridação (Talebi e Subramanya, 2009). Para tanto, a estimação da distância genética de Mahalanobis

(Mahalanobis, 1936) pode ser uma ferramenta, sendo empregada na predição do desempenho híbrido seja por marcadores genéticos ou morfológicos em raças (matrizes) do bicho-da-seda. Os híbridos C122-B x HA-A e HA-A x C24-2 podem ser considerados os melhores, pois neste ensaio experimental apresentaram as melhores médias em todas as variáveis. Os parentais envolvidos nestes dois esquemas de cruzamentos são distantes geneticamente de acordo com o índice de Mahalanobis estimado com base no desempenho produtivo de sete variáveis (Zanatta et al., 2009) e apresentado na Figura 1.

A hibridação e a seleção parental convencional, baseada em características produtivas, apresentaram bons resultados e indicaram que todas as oito raças parentais (matrizes) de *B. mori* do Banco de Germoplasma da UEM são boas produtoras de seda e, desta forma, são candidatas à germoplasma elite para o programa de melhoramento genético. Esta metodologia convencional foi e ainda é amplamente utilizada para melhorar o potencial de rendimento em seda. Esta estratégia gera variabilidade pela hibridação do genótipo elite (linhagens com as características desejadas) com outras variedades melhoradas e variedades locais, seguido pela seleção dos recombinantes desejáveis (Nagaraju, 2002).

Combinações híbridas avaliadas neste estudo mostraram que a origem geográfica das matrizes que funcionam como mães na hibridação influenciam grandemente a média das variáveis, tornando-se um diferencial produtivo. Os valores médios das características nos descendentes foram diferentes quando as fêmeas envolvidas no cruzamento de mariposas do bicho-da-seda eram de origem do Japão ou da China.

É importante observar que é necessário o nível ótimo de distância genética para a obtenção de heterose. Existe um nível ótimo de divergência genética entre os pais na geração  $F_1$ , assim como não são todos os indivíduos que divergem extremamente, os quais ocuparão grupos heteróticos diferentes, resultando nas melhores combinações híbridas (Talebi e Subramanya, 2009). É necessário haver equilíbrio e a combinação híbrida deve aliar a distância genética entre os parentais à maior probabilidade de união de alelos favoráveis na geração subsequente. Em futuros estudos, pretende-se realizar cruzamentos para estimar a heterose.

Estes resultados demonstraram que o Banco de Germoplasma da UEM possui recursos genéticos promissores para permitir o programa de

melhoramento visando à formação de híbridos adaptados às condições ambientais regionais.

#### 4. CONCLUSÕES

Os híbridos simples apresentaram desempenho satisfatório, em relação à testemunha, com média geral para o teor de seda de 15,49%.

A diferença no desempenho dos híbridos, de acordo com a origem materna envolvida, destacou a importância de se considerar o efeito materno em cruzamentos conduzidos.

É imperativo realizar o cruzamento recíproco em ensaios experimentais que buscam a hibridação em bicho-da-seda, uma vez que a origem geográfica da mãe envolvida na hibridação pode elevar à produtividade.

As matrizes HA-A e C24-2 foram identificadas como distantes geneticamente pela distância de Mahalanobis e compõem os melhores híbridos, C122-B x HA-A e HA-A x C24-2, fornecendo indícios da associação entre a distância genética das matrizes com o desempenho dos híbridos.

O Banco de Germoplasma de *B. mori* da UEM tem matrizes promissoras para prosseguirem no programa de melhoramento visando à formação de um híbrido público brasileiro, adaptado às necessidades regionais.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNAUT DE TOLEDO, J.O.; TAKAHASHI R.; BRAGA, E. Desempenho biológico das raças e dos híbridos do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.), após 5º instar, em duas estações do ano. **Acta Scientiarum**, 24:869-874, 2002.

CRUZ, C.D. **Programa Genes (Versão Windows)**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV. 2001.

DAS, S.K.; PATNAIK, S.; GHOSH. B.; SINGH, T.; NAIR, B.P.; SEN, S.K.; SUBBARAO, G. Heterosis analysis in some three way crosses of *Bombyx mori* L., **Sericologia**, 34:51-61, 1994.

DOIRA, H. Genetical studies of the varnished eye mutant in *Bombyx mori*. **Japanese Journal of Genetics**, 50:115-120, 1975.

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. A utilização da biotecnologia na sericicultura brasileira. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, 35:52-57, 2005.

GOEL, A.K.; CHANDRASHEKHARAIH; REDDY, Y.S. Development and characterization of productive bivoltine inbred lines of silkworm *Bombyx mori* L. **Indian Journal of Animal Research**, 41:157-166, 2007.

GOLDSMITH, M.R.; SHIMADA, T.; ABE, H. The genetics and genomics of the silkworm, *Bombyx mori* L. **Annual Review of Entomology**, 50:71-100, 2005.

HARIRAJ, G.; SOMASHEKAR, T.H. Studies on reeling performance and quality characteristics of raw silk reeled from multibivoltine crossbreed and bivoltine hybrid cocoons. **The Journal of Silk Science and Technology of Japan**, 15:37-42, 2006.

KUMARESAN, P.; SINHA, R.K.; THANGAVELU, K. Heterosis studies in some elite multivoltine silkworm (*Bombyx mori* L.) races with popular bivoltine NB<sub>4</sub>D<sub>2</sub>. **International Journal of Industrial Entomology**, 7:221-229, 2003.

- KURAMESAN, P.; SINHA, R.K.; URS, R.S. An analysis of genetic variation and divergence in Indian tropical polyvoltine silkworm (*Bombyx mori* L.) genotypes. **Caspian Journal of Environmental Sciences**, 5:11-17, 2007.
- MAHALANOBIS, P.C. On the generalized distance in statistics. **Proceedings of the Indian National Science Academy**, 2:49-55, 1936.
- MIRHOSIENI, S.Z.; SEIDAVI, A.R.; GHANIPOOOR, M.; ETEBARI, K. Estimation of General and Specific Combining Ability and Heterosis in New Varieties of Silkworm, *Bombyx mori* L. **Journal of Biological Sciences**, 4:725-730, 2004.
- NAGARAJU, J. Recent advances in silkworm biology. **Current Science**, 83:409-414, 2002.
- PETKOV, N.; NGUYENVAN, L. Breeding genetic studies on some lines of the silkworm, *Bombyx mori* L. **Genetika-i-Selektsiya**, 20:384-354, 1987.
- PORTO, A.J. Avaliação da Heterose em cruzamentos do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.). **Boletim da Indústria Animal**, 61:135-140, 2004.
- PORTO, A.J.; F, OKAMOTO. Desempenho produtivo de quatro raças do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) e seus cruzamentos. **Boletim da Indústria Animal**, 60:179-184, 2003.
- PORTO, A.J.; OKAMOTO, F. Estratégias de cruzamentos do bicho-da-seda com vistas à manifestação da heterose. **Veterinária e Zootecnia**, 15:299-311, 2008.
- RAJU, P.J.; KRISHNAMURTHY, N.B. Breeding of two bivoltines, MG511 and MG512, of silkworm, *Bombyx mori* L., for higher viability and silk productivity. **Sericologia**, 33:577-587. 1993.
- RAO, C.G.; SESHAGI, S.V.; RAMESH, C.; IBRAHIM, B.K.; NAGARAJU, H.; CHANDRASHEKARAIHAH. Evaluation of genetic potential of the polyvoltine silkworm (*Bombyx mori* L.) germplasm and identification of parents for breeding programme. **Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology)**, 7:215-220, 2006.

SINGH, R.D.; RAO, D.R.; KARIAPPA, B.K.; PREMALATHA, V.; DANDIN, S.B. Studies on analysis of combining ability in the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L, **International Journal of Industrial Entomology**, 6:107-113, 2003.

TALEBI, E.; SUBRAMANYA, G. Genetic distance and heterosis through evaluation index in the silkworm, *Bombyx mori* L. **World Applied Sciences Journal**, 7:1131-1137, 2009.

ZANATTA, D.; BRAVO, J.P.; BARBOSA, J.F.; MUNHOZ, R.E.F.; FERNANDEZ, M.A. Evaluation of economically important traits from sixteen parental strains of the silkworm *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). **Neotropical Entomology**, 38:327-331, 2009.

ZHAO, CHEN, K.; HE, S. Key principles for breeding spring-and-autumn using silkworm varieties: from our experience of breeding 873×874. **Caspian Journal of Environmental Sciences**, 5:57-61, 2007.

ZHU, J.; WEIR, B.S. Diallel analysis for sex-linked and maternal effects. **Theoretical and Applied Genetics**, 92:1-9, 1996.

## CAPÍTULO III

### Identificação de genótipos superiores de *Bombyx mori* L. utilizando método não-paramétrico

#### RESUMO

A avaliação de genótipos utilizados no melhoramento genético envolve o desempenho destes em inúmeras variáveis quantitativas. Nesse sentido, diversos métodos estatísticos paramétricos vêm sendo utilizados para avaliação das características individualmente ou para avaliação múltipla. Diversos trabalhos reportam a utilização de método não-paramétrico baseado na elaboração de um índice de avaliação múltipla de genótipos de bicho-da-seda. O presente trabalho objetivou a avaliação de 32 genótipos entre raças matrizes, raças puras e híbridos simples do bicho-da-seda, utilizando a metodologia alternativa estatística não-paramétrica. Foram usadas avaliações provenientes de 5 variáveis qualitativas: comprimento do casulo (CC), peso de 30 casulos (PC30), peso unitário do casulo (PC), peso de 30 cascas séricas (PCS30) e teor líquido de seda (TS) para a formação de um índice único e múltiplo e que permite ranquear genótipos de *B. mori*. Os resultados apontam que os três genótipos mais promissores são híbridos simples, cuja mãe pertence à raça de origem japonesa. O 4º lugar é ocupado por uma raça pura de origem do Japão que, apesar de não ser um híbrido simples, apresentou um desempenho satisfatório e lugar de destaque no ranking. Este método apresenta a notória vantagem de avaliação conjunta das variáveis estudadas apresentando desta forma um único dado que representa o total de características relacionadas ao desempenho do genótipo.



## ABSTRACT

### ***Bombyx mori* superior genotypes Identification using non-parametric method**

Genotypes breeding evaluation involves the performance in several quantitative traits. Accordingly, several parametric statistical methods have been used to evaluate the individual traits or multiple assessments. Several papers report the use of non-parametric method based on indexing the evaluation of multiple of silkworm genotypes. This study objective to evaluate 32 *Bombyx mori* genotypes (matrices, pure breeds and hybrids) using non-parametric statistics as alternative methodology. Five quantitative traits were used: cocoon length (CC), 30 cocoons weight (PC30), cocoon weight (PC), 30 cocoon shells weight (PCS30), raw silk percentage (TS) for formation of a single index and multiple. The results indicate that the three most promising genotypes are hybrids, whose mother belongs to the breed of Japanese origin. The fourth place is occupied by a pure-bred origin of Japan, which although not a simple hybrid presented a satisfactory performance and place in the ranking. This method has obvious advantage of joint evaluation of the variables thus presenting a single figure representing the total performance characteristics related to the genotype.

## 1. INTRODUÇÃO

A seda é uma fibra animal de altíssimo valor, que vem sendo utilizada há muitos anos na confecção de tecidos finos e resistentes. Possui alto valor econômico quando comparada a outras fibras naturais, como algodão e lã. A principal espécie produtora desta fibra é o bicho-da-seda, classificado como da família Bombycidae (*Bombyx mori* L). O produto de seu casulo, assim como atributos produtivos, podem ser melhorados para finalidades têxteis (Nguku et al., 2007) ou para outros destinos tais como indústria farmacêutica.

O Banco de Germoplasma de Bicho-da-Seda da Universidade Estadual de Maringá é um consolidado acervo genético, o único público desta espécie no país, que conta com genótipos oriundos de inúmeras matrizes doadas por empresas que se retiraram do setor sericícola e de materiais, como raças puras e híbridos em processo de melhoramento genético.

A classificação e caracterização de raças de *B. mori* mantidos em um banco de germoplasma são de grande importância para a sericultura, uma vez que esta atividade é suportada pelo constante desenvolvimento de novos híbridos e raças.

A avaliação das variáveis produtivas dos genótipos de um banco de germoplasma em melhoramento pode ocorrer por diferentes metodologias, sendo que os testes paramétricos, como a análise de variância e os testes de média, são os mais utilizados. Contudo, não deve ser descartada a aplicabilidade dos testes não-paramétricos.

Callegari-Jacques (2003) afirma que, enquanto nos testes paramétricos os valores da variável estudada devem ter distribuição normal ou aproximação normal, nos testes não-paramétricos, também chamados por testes de distribuição livre, não há exigências quanto ao conhecimento da distribuição da variável na população. Além disso, a maior parte das provas não paramétricas aplica-se a dados medidos em escala ordinal, como é o caso do teste proposto neste trabalho para a identificação de híbridos superiores de bicho-da-seda.

Diversos trabalhos utilizaram o método não-paramétrico de avaliação múltipla, proposto por Mano et al., (1993), para identificação de matrizes

promissoras de bicho-da-seda (Rao et al., 2006; Rayar, 2007; Ramesha et al., 2009).

O presente estudo considera relevante a avaliação proposta por Mano et al. (1993) e bem aceita na avaliação de germoplasmas em trabalhos indianos. Este método apresenta a notória vantagem de avaliação conjunta das variáveis estudadas, apresentando desta forma um único dado que representa o total de características relacionadas ao desempenho do genótipo. Porém, deve haver ressalva e não indicá-lo como único método de avaliação em bicho-da-seda devido à desvantagem de não identificar-se as diferenças significativas entre os genótipos, como em um método paramétrico, como a análise de variância.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados 34 genótipos, entre raças-origem, raças puras e híbridos comerciais (Quadro 1).

Quadro 1 - Genótipos de bicho-da-seda e sua respectiva identificação

Genótipo	Identificação
M12- 2 x J1	Raça Pura
M11-2 x B106	Raça Pura
J1 x M11-2	Raça Pura
M12-2 x M12-2	Raça Origem
M11-2 x M12-2	Raça Pura
M11-A x M11-2	Raça Pura
B106 x B106	Raça Origem
J1 x C25	Híbrido comercial
J1 x M12-2	Raça Pura
M11-A x C24	Híbrido comercial
C24 x J1	Híbrido comercial
M11-2 x J1	Raça Pura
M11-2 x M11-2	Raça Origem
C24 x B106	Híbrido comercial
C25 x C24	Raça Pura
M11-A x M11-A	Raça Origem
C25 x M12-2	Híbrido comercial
C24 x M12-2	Híbrido comercial
B106 x J1	Raça Pura
B106 x M11-2	Raça Pura
M11-2 x C25	Híbrido comercial
C25 x B106	Híbrido comercial
C25 x M11-A	Híbrido comercial
M12-2 x M11-2	Raça Pura
J1 x M11-A	Raça Pura
C25 x C25	Raça Origem
B106 x M12-2	Raça Pura
C24 x C24	Raça Origem
B106 x M11-A	Raça Pura
M12-2 x C25	Híbrido comercial
C24 x C25	Raça Pura
J1 x B106	Raça Pura
C25 x J1	Híbrido comercial
C24 x M11-2	Híbrido comercial

Em barracão de criação localizado no município de Nova Esperança, Paraná, foram mantidos 2000 exemplares de cada genótipo, sob condições ambientais controladas (temperatura de  $25 \pm 2$  °C, umidade relativa do ar de  $75 \pm 2\%$  e luz branca com fotoperíodo de 16:8 hora), sendo que cada raça recebeu o mesmo manejo, tanto alimentar quanto de criação. Os experimentos foram conduzidos entre os meses de novembro e dezembro de 2009.

Os trinta e quatro genótipos foram avaliados quanto ao comprimento do casulo (CC), em centímetros, peso de 30 casulos (PC30), em gramas, peso unitário do casulo (PC), em gramas, peso de 30 cascas séricas (PCS30), em gramas e teor de seda líquido (TS), em porcentagem. O cálculo de teor de seda líquido (TS), foi realizado segundo a equação:  $PCS/PC \times 0,76$ , devido ao desconto de 14% com as perdas na fiação. As variáveis foram mensuradas com auxílio de balança semi-analítica e paquímetro digital.

As cinco variáveis foram consideradas para uma avaliação não-paramétrica por intermédio da formação de um índice único e múltiplo proposto por Mano et al. (1993).

As médias dos genótipos obtidas em cada variável analisada foram consideradas para a constituição de um método de avaliação múltipla. Este método proposto por Mano et al. (1993) consiste em um índice de avaliação múltipla (IAM) que permite ranquear genótipos de *B. mori*.

$$\text{Índice de Avaliação Múltipla (IAM)} = A - B / C \times 10 + 50.$$

Onde:

A= Média da variável em particular

B= Média geral da variável

C= Desvio-padrão da variável

10= Padrão

50= Constante

Após a determinação do IAM para cada variável de cada híbrido, foi realizada a média destes valores de IAM (Média-IAM).

Além das variáveis quantitativas relacionadas ao desempenho produtivo, avaliou-se também o formato dos casulos produzidos pelos híbridos simples, de acordo com a Figura 1. Esta classificação deve ser determinada visualmente após a retirada das anafaias. Este formato pode ser alongado ou oval e pode ainda ter

variações de intensidade e de acordo com a presença de constrição (cintura) no centro do casulo ou não (Bojan Cristina et al., 2007).

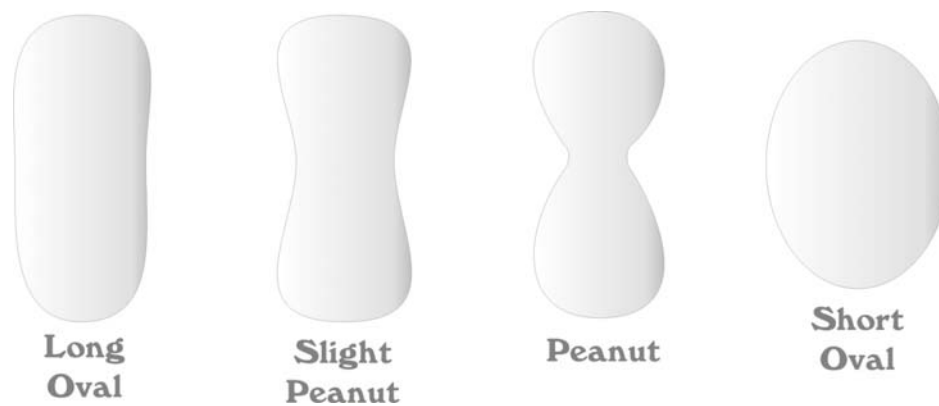


Figura 1 - Tipos de casulos de acordo com o formato em *Bombyx mori*.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média do IAM permitiu a classificação em um ranking de acordo com desempenho médio dos caracteres produtivos avaliados (Quadros 2, 3, 4.)

Quadro 2 - Desempenho produtivo<sup>1</sup> em híbridos simples de *Bombyx mori*

Combinação híbrida		PC30	PCS30	PC	CC	TS
Mãe de origem Japonesa						
1.	M12- 2 x J1	38,43	9,22	1,28	29,02	18,65
2.	M12-2 x C25	34,30	7,10	1,14	27,33	15,74
3.	M12-2 x M12-2	37,33	8,13	1,42	28,21	16,55
4.	M12-2 x M11-2	35,39	7,49	1,17	28,19	16,14
5.	J1 x C25	36,26	7,72	1,21	29,33	16,17
6.	J1 x M12-2	43,01	7,81	1,36	27,26	13,76
7.	J1 x M11-2	34,19	8,40	1,14	30,03	18,85
8.	J1 x M11-A	32,25	6,12	1,08	27,98	14,44
9.	J1 x B106	38,90	7,06	1,30	28,93	13,77
10.	M11-2 x J1	35,32	7,09	1,17	29,06	15,24
11.	M11-2 x C25	36,72	8,42	1,22	29,03	17,44
12.	M11-2 x M12-2	35,94	7,51	1,20	29,11	15,90
13.	M11-2 x M11-2	36,59	9,53	1,22	29,08	19,78
14.	M11-2 x B106	36,86	7,96	1,23	28,94	16,39
15.	M11-A x M11-2	35,92	7,61	1,20	28,78	16,11
16.	M11-A x M11-A	32,57	8,36	1,08	29,44	19,54
17.	M11-A x C24	37,24	7,59	1,24	28,85	15,47
Mãe de origem Chinesa						
18.	:24 x J1	29,89	7,01	0,99	28,05	17,94
19.	:24 x C25	33,71	8,35	1,12	27,99	19,07
20.	:24 x M12-2	24,13	7,05	0,80	26,75	22,23
21.	:24 x M11-2	29,32	8,14	0,98	30,05	21,14
22.	:24 x B106	36,47	6,53	1,22	27,85	13,60
23.	:24 x C24	31,31	6,11	1,04	27,67	14,83
24.	:25 x J1	31,31	7,20	1,19	28,85	17,48
25.	:25 x C25	35,52	8,07	1,13	28,59	17,23
26.	:25 x M12-2	33,86	7,60	1,14	28,53	17,10
27.	:25 x B106	33,95	8,02	1,13	27,93	17,95
28.	:25 x M11-A	35,03	8,43	1,14	28,18	18,27
29.	:25 x C24	36,01	8,01	1,17	27,75	16,92
Mãe de origem Indiana						
30.	B106 x J1	33,78	7,17	1,13	27,95	16,14
31.	B106 x M12-2	32,65	7,14	1,22	28,93	16,62
32.	B106 x M11-2	35,98	7,88	1,17	29,46	16,75
33.	B106 x B106	34,72	6,21	1,16	28,55	13,64
34.	B106 x M11-A	31,72	7,19	1,06	28,18	17,23
	Média Geral	34,61	7,63	1,16	28,52	16,88
	Desvio-Padrão	3,61	1,09	0,13	0,9	2,77
	CV (%)	5,58	12,08	7,81	2,05	13,57

<sup>1</sup>(PC30) massa de 30 casulos, em gramas; (PCS30) peso de 30 cascas séricas, em gramas; (PC), peso unitário do casulo, em gramas; (CC), comprimento do casulo, em centímetros; (TS), teor de seda líquido, em porcentagem.

Quadro 3 - Médias de características com importância econômica em híbridos de bicho-da-seda (*Bombyx mori*) e seus respectivos valores médios de Índice de Avaliação Múltipla (Média-IAM)

Híbrido	PC30	PCS30	PC	CC	TS	Média-IAM
M12- 2 x J1	38,43	9,22	1,28	29,02	18,65	59,07
M12-2 x C25	34,30	7,10	1,14	27,33	15,74	45,08
M12-2 x M12-2	37,33	8,13	1,42	28,21	16,55	55,50
M12-2 x M11-2	35,39	7,49	1,17	28,19	16,14	49,06
J1 x C25	36,26	7,72	1,21	29,33	16,17	53,14
J1 x M12-2	43,01	7,81	1,36	27,26	13,76	53,01
J1 x M11-2	34,19	8,40	1,14	30,03	18,85	55,65
J1 x M11-A	32,25	6,12	1,08	27,98	14,44	49,06
J1 x B106	38,90	7,06	1,30	28,93	13,77	41,73
M11-2 x J1	35,32	7,09	1,17	29,06	15,24	52,15
M11-2 x C25	36,72	8,42	1,22	29,03	17,44	49,57
M11-2 x M12-2	35,94	7,51	1,20	29,11	15,90	55,08
M11-2 x M11-2	36,59	9,53	1,22	29,08	19,78	51,74
M11-2 x B106	36,86	7,96	1,23	28,94	16,39	58,84
M11-A x M11-2	35,92	7,61	1,20	28,78	16,11	53,51
M11-A x M11-A	32,57	8,36	1,08	29,44	19,54	51,33
M11-A x C24	37,24	7,59	1,24	28,85	15,47	52,94
C24 x J1	29,89	7,01	0,99	28,05	17,94	52,33
C24 x C25	33,71	8,35	1,12	27,99	19,07	43,35
C24 x M12-2	24,13	7,05	0,80	26,75	22,23	50,61
C24 x M11-2	29,32	8,14	0,98	30,05	21,14	37,52
C24 x B106	36,47	6,53	1,22	27,85	13,60	51,71
C24 x C24	31,31	6,11	1,04	27,67	14,83	46,08
C25 x J1	31,31	7,20	1,19	28,85	17,48	40,17
C25 x C25	35,52	8,07	1,13	28,59	17,23	49,01
C25 x M12-2	33,86	7,60	1,14	28,53	17,10	51,26
C25 x B106	33,95	8,02	1,13	27,93	17,95	49,40
C25 x M11-A	35,03	8,43	1,14	28,18	18,27	49,35
C25 x C24	36,01	8,01	1,17	27,75	16,92	51,64
B106 x J1	33,78	7,17	1,13	27,95	16,14	49,94
B106 x M12-2	32,65	7,14	1,22	28,93	16,62	46,43
B106 x M11-2	35,98	7,88	1,17	29,46	16,75	49,66
B106 x B106	34,72	6,21	1,16	28,55	13,64	53,37
B106 x M11-A	31,72	7,19	1,06	28,18	17,23	45,18

(PC30) massa de 30 casulos, em gramas; (PCS30) peso de 30 cascas séricas, em gramas; (PC), peso unitário do casulo, em gramas; (CC), comprimento do casulo, em centímetros; (TS), teor de seda líquido, em porcentagem.



Além da avaliação quantitativa, foi realizada, adicionalmente, a avaliação qualitativa, com casulos sendo classificados de acordo com a sua forma e presença ou não de constrição acentuada no centro do casulo. A classificação referente à análise descritiva do casulo é dada no Quadro 5. A grande maioria, 23 dos 34 híbridos, que corresponde a 67,64% do total, produziu casulos de formato alongado, que é o ideal para a fiação industrial.

Quadro 4 - Médias de características com importância econômica em híbridos de bicho-da-seda (*Bombyx mori*) e seus respectivos valores médios de Índice de Avaliação Múltipla (Média-IAM)

Rank	Combinação híbrida	Média-IAM
1º.	M12- 2 x J1	59,07
2º.	M11-2 x B106	58,84
3º.	J1 x M11-2	55,65
4º.	M12-2 x M12-2	55,50
5º.	M11-2 x M12-2	55,08
6º.	M11-A x M11-2	53,51
7º.	B106 x B106	53,37
8º.	J1 x C25	53,14
9º.	J1 x M12-2	53,01
10º.	M11-A x C24	52,94
11º.	C24 x J1	52,33
12º.	M11-2 x J1	52,15
13º.	M11-2 x M11-2	51,74
14º.	C24 x B106	51,71
15º.	C25 x C24	51,64
16º.	M11-A x M11-A	51,33
17º.	C25 x M12-2	51,26
18º.	C24 x M12-2	50,61
19º.	B106 x J1	49,94
20º.	B106 x M11-2	49,66
21º.	M11-2 x C25	49,57
22º.	C25 x B106	49,40
23º.	C25 x M11-A	49,35
24º.	M12-2 x M11-2	49,06
25º.	J1 x M11-A	49,06
26º.	C25 x C25	49,01
27º.	B106 x M12-2	46,43
28º.	C24 x C24	46,08
29º.	B106 x M11-A	45,18
30º.	M12-2 x C25	45,08
31º.	C24 x C25	43,35
32º.	J1 x B106	41,73
33º.	C25 x J1	40,17
34º.	C24 x M11-2	37,52

Diversos trabalhos classificam suas raças parentais e híbridas de acordo com o formato do casulo, Rao et al. (2006) realizaram a avaliação produtiva de dez raças consideradas *peanut* e vinte e uma ovais. Zanatta et al., (2009) descreveram dezesseis raças do Banco de Germoplasma de *B. Mori* da UEM, dentre estas, M12-2, M11-A e J1, que serviram como parentais para os híbridos avaliados neste trabalho. As três raças foram descritas como produtoras de casulos *Peanut*, que são alongados e acinturados.

Quadro 5 - Formato médio dos casulos de híbridos simples de *Bombyx mori*

ID	Combinação híbrida	Formato médio do casulo
1.	M12- 2 x J1	Alongado
2.	M12-2 x C25	Alongado
3.	M12-2 x M12-2	Alongado
4.	M12-2 x M11-2	Alongado
5.	J1 x C25	Alongado
6.	J1 x M12-2	Pouco acinturado (slight peanut)
7.	J1 x M11-2	Alongado
8.	J1 x M11-A	Alongado
9.	J1 x B106	Alongado
10.	M11-2 x J1	Alongado
11.	M11-2 x C25	Alongado
12.	M11-2 x M12-2	Alongado
13.	M11-2 x M11-2	Alongado
14.	M11-2 x B106	Alongado
15.	M11-A x M11-2	Pouco acinturado (slight peanut)
16.	M11-A x M11-A	Alongado
17.	M11-A x C24	Alongado
18.	C24 x J1	Alongado
19.	C24 x C25	Alongado
20.	C24 x M12-2	Pouco acinturado (slight peanut)
21.	C24 x M11-2	Alongado
22.	C24 x B106	Pouco acinturado (slight peanut)
23.	C24 x C24	Alongado
24.	C25 x J1	Alongado
25.	C25 x C25	Alongado
26.	C25 x M12-2	Pouco ovalado (short oval)
27.	C25 x B106	Ovalado (oval)
28.	C25 x M11-A	Alongado
29.	C25 x C24	Ovalado (oval)
30.	B106 x J1	Pouco acinturado (slight peanut)
31.	B106 x M12-2	Pouco acinturado (slight peanut)
32.	B106 x M11-2	Alongado
33.	B106 x B106	Pouco acinturado (slight peanut)
34.	B106 x M11-A	Pouco acinturado (slight peanut)

As características externas do casulo, relacionadas à sua forma, estão normalmente ligadas à origem das linhagens do bicho-da-seda. As linhagens japonesas possuem forma alongada; já as chinesas produzem casulos esféricos ou ovais.

A maioria dos híbridos de bicho-da-seda tem casulos alongados e sem constrição (Bojan Cristina et al., 2007).

A maioria das características de importância comercial em bicho-da-seda é quantitativa está sob controle poligênico, ou seja, sofrem influência ambiental (Rao et al., 2006).

A efetiva seleção do germoplasma de parentais possui um papel importante no melhoramento de novos híbridos. Diversos trabalhos relatam o uso de híbridos simples no melhoramento do bicho-da-seda, seja por métodos de avaliação de características individuais (Porto e Okamoto, 2003; Mirhosieni et al, 2004) ou por características conjuntas (Mano et al., 1993; Rao et al., 2006; Ramesha et al., 2009).

A escolha adequada dos pais desempenha um papel fundamental na realização dos objetivos do programa de melhoramento de bicho-da-seda. Zhao et al. (2007) enfatiza que nada impede que raças de mesma origem geográfica sejam cruzadas e usadas como variedades. O problema, no entanto, está na limitação da exploração da diversidade genética minimizando assim a heterose da  $F_1$ , que freqüentemente é maior quando realizado o cruzamento entre raças de origem geográficas diferentes.

#### 4. CONCLUSÕES

O método não-paramétrico de avaliação múltipla permitiu a construção de um ranking em que os genótipos de bicho-da-seda estudados foram ordenados de acordo com o seu desempenho analisado, levando-se em conta as cinco características.

O híbrido M12-2 x J1 destacou-se na avaliação múltipla em primeiro lugar no ranking, demonstrando que o conjunto das variáveis produtivas analisadas teve neste germoplasma seu maior valor. A avaliação qualitativa classificou-o como casulo próprio para fiação industrial devido seu formato alongado.

Embora o método de avaliação múltipla seja útil e possa ser empregado na avaliação de genótipos superiores de *B. mori*, este não deve substituir os métodos paramétricos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOJAN CRISTINA, L. AI.; MĂRGHITAS, D.; DEZMIREAN, ORSOLYA, T.; ADELA M. Qualitative Characters Study For Silkworm Hybrids. **Bulletin USAMV-CN**, 63 – 64, 2007.

CALLEGARI-JACQUES, Sidia M. **Bioestatística**: princípios e aplicações. Porto Alegre: Artmed, 2003. 255p.

MANO, Y.; NIRMAL KUMAR, S.; BASAVARAJA, H.K.; MAL REDDY, N.; DATTA, R.K. A new method to select promising silkworm breeds/combinations. **Indian Silk**, 31:53-53, 1993.

MIRHOSIENI, S.Z.; SEIDAVI, A.R.; GHANIPOOOR, M.; ETEBARI, K. Estimation of general and specific combining ability and heterosis in new varieties of silkworm, *Bombyx mori* L. **Journal of Biological Sciences**, 4:725-730, 2004.

NGUKU, E.K.; ADOLKAR, V.V.; MBURUGU, K.G.; MUGENDA, O.M. Evaluation of raw silk produced by bivoltine silkworm *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) races in Kenya. **Journal of Textile and Apparel, Technology and Management**, 5:1-9, 2007.

PORTO, A.J.; F, OKAMOTO. Desempenho produtivo de quatro raças do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) e seus cruzamentos. **Boletim da Indústria Animal**, 60:179-184, 2003.

RAMESHA, C.; SESHAGIRI, S.V.; RAO, C.G.P. Evaluation and Identification of superior polyvoltine crossbreeds of mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. **Journal of Entomology**, 6:179-188, 2009.

RAO, C.G.; SESHAGI, S.V.; RAMESH, C.; IBRAHIM, B.K.; NAGARAJU, H.; CHANDRASHEKARAIHAH. Evaluation of genetic potential of the polyvoltine silkworm (*Bombyx mori* L.) germplasm and identification of parents for breeding programme. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)**, 7:215-220, 2006.

RAYAR, S.G. Use of evaluation index for selecting potential parents for silkworm breeding. **Karnataka Journal of Agricultural Science**, 20:420-421, 2007.

ZANATTA, D.; BRAVO, J.P.; BARBOSA, J.F.; MUNHOZ, R.E.F.; FERNANDEZ, M.A. Evaluation of economically important traits from sixteen parental strains of the silkworm *Bombyx mori* L (Lepidoptera: Bombycidae). **Neotropical Entomology**, 38:327-331, 2009.

ZHAO, CHEN, K.; HE, S. Key principles for breeding spring-and-autumn using silkworm varieties: from our experience of breeding 873×874. **Caspian Journal of Environmental Sciences**, 5: 57-61, 2007.

## CAPÍTULO IV

### Caracterização genética de raças de *Bombyx mori* L. por meio de marcadores ISSR

#### RESUMO

O genótipo de dez raças de *Bombyx mori*, as quais são candidatas a constituírem o germoplasma elite do programa de melhoramento genético da UEM, foi analisado quanto a sua diversidade genética, por meio de marcadores ISSR. Foram testados 17 primers, dos quais foram selecionados nove que produziram 109 fragmentos de DNA, cujos tamanhos variaram de 200 pares de bases (pb) a 2000 pb com 100% de polimorfismo entre as populações. A raça M18 apresentou o menor polimorfismo. Por outro lado, as raças M11-2 e M8 apresentaram as maiores taxas de polimorfismo, superiores a 40%. Dois métodos de análise da diversidade genética foram usados: a distância genética de Nei e o Coeficiente de Jaccard para estimação da distância entre as populações de raças e a dissimilaridade entre e dentro das populações avaliadas. Diferentes grupos heteróticos poderão ser formados com base nos agrupamentos realizados. As raças B106, M12-2, M11-2 e J1 devem compor um grupo enquanto o outro é constituído pelas raças C24, C25, M18 e B82. A raça M19-2 deve ser considerada integrante de um terceiro grupo devido à discrepância nos agrupamentos com base na distância de Nei e Coeficiente de Jaccard.

## ABSTRACT

### ***Bombyx mori* L. genetic characterization by ISSR markers**

Ten *Bombyx mori* genotypes, candidates for germplasm elite in breeding program of Universidade Estadual de Maringá, were analyzed for their genetic diversity using ISSR markers. Seventeen primers were tested of which nine were selected that produced 109 fragments of DNA, whose sizes ranged from 200 base pairs (bp) to 2000 bp with 100% polymorphism among populations. The M18 strain had the lowest polymorphism; however M11 and M8-2 strains had the highest polymorphism rates, overcame 40%. Two methods of analysis of genetic diversity were used: Nei's genetic distance and the Jaccard's coefficient to estimate the distance between the populations of parental strains and dissimilarities between and within populations evaluated. Different heterotic groups can be formed on the basis of clustering analyzes. The japanese strains B106, M12-2 M11-2 and J1 should compose a group, and a second group is composed by the chinese strains C24, C25, B82 and M18. The M19-2 strain would be belong a third group due to their discrepancy in clusters based on distance Nei's Jaccard's coefficient.



## 1. INTRODUÇÃO

No melhoramento genético de *Bombyx mori* L., indivíduos mais divergentes geneticamente tendem a produzir melhores híbridos, os quais serão obtidos por meio de avaliações das capacidades combinatórias dos progenitores pré-selecionados, assim como a heterose manifestada por seus descendentes. A utilização de marcadores moleculares vem sendo discutida como ferramenta para a promoção de cruzamentos direcionados e associados a caracteres produtivos em programas de melhoramento de bicho-da-seda (Abe et al., 1998; Chatterjee e Pradeep, 2003). Estimando-se as distâncias genéticas com base nos alelos, por meio de técnicas que empregam marcadores moleculares, é possível estabelecer os melhores esquemas de cruzamentos para obtenção de híbridos com o desejado grau de heterozigose. O emprego de marcadores de DNA para a determinação das distâncias genéticas permite que cruzamentos entre pais contrastantes sejam conduzidos, com resultados mais precisos e redução de tempo em programas de melhoramento do bicho-da-seda.

O genoma de eucariotos é densamente intercalado por seqüências repetidas *in tandem* denominadas microssatélites ou SSR (Tautz et al., 1989). Estas seqüências são curtas, ocorrem em regiões dispersas ao longo do genoma e revelam um elevado grau de diversidade genética (Reddy et al., 1999). O uso de marcadores que empregam a amplificação das seqüências ancoradas por microssatélites (Inter-simple sequence repeat) apresenta-se como uma estratégia menos onerosa e laboriosa do que o emprego direto dos marcadores SSR (Zietkiewicz et al., 1994; Salimath et al., 1995).

Existe um grande número de raças de diferentes origens geográficas e que podem ser utilizadas como raças em programas de melhoramento genético de bicho-da-seda. Estas diferem entre si quanto a características morfológicas e produtivas, porém grande relevância deve ser dada à investigação genética destas para maximização das combinações alélicas na hibridação.

Diversos trabalhos usando marcadores ISSR em *Bombyx mori* já foram conduzidos, tanto para estudos de diversidade genética (Reddy et al., 1999; Pradeep et al., 2005; Li et al., 2007) quanto em associações com características específicas, tais como a produtividade (Chatterjee & Mohandas, 2003), biomassa

da lagarta e dos casulos (Pradeep et al., 2007) e resistência ao estresse térmico (Srivastava et al., 2007).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a diversidade genética de dez raças de bicho-da-seda, as quais são candidatas a germoplasma elite do programa de melhoramento genético da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material biológico e obtenção de DNA genômico

Foram criadas, no Laboratório de Organização Funcional da Universidade Estadual de Maringá, no ano de 2008, 10 raças de bicho-da-seda de diferentes origens geográficas (Quadro 1), submetidas ao mesmo manejo sanitário e alimentar, com folhas frescas de amoreira à vontade. As raças foram selecionadas com base no desempenho produtivo, sendo candidatas a germoplasmas elite do acervo genético de *B. mori* da UEM. Existe dúvida sobre a origem da matriz B106, mas há registro desta como de origem da Índia e do Japão.

Quadro 1 - Raças de bicho-da-seda (*Bombyx mori*) e sua origem geográfica do Banco de Germoplasma da UEM

Raça	Origem geográfica
B106	Índia/Japão
M11-2	Japão
J1	Japão
M19-2	Japão
M12-2	Japão
M8	Japão
M18	Japão
B82	Índia/Japão
C24	China
C25	China

Para extração de DNA, foram utilizadas 06 mariposas de cada raça. Estas foram maceradas, individualmente, em cadinho de porcelana gelado com nitrogênio líquido até a consistência de pó, que foi transferido para microtubos de 2mL com adição de 750uL de tampão de extração (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA pH 8,0; 1,5% Sarcosil; 10 mM NaCl). Procedeu-se centrifugação a 8,000rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido, cerca de 1mL, promovendo-se, assim, a retirada de fragmentos da mariposa que ainda permaneciam na solução.

O material recuperado foi então homogeneizado e incubado a 50°C, a 60 rpm durante 2 horas, para a realização da digestão dos constituintes celulares

com tampão contendo proteinase K (1,5% sarcosil, 50 mM EDTA pH 8, 10 mM NaCl, e 1 mg/ml de proteinase K).

O lisado foi purificado com igual volume de fenol:clorofórmio, conforme Sambrook e Russel (2001).

Para a precipitação do DNA, o volume do último sobrenadante foi mensurado 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 14.000 rpm, a 4°C e por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70%, desidratado à temperatura ambiente, ressuspenso em TE (10 mM de Tris-HCl pH 7,4 e 0,1mM de EDTA pH 8,0).

A digestão do RNA foi realizada com a adição de RNase (50 µg/ml) que foi incubado a 37°C, por 12 horas. Após esta incubação, o DNA foi visualizado em gel de agarose, 0,7% em TBE 1X (Sambrook & Russel, 2001), onde foi analisada a integridade da amostra.

O DNA foi purificado por extração com clorofórmio e fenol (pH, 8,0), na proporção de 1:1 e precipitado com 0,7 do volume de isopropanol gelado e 0,2 M de NaCl. O pellet foi obtido por centrifugação por 30 minutos a 14.000 rpm e dissolvido em tampão de eluição, TE (10 mM Tris-HCL pH 8,0, 1 mM EDTA, pH 8,0). A concentração de DNA foi determinada a 260 nm em espectrofotômetro.

## **2.2. Obtenção dos marcadores ISSR**

Foram desenhados inicialmente 17 primers ISSR relacionados à produtividade, biomassa e resistência ao estresse térmico, segundo relatos da literatura e listados no Quadro 2.

Diversos protocolos de amplificação foram testados para os diferentes *primers*. Para os primers ISSR-2, ISSR-3, ISSR-4, ISSR-6, ISSR-7, ISSR-8, ISSR-9, a amplificação por PCR foi executada em uma mistura de reação com volume final de 25 µl contendo 1x tampão de PCR (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glicerol, estabilizantes, da marca Invitrogen), 0,30 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dNTPs, 25 mM de primer, 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 60 ng de DNA genômico. A reação foi realizada em termociclador Mastercycler gradiente (Eppendorf). Nestes primers houve a necessidade da adição de proteínas estabilizantes em seu protocolo de amplificação, nestes casos, adicionou-se 0,75% de *BSA* (Albumina Sérica Bovina).

Quadro 2 - Primers ISSR e os respectivos trabalhos em que estes foram utilizados em bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.)

ISSR-	Fórmula	Sequência 5'- 3'	Autor
01	(CT) <sub>8</sub> T	CTCTCTCTCTCTCTTT	Pradeep et al. (2005); Sristava et al. (2007); Velu et al. (2008).
02	(CA) <sub>8</sub> G	CACACACACACACAG	Pradeep et al. (2005).
03	(GA) <sub>8</sub> AYC	GAGAGAGAGAGAGAAAYC	Pradeep et al.(2005); Velu et al. (2008).
04	(ATG) <sub>6</sub>	ATGATGATGATGATGATG	Pradeep et al. (2005).
05	(TG) <sub>8</sub> G	TGTGTGTGTGTGTGTGG	Chatterjee e Mohandas (2003); Pradeep e Urs (2007).
06	VDV(CT) <sub>7</sub>	VDVCTCTCTCTCTCTCT	Pradeep et al. (2005).
07	(GACA) <sub>4</sub>	GACAGACAGACAGACA	Pradeep et al. (2005); Velu et al.(2008).
08	(CT) <sub>8</sub> CRC	CTCTCTCTCTCTCTRC	Pradeep e Urs (2007); Sristava et al. (2007); Velu et al. (2008).
09	(CA) <sub>8</sub> RG	CACACACACACACARG	Chatterjee e Mohandas, (2003).
10	(GT) <sub>8</sub> TYG	GTGTGTGTGTGTGTGYG	Chatterjee e Mohandas (2003).
11	(AC) <sub>4</sub> A(AC) <sub>4</sub> YG	ACACACACAACACACACYG	Chatterjee e Mohandas (2003).
12	(ACC) <sub>6</sub>	ACCACCACCACCACCACC	Chatterjee e Mohandas (2003); Velu et al. (2008).
13	(AGC) <sub>6</sub>	AGCAGCAGCAGCAGCAGC	Pradeep e Urs (2007); Chatterjee e Mohandas (2003).
14	GGG(GGGGT) <sub>2</sub> TG	GGGTGGGGTGGGGTG	Chatterjee e Mohandas (2003)
15	(AG) <sub>8</sub> C	AGAGAGAGAGAGAGAGC	Pradeep e Urs (2007); Sristava et al. (2007); Velu et al. (2008).
16	(GA) <sub>8</sub> T	GAGAGAGAGAGAGAGAT	Chatterjee e Mohandas (2003).
17	(CA) <sub>6</sub> AC	CACACACACAAC	Li et al. (2007).

Nos primers ISSR-11, ISSR-14 e ISSR-15, o volume final do mix de amplificação foi de 15 µl e a reação não recebeu adição de BSA.

As condições de ensaio de amplificação seguiram o descrito por Chatterjee e Mohandas (2003) descritos no Quadro 3, com temperatura de anelamento de 50°C e extensão final de 10 minutos.

Os produtos obtidos dos PCRs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, por 2 horas, a 100 V, com tampão TBE 0,5X (Sambrook e Russel, 2001).

Todos os géis foram fotografados e em seguida compilados para análise do polimorfismo.

Quadro 3 - Reação de amplificação para os primers ISSR

Fase do PCR	Temperatura/tempo	ciclos
Temperatura Inicial-Denaturação do DNA	94°C / 2 min,	35
Denaturação	94°C / 30 sec,	
Temperatura de Anelamento	50°C / 30 sec,	
Extensão ou Amplificação do DNA	72°C / 1 min,	
Extensão Final	72°C /10 min,	

### 2.3. Análise dos marcadores ISSR

Foi construída uma matriz com os dados binários de presença e ausência de bandas de tamanhos moleculares idênticos (mesmo fragmento), com identificações de cada indivíduo. Esta matriz de similaridade, codificando "1" como a presença da banda no gel e "0" como sua ausência, será utilizada para gerar distâncias genéticas entre todos os possíveis pares de indivíduos. Cada banda foi considerada como um loco.

A variabilidade genética foi estimada entre o maior número de primers possível, utilizando diferentes métodos. A distância genética não-tendenciosa de Nei (1978) foi estabelecida entre as raças, utilizando o programa estatístico PopGene 1,32 (Yeh et al., 1997), considerando os parâmetros para dados diplóides com marcadores dominantes. O coeficiente de Jaccard também foi determinado entre e dentro das populações de raças de bicho-da-seda, com os softwares Programa FreeTree (Pavlicek et al., 1999) e o Mega 4 (Kumar et al., 2008).

Com o objetivo de representar graficamente o padrão de divergência genética, foi construído um dendrograma tanto considerando a distância genética, baseado em Nei (1978), quanto pela dissimilaridade fornecida pelo coeficiente de Jaccard, em ambos os casos utilizando o algoritmo de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using na Arithmetic Average).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 17 primers testados, apenas 11 amplificaram: ISSR-2, ISSR-3, ISSR-4, ISSR-6, ISSR-7, ISSR-8, ISSR-9, ISSR-11, ISSR-14, ISSR-15 e ISSR-16. Os primers ISSR-9 e ISSR-16 não foram considerados na análise, pois apresentaram bandas pouco robustas e dados com baixa reprodutibilidade. Os demais primers não amplificaram nenhuma banda. Dentre os nove primers selecionados, quatro são dinucleotídeos (ISSR-02, ISSR-03, ISSR-06, ISSR-08); um é trinucleotídeo (ISSR-04); um é tetranucleotídeo (ISSR-07); um é pentanucleotídeo (ISSR-14) e um é bi di-nucleotídeo, pois é composto de duas seqüências repetições de dinucleotídeos (Quadro 4). Todos estes apresentaram bandas consistentes em todas as raças analisadas.

Foram produzidos 109 fragmentos de DNA por amplificação com os nove primers ISSR, cujos tamanhos variaram de 200 pb a 2000 pb (Quadro 4). Quando comparadas as raças, ou seja, entre as populações, 100% das bandas foram polimórficas. No entanto, analisando-se dentro da população, verificou-se que houve variação no número de bandas mono e polimórficas de acordo com a raça (Quadro 5). O primer ISSR-06 foi o que apresentou o maior número de bandas amplificadas, 17 no total (Quadro 4 e Figura 1).

Quadro 4 - Primers ISSR selecionados para a comparação de raças de bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) quanto ao número de locos detectados, número de locos polimórficos e tamanho em pares de bases dos fragmentos amplificados

Primers	Seqüência de nucleotídeos (5' → 3')	Número de locos detectados	Tamanho dos fragmentos (pb)
ISSR-02	(CA) <sub>8</sub> G	13	300 – 2000
ISSR-03	(GA) <sub>8</sub> AYC	12	200 – 1950
ISSR-04	(ATG) <sub>6</sub>	16	300 – 1500
ISSR-06	VDV(CT) <sub>7</sub>	17	200 – 2000
ISSR-07	(GACA) <sub>4</sub>	10	330 – 1320
ISSR-08	(CT) <sub>8</sub> RC	08	400 – 1550
ISSR-11	(AC) <sub>4</sub> A(AC) <sub>4</sub> YG	15	220 – 1600
ISSR-14	GGG(GGGGT) <sub>2</sub> TG	09	300 – 2000
ISSR-15	(AG) <sub>8</sub> C	10	310 – 1700

Diversos trabalhos que reportam o uso de marcadores ISSR em *Bombyx mori* testaram um número elevado de primers e selecionaram apenas parte destes para a análise genética. Reddy et al. (1999), iniciaram as amplificações com 07 primers, mas procederam às análises com apenas 04 primers. Chatterjee e Mohandas (2003) testaram 20 primers inicialmente e selecionaram apenas 12. Li et al. (2007) pre-selecionaram 19 primers ISSR, porém somente 12 amplificaram bandas robustas e consistentes e foram escolhidos para dar continuidade ao trabalho. Como dito anteriormente, o presente trabalho teve início com 17 primers que após serem testados e previamente avaliados prosseguiu com 09 destes primers para a realização das amplificações, estando de acordo com a literatura.

Os marcadores ISSR amplificam seqüências de maneira descontínua no genoma e podem assim fornecer subsídios que tornem possível a mensuração das diferenças genéticas entre os indivíduos analisados. A ausência de uma banda é interpretada como uma divergência e pode ser causada pela perda de um locus devido a uma deleção da seqüência SSR que o primer se anelaria ou devido ao rearranjo cromossômico (Wolfe e Liston, 1998). Isso explica o baixo grau de polimorfismo dentro das populações de raças, abaixo dos 45% onde se esperava realmente baixa diversidade genética devido aos freqüentes cruzamentos consangüíneos e a elevada taxa de polimorfismo entre as raças de diferentes origens geográficas.

Quadro 5 - Número de bandas polimórficas e taxa de polimorfismo produzido por nove primers ISSR em dez raças de *Bombyx mori* pertencentes ao Banco de Germoplasma da UEM

Matrizes (população)	Número de bandas polimórficas	Taxa de polimorfismo (%)
B106	33	30,28
M11-2	45	41,28
J1	43	39,45
M19-2	37	33,94
M12-2	40	36,70
M8	48	44,04
M18	16	14,68
B82	30	27,52
C24	31	28,44
C25	24	22,02



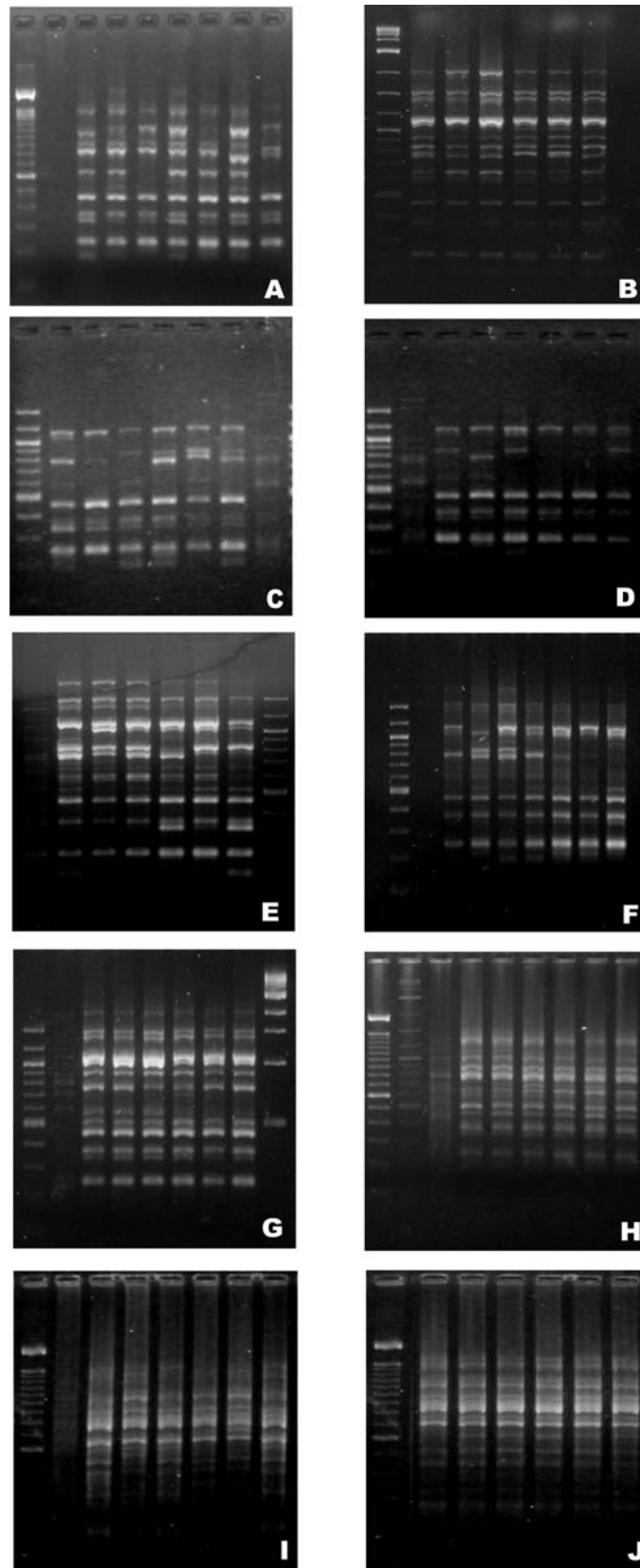


Figura 1 - Polimorfismo gerado pelo primer ISSR-6 entre indivíduos e entre diferentes raças de *Bombyx mori*. Os géis de agarose a 1,5% representam o padrão de bandas geradas pelas respectivas matrizes: **A-** B106, **B-** M11-2, **C-** J1, **D-** M-19-2, **E-** M12-2, **F-** M8, **G-** M18 e **H-** B82, **I-** C24, **J-** C25.

Quanto maior a variabilidade genética do germoplasma, ou seja, entre as raças utilizadas no programa de melhoramento, maiores serão os resultados obtidos pelo melhoramento genético. Esta diversidade pode ser explorada visando maximizar as combinações alélicas benéficas (Borém, 1997). Por outro lado, é desejável a uniformidade genética dentro da população e neste quesito a população avaliada da raça M18 mostrou a mais uniforme ou com menor polimorfismo. As raças M11-2 e M8 apresentaram taxas de polimorfismo superiores a 40% e devem passar por um número maior de gerações de endocruzamentos visando aumentar a taxa de homozigose (Quadro 5), que refletirá num polimorfismo menor e conseqüente maior uniformidade genética.

A distância genética de Nei (1978), calculada para inferir a divergência genética entre as populações de raças de *B. mori* apresentou variações quanto à identidade e distâncias genéticas, sendo que o menor valor foi de 0,2360 e o maior valor foi de 0,6196, respectivamente, entre as raças B106 e M12-2 e entre B82 e J1. Os valores de distância genética de Nei foram empregados para a construção do dendrograma com o método UPGMA (Figura 2).

Dois grandes grupos se destacam no dendrograma, agrupamentos 7 e 8 (Figura 2). A raça B106 não tem sua origem conhecida, podendo ser tanto indiana quanto japonesa, sendo que a análise realizada indicou uma proximidade genética com a matriz M12-2, do grupo 8, onde foram agrupadas as de origem japonesa. Em contrapartida, outras matrizes de origem japonesa, a M18, e a B82, cuja dúvida sobre sua origem também existe, são mais próximas às chinesas do que as demais. As matrizes de origem chinesa C24 e C25 são intimamente relacionadas.

Os resultados indicam que os melhores híbridos provavelmente serão obtidos pelos cruzamentos conduzidos entre as matrizes B106, M12-2 e M11-2 com matrizes de origem chinesa C24 e C25 devido à maior distância genética entre elas.

Nos estudos de diversidade genética entre e dentro de populações é de fundamental importância a escolha do método de avaliação. Nestes estudos, matrizes de dados binários para comparações entre os indivíduos são construídas com o intuito de investigar a similaridade e dissimilaridade entre as populações (Quadro 6) e entre os indivíduos dentro da população, A escolha do adequado coeficiente de similaridade é um ponto muito importante e decisivo para avaliar os

agrupamentos e assim a verdadeira semelhança ou diversidade genética existentes (Dalirsefat et al., 2009).

Quadro 6 - Comparação das distâncias genética de Nei (1978) entre 10 raças de *Bombyx mori* L. pertencentes ao Banco de Germoplasma UEM, usando como a identidade (diagonal superior) e as distâncias genéticas (diagonal inferior)

Raças	B106	M11-2	J1	M19-2	M12-2	M8	M18	B82	C24	C25
B106	****	0,7255	0,6632	0,5910	0,7898	0,6025	0,6010	0,6456	0,6510	0,6790
M11-2	0,3209	****	0,6234	0,6263	0,7889	0,6966	0,6096	0,6800	0,6599	0,6040
J1	0,4106	0,4726	****	0,7139	0,7003	0,6209	0,6060	0,5381	0,6372	0,6109
M19-2	0,5260	0,4679	0,3370	****	0,5947	0,6914	0,5624	0,5583	0,6511	0,6780
M12-2	0,2360	0,2371	0,3563	0,5197	****	0,6778	0,5506	0,6202	0,6183	0,6336
M8	0,5066	0,3616	0,4765	0,3690	0,3889	****	0,5549	0,6339	0,6843	0,5799
M18	0,5092	0,4949	0,5008	0,5756	0,5968	0,5890	****	0,6814	0,6605	0,5944
B82	0,4375	0,3857	0,6196	0,5829	0,4777	0,4559	0,3836	****	0,6474	0,6771
C24	0,4293	0,4156	0,4506	0,4291	0,4808	0,3793	0,4148	0,4348	****	0,6923
C25	0,3872	0,5042	0,4928	0,3885	0,4564	0,5449	0,5201	0,3900	0,3678	****

Os cálculos necessários para estimar as distâncias genéticas envolvem as freqüências alélicas das populações. Como os marcadores ISSR são dominantes, não é possível identificar os heterozigotos e nem saber se a população está em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Portanto, para calcular a distância genética entre populações com heterozigosidade, é necessário admitir que estejam em equilíbrio e estimar as freqüências gênicas a partir da freqüência dos genótipos recessivos (ausência de banda). Distâncias genéticas tendem a ser mais utilizadas quando da utilização de marcadores co-dominantes. Porém, o emprego desta metodologia não prejudica a análise dos resultados, quando utilizada a distância genética não-tendenciosa de Nei (1978). Para diferenciar geneticamente a linhagem de *B. mori* Nistari, Pradeep et al. (2005) empregaram marcadores dominantes do tipo RAPD e ISSR e analisaram por meio da distância genética de Nei. O mesmo método foi utilizado por Li e et al. (2007) para agrupar 42 linhagens de bicho-da-seda a partir de primers ISSR.

O coeficiente de Jaccard compara o número de presença de bandas comuns e o número total de bandas envolvidas, excluindo o número de ausências conjuntas. Não se trata da estimação de uma distância genética e sim de um índice de divergência genética, sendo considerado mais apropriado à análise de marcadores dominantes.

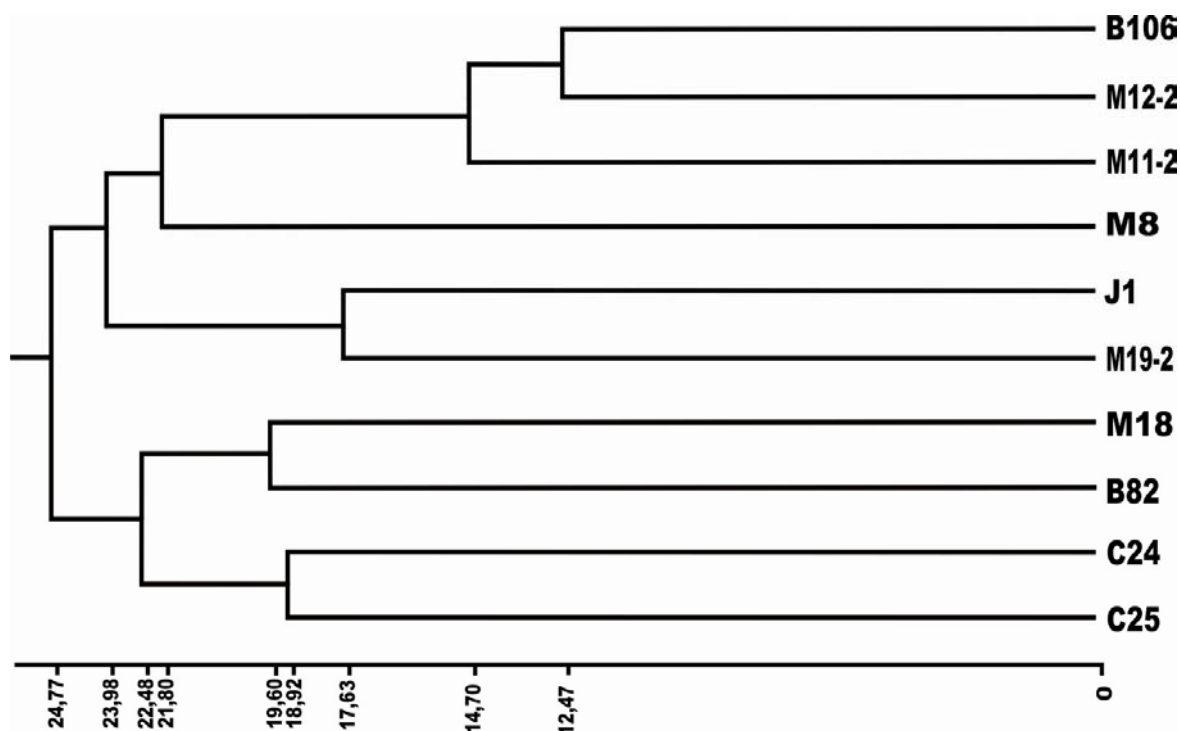


Figura 2 - Dendrograma baseado na distância não tendenciosa de Nei (1978) obtido pelo agrupamento de dez matrizes de bicho-da-seda pelo método UPGMA.

No presente trabalho, foram utilizadas duas metodologias de análise. O dendrograma decorrente do coeficiente de Jaccard é apresentado na Figura 3. Pode ser observada no dendrograma a dissimilaridade genética dentro e entre as populações de matrizes de *B. mori* que são candidatas a germoplasma elite do Banco de Germoplasma de *B. mori* da UEM. Houve diferença no agrupamento em relação ao dendrograma estimado com base na distância genética de Nei (Figura 2). A diferença mais relevante foi em relação ao agrupamento da matriz M8 (Figura 3). O coeficiente de Jaccard confirmou, mediante a estimação da dissimilaridade dentro das populações, que a população M18 é a menos dissimilar, conforme já havia sido evidenciado no Quadro 2. Da mesma forma, pode-se afirmar que a população da matriz M8 é a mais heterogênea. Possivelmente este seja o motivo da diferença significativa de agrupamentos pelos dois métodos de diversidade genética testados. É apropriado que esta população seja temporariamente excluída da composição de germoplasmas elite do Banco de Germoplasma da UEM, até que esteja com um número maior de *locus* em homozigose e conseqüentemente mais homogênea.

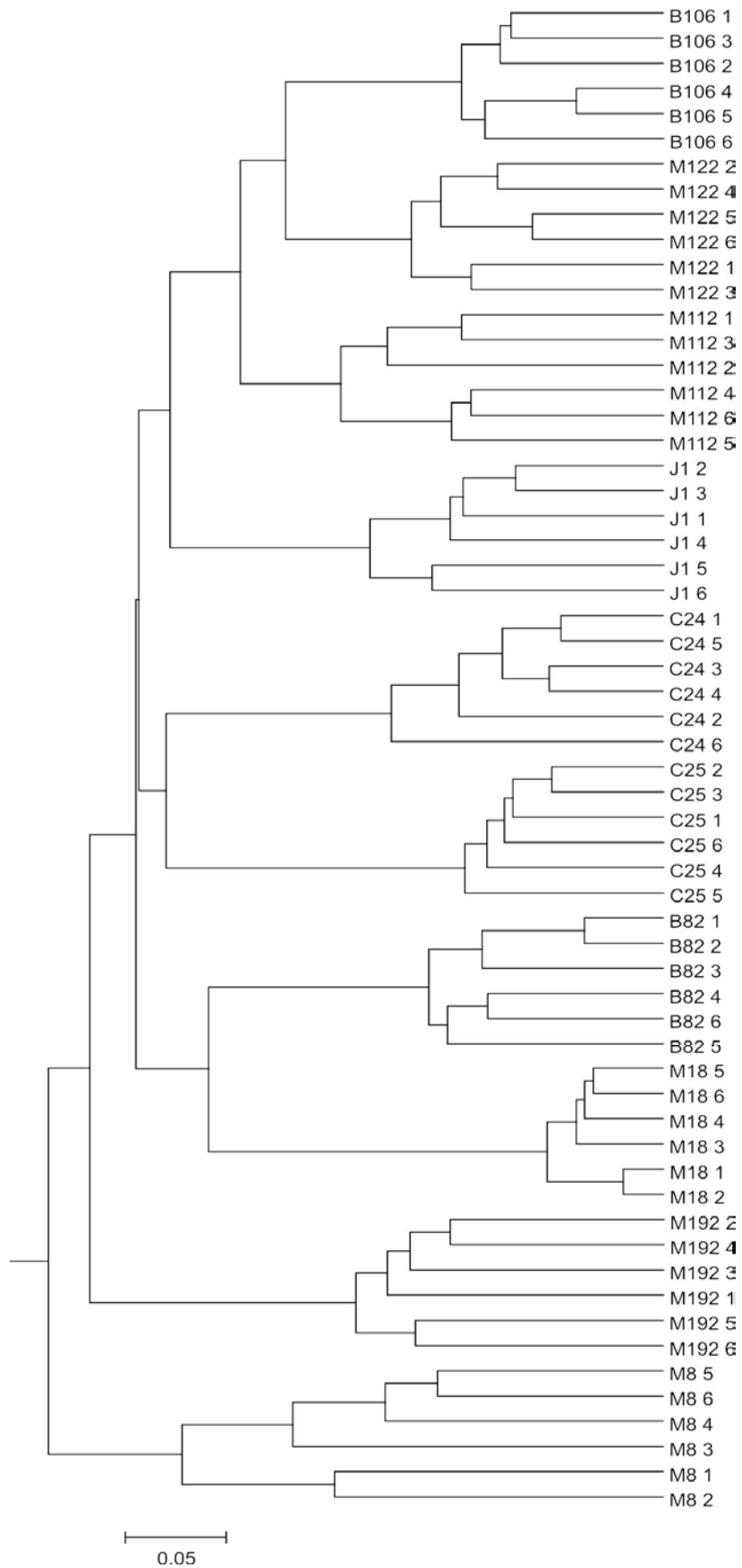


Figura 3 - Dendrograma baseado no coeficiente de Jaccard pelo agrupamento de 10 populações de matrizes de *Bombyx mori* pelo método UPMGA.

O estabelecimento de grupos heteróticos com esses germoplasmas considerados elite do acervo genético de *B. mori* da UEM por meio das distâncias genéticas é viável e seguro considerando as nove raças. Em um grupo ficariam as raças B106, M12-2, M11-2 e J1. Em outro grupo ficariam junto com as raças de origem chinesa C24 e C25 e as raças M18 e B82. A matriz M19-2 ficaria em um terceiro grupo, devido à discrepância nos dois agrupamentos. Por outro lado, a matriz M8 deve ser temporariamente excluída do grupo de germoplasmas elite.

Os cruzamentos deverão ser conduzidos de acordo com o tipo de híbrido desejável. Hibridações entre raças de mesma origem, mesmo que de grupos heteróticos diferentes, podem ser realizadas quando se deseja a obtenção de híbridos duplos como produto final. Por outro lado, quando o objetivo final é o híbrido simples de bicho-da-seda, deverá ser realizado o cruzamento entre raças de diferentes origens geográficas e também de diferentes grupos heteróticos, visando maximizar a heterose.

Os resultados são consistentes para se concluir a respeito da estrutura genética das matrizes avaliadas. Existe forte indicativo de que a distância entre as mesmas pode ser utilizada como componente do estabelecimento de grupos heteróticos para hibridação entre os germoplasmas elite do Banco de Germoplasma da UEM. A análise das distâncias genéticas entre as matrizes estudadas com marcadores ISSR forneceu subsídios para a condução de cruzamentos de maneira mais segura. Porém, para esta finalidade, os dados devem ser, em estudos posteriores, correlacionados com o desempenho fenotípico de híbridos simples,.

#### 4. CONCLUSÕES

Os marcadores ISSR mostraram-se eficientes na detecção do polimorfismo genético dentro e entre as populações de matrizes de bicho-da-seda.

A população da raça M8 precisa passar por mais gerações de cruzamentos consangüíneos, de modo que estes aumentem o número de locos em homozigose e esta se torne mais homogênea geneticamente. Apenas dessa forma, esta população poderá ser utilizada no programa de melhoramento.

Diferentes grupos heteróticos poderão ser formados com base nos agrupamentos realizados, As raças B106, M12-2, M11-2 e J1 devem compor um grupo, enquanto outro deve ser composto por C24, C25, M18 e B82. A raça M19-2 deve compor um terceiro grupo, sozinha, devido à discrepância nos dois agrupamentos.

Os dados fornecidos pelos marcadores ISSR garantiram subsídios para a condução de cruzamentos no Programa de Melhoramento Genético de *B. Mori* da UEM de forma mais segura. Estes deverão ser correlacionados, em estudos posteriores, com o desempenho produtivo de híbridos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, H.; HARADA, T.; KANEHARA, M.; SHIMAD, A.T.; OHBAYASHI, F.; OSHIKI, T. Genetic mapping of RAPD markers linked o the denonucleosis refractoriness gene, *nsd-1*, in the silkworm, *Bombyx mori*. **Genes & Genetic Systems**, 73:237–42, 1998.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV, 1997. NUMERO TOTAL DE PÁGINAS

CHATTERJEE, S.N.; PRADEEP, A.R. Molecular markers (RAPD) associated with growth, yield and origin of the silkworm, *Bombyx mori* L. **Genetika**, 39:1612-24, 2003.

CHATTERJEE, S.N.; MOHANDAS, T.P. Identification of ISSR markers associated with productivity traits in silkworm, *Bombyx mori* L. **Genome**, 46:438-447, 2003.

DALIRSEFAT, S.B.; MEYER, A.S.; MIRHOSEINI, S.Z. Comparison of similarity coefficients used for cluster analysis with amplified fragment length polymorphism markers in the silkworm, *Bombyx mori*, **Journal of Insect Science**, 9: 71-71, 2009.

KUMAR, S.; NEI, M.; TAMURA, K. MEGA: 2008, A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Briefings in Bioinformatics**, 9:299-306, 2008.

LI, M.; HOU, C.; MIAO, X.; XU, A.; HUANG, Y. Analyzing Genetic Relationships in *Bombyx mori* Using Intersimple Sequence Repeat Amplification. **Molecular Entomology**, 100:202-208, 2007.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, 89:583-590, 1978.

PAVLICEK, A.; HRDA, S.; FLEGR, J. Free Tree – freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. **Folia Biologica**, 45:97–99, 1999.



- PRADEEP, A.R.; JINGADE, A.H.; URS, R.S. Molecular markers for biomass traits: association, interaction and genetic divergence in silkworm *Bombyx mori*. **Biomarker Insights**, 2:197-217, 2007.
- PRADEEP, A.; CHATERGEE, S.; NAIR, C. Genetic differentiation induced by selection in an inbred population of the silkworm *Bombyx mori*, revealed by RAPD and ISSR marker systems. **Journal of Applied Genetics**, 46:291-298, 2005.
- REDDY, K.D.; NAGARAJU, J.; ABRAHAM, E.G. Genetic characterization of the silkworm *Bombyx mori* by simple sequence repeat (SSR)-anchored PCR. **Heredity**, 83:681-687, 1999.
- SALIMATH, S.S.; OLIVEIRA, A.C.; GODWIN, I.D.; BENNETZEN, J.L. Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers. **Genome**, 38:757-763, 1995.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001. 527p.
- SRIVASTAVA, P.P.; KAR, P.K.; AWASTHI, A.K.; URS, R.S. Identification and association of ISSR markers for thermal stress in polyvoltine silkworm *Bombyx mori*. **Russian Journal of Genetics**, 43:858–864, 2007.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, 17:6463-6471, 1989.
- WOLFE, A.D.; LISTON, A. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. *In*: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; DOYLE, J.J. (eds.). **Plant molecular systematics II**. Boston: Kluwer, 1998. p. 43-86.
- YEH, F.C.; YANG, R.C.; BOYLE, T.B.J. **POPGENE Version 1.31**, microsoft window-based free ware for population genetic analysis. University of Alberta and Centre for International Forestry Research, Alberta, Canada. Free program distributed by the authors at <http://www.ualberta.ca/~fyeh/index.htm>, 1999.
- ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSK, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, 20:176-183, 1994.

## 6. CONCLUSÕES GERAIS

As raças avaliadas foram caracterizadas, fornecendo subsídios para a manutenção adequada do Banco de Germoplasma da UEM, além de apresentarem desempenho produtivo satisfatório, podendo ser utilizadas em programas de melhoramento para a formação de híbridos.

Os caracteres avaliados apresentaram alta herdabilidade, demonstrando baixa variância do ambiente em relação à variância fenotípica, exceto na variável teor líquido de seda.

O estudo da correlação genética entre importantes características e biológicas e produtivas demonstrou que não é possível realizar a seleção indireta para o teor de seda, uma vez que não houve correlação entre esta característica com todas as demais.

A origem geográfica das raças consideradas como mães na hibridação influenciam grandemente a média das variáveis, tornando-se um diferencial produtivo.

O método não-paramétrico de Índice de Avaliação Múltipla pode ser utilizado como metodologia estatística auxiliar na avaliação de genótipos superiores.

A variabilidade genética foi satisfatoriamente avaliada pelos marcadores ISSR que tiveram êxito na detecção do polimorfismo genético, dentro e entre as populações de matrizes de bicho-da-seda.

Diferentes grupos heteróticos poderão ser formados com base nos agrupamentos realizados com base no polimorfismo genético. As raças B106, M12-2, M11-2 e J1 devem compor um grupo enquanto outro deve ser composto pelas raças C24, C25, M18 e B82.

A caracterização de todos os genótipos investigados por parâmetros de produtividade e marcadores ISSR forneceu subsídios para a condução promissora de cruzamentos no Programa de Melhoramento Genético de *B. Mori* da UEM, visando à obtenção do primeiro híbrido público do país, além do conhecimento do acervo genético do seu banco de germoplasma.