



# A UTILIZAÇÃO DA BIOTECNOLOGIA NA SERICICULTURA BRASILEIRA

Análise molecular do banco de germoplasma de *Bombyx mori* da COCAMAR – Cooperativa Agroindustrial

Fotografias e ilustrações cedidas pelos autores

## **Maria Aparecida Fernandez**

(044) 3261-4683 (044) 9972-7477  
aparecidafernandez@gmail.com  
mafernandez@uem.br

Depto de Biologia Celular e Genética Universidade Estadual de Maringá / PR

Doutora em Morfologia-Biologia Celular, Pós-doutora em Genética Molecular  
Docente do Departamento de Biologia Celular e Genética da Universidade Estadual de Maringá, Coordenadora do laboratório de Organização Funcional do Núcleo e do projeto em biodiversidade do bicho-da-seda FINEP/Fundação Araucária.

## **Ricardo Rodrigues Ciferri**

(044) 3261-4324 (044) 9968-4850  
rrciferri@uol.com.br rrc@din.uem.br

Depto de Informática Universidade Estadual de Maringá, Doutor em Ciência da Computação, Docente do Departamento de Informática da Universidade Estadual de Maringá, Coordenador do Projeto de Pesquisa Bioinf/BDB

## **Eliana Valéria Patussi**

(044) 3031-2587 (044) 3027-6360  
jncmitter@terra.com.br

Doutora em Biologia Celular e Molecular  
Docente do Centro Universitário de Maringá

## **Marcelo Farid Pereira**

(44) 3261 43 05 mfpereira@uem.br

Depto de Economia, Universidade Estadual de Maringá, Doutor em Engenharia de Produção, Docente do Depto de Economia da Universidade Estadual de Maringá.

## **Joice Felipes<sup>1</sup>**

(044) 3261 46 83 joicefelipes@gmail.com

Depto de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá, Mestre em Genética.

## **Juliana Pereira Bravo<sup>1</sup>**

(044) 3261 46 83 jupbravo@gmail.com

Depto de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá, Mestre em Genética.

## **Daniela Bertolini Zanatta<sup>2</sup>**

(044) 3261 46 83 danizanatta@gmail.com

## **Fabiana de Souza Gouveia<sup>2</sup>**

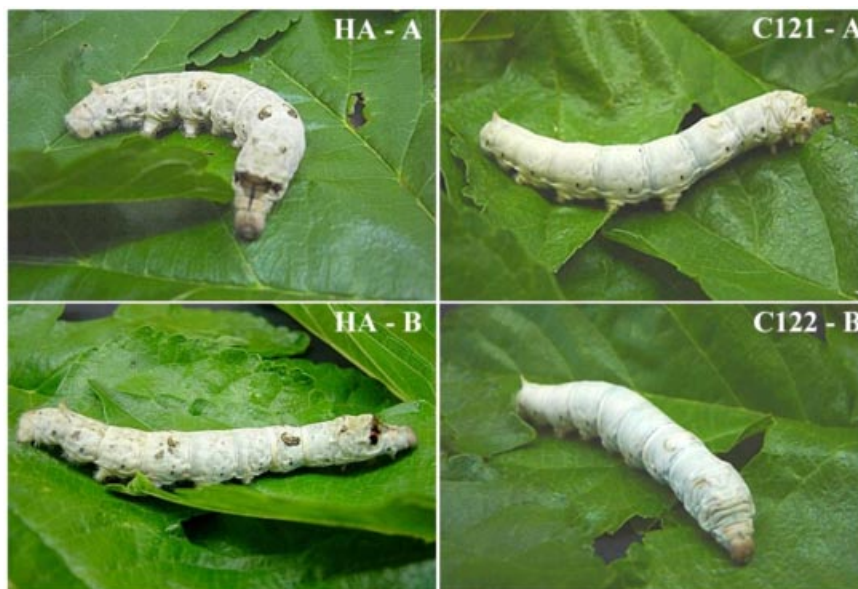
(044) 3261 46 83 fabi.gouveia@gmail.com

Depto de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá.

## **Valério Américo Balani**

(044) 3261 46 83 vabalani@gmail.com

Depto de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá, Mestrando (Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração Biologia Celular, PBC, UEM) do laboratório de Organização Funcional do Núcleo e participante do projeto em biodiversidade do bicho-da-seda FINEP/Fundação Araucária.

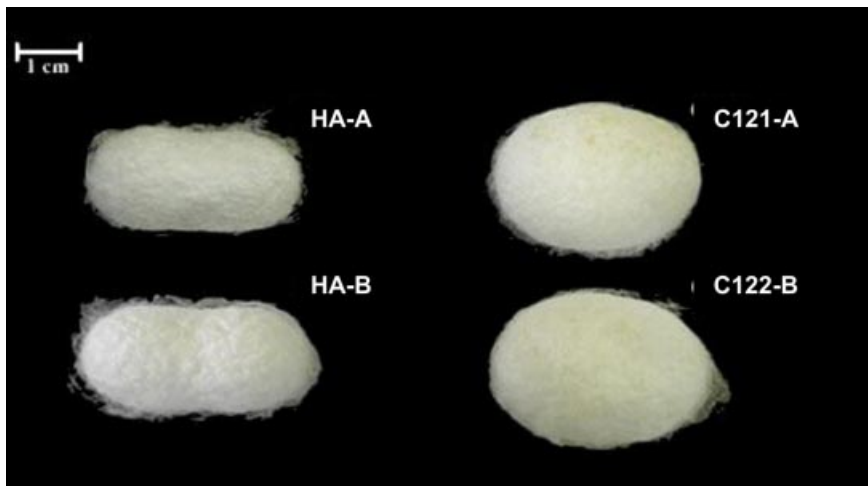


**Figura 1.** *Bombyx mori*. Lagartas de quinta idade de quatro raças do banco de germoplasma da COCAMAR. HA-A e HA-B são de origem japonesa; C121-A e C122-B são de origem chinesa

<sup>1</sup> - Doutoranda do laboratório (Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração Biologia Celular, PBC, UEM) do Laboratório de Organização Funcional do Núcleo, Participante do projeto em biodiversidade do bicho-da-seda FINEP/Fundação Araucária.

<sup>2</sup> - Mestranda (Programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento, PGM, UEM) do laboratório de Organização Funcional do Núcleo e participante do projeto em biodiversidade do bicho-da-seda FINEP/Fundação Araucária.

A sericicultura compreende a criação do bicho-da-seda, *Bombyx mori* L., visando a produção de casulos, do qual se extrai o fio de seda. Trata-se de uma atividade antiga, com início na China, por volta de 4600 anos atrás. A seda é uma fibra macia e leve, considerada adequada a todos os climas, pois é má condutora de calor e quando misturada com outros fios, produz tecidos mais resistentes. Os chineses sempre tiveram consciência da enorme importância econômica dessa atividade e ameaçavam, com penas severas, quem ousasse contrabandear o bicho-da-seda. Na literatura podemos encontrar diversos relatos e mitos do surgimento deste inseto na China e em outras regiões (veja quadro 1). Entretanto, foi necessário um tempo considerável para que a sericicultura fosse



**Figura 2.** Casulos de *Bombyx mori*. Casulos de quatro raças do banco de germoplasma da COCAMAR. HA-A e HA-B são de origem japonesa; C121-A e C122-B são de origem chinesa

difundida por toda Europa, o que ocorreu em 1740. No Brasil, essa atividade foi iniciada em 1848 e atualmente o estado do Paraná é o maior produtor nacional de casulos verdes.

A sericicultura tem sido um meio de subsistência econômica para muitos trabalhadores no campo e na cidade, e foi um grande fator de globalização durante aproximadamente 2.000 anos, a chamada “Era da Rota da Seda” (Kurin, 2002). A manipulação do *B. mori* para a produção comercial gerou uma dependência antrópica do bicho-da-seda para a sua sobrevivência e reprodução, tornando-o o único inseto verdadeiramente domesticado. Desde o início do século XIX, *B. mori* se tornou um organismo modelo na área biológica, envolvendo hoje três grandes eixos do conhecimento: pesquisa básica, sericicultura e biotecnologia. O bicho-da-seda, é referência para o estudo do genoma estrutural e funcional de lepidópteros no cenário científico internacional. No Brasil, esforços na obtenção de cultivares de amoreira mais produtivos e otimização no manejo da criação do *B. mori* tem sido o foco de pesquisadores do Instituto de Zootecnia de Gália no interior de São Paulo (Porto et al, 2003; 2004). No interior do Paraná, na Universidade Estadual de Maringá, está em desenvolvimento um projeto pioneiro de inovação tecnológica que visa a análise molecular do banco de germoplasma de *B. mori* da COCAMAR - Cooperativa Agroindustrial; apoiado pela FINEP e a Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do

Paraná. Nesse trabalho apresentamos alguns dos aspectos moleculares investigados neste projeto.

#### A cadeia produtiva da seda

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de fios de seda, com participação de 2,54% do mercado, atrás apenas da China que produz mais de 60%, e da Índia que detém mais de

12% do mercado mundial (Tessari, 1999). Historicamente o país é essencialmente exportador, e consome menos de 3% da sua produção de fios. A produção brasileira de fios de seda no ano de 2002 foi de 1.558 toneladas, das quais, segundo a ABRASSEDA (Associação Brasileira de Fiações de Seda), 1.404 toneladas ou equivalente a 90,13% da produção total, foram exportadas como fio de seda. O Japão é o principal destino destas exportações do fio de seda brasileiro e no ano de 2002 respondeu por 64,5% do total de fio de seda brasileiro exportado (Secex, 2003).

O estado do Paraná responde atualmente por 89% da produção brasileira, ou seja, 8,9 mil toneladas da produção total de casulos verdes, e 53% da industrialização, com destaque em três empresas de fiação de seda, a COCAMAR (Maringá), Kanebo Silk do Brasil (Cornélio Procópio) e Fiação de Seda BRATAC S/A (Londrina). Em segundo lugar está o Mato Grosso do Sul, com produção de 546 toneladas de casulos verdes. Neste estado o cultivo do bicho-da-seda desde a fase larval até o encasulamento, permitiu o aumento da renda para pequenos produtores rurais e, em média, esta ativi-

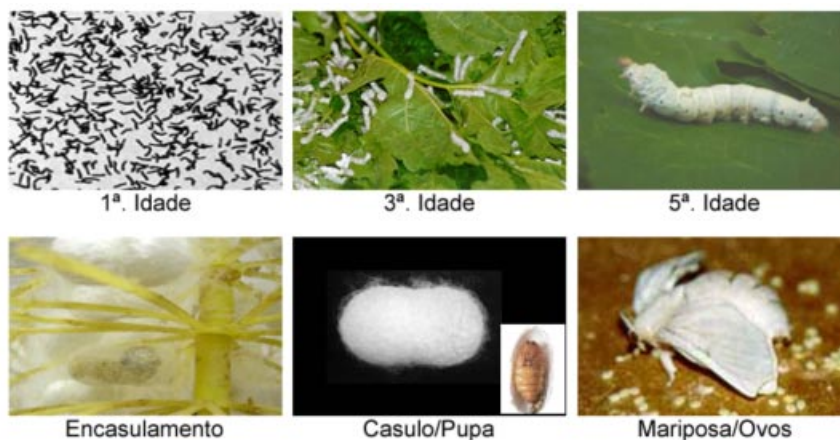
#### Quadro 1. A deusa da seda

Um dos relatos correntes descreve que o segredo da produção da seda era guardado pela China, mas que no ano 140 a.C. o rei do Tibet casou-se com uma princesa chinesa que levou escondidos, no manto, ovos de bichos-da-seda e sementes de amoreira. Existem também relatos de que em 555 d.C. dois monges levaram alguns casulos para Constantinopla e, então a criação da lagarta se espalhou pelo mundo inteiro. Entretanto, o aparecimento do bicho-da-seda e de sua especial particularidade de produzir, em sua glândula sericígena, o fio de seda, foi descrita de modo muito especial através do mito da deusa da seda (<http://sinologia.vilabol.uol.com.br/mito/mito012m.htm>) “...em meio à alegria reinante, surgiu uma deusa envolta em uma pele de cavalo, vinda do céu. Trazia consigo dois rolos de seda, um de cor amarela mais belo que o ouro, e outro tão branco e brilhante como prata. Esta jovem tornou-se a deusa do bicho-da-seda. A pele de cavalo que a revestia, já aderira a ela inseparavelmente. A metamorfose da deusa em bicho-da-seda dá-se sempre que ela une as extremidades da pele. Assim, quando está com a pele aberta, é deusa e quando fechada, é o bicho-da-seda. Quando sua face surge, é bela. Quando encerrada dentro da pele e arqueia o corpo, assemelha-se a um cavalo. Nesse estado, a seda sai magicamente de sua boca”.

dade garante uma renda de R\$1.500,00 a cada vinte e cinco dias ([www.apta-regional.sp.gov.br/artigo.php?id\\_artigo=3-29k](http://www.apta-regional.sp.gov.br/artigo.php?id_artigo=3-29k) – acesso em 28 mar. 2005). Atualmente, o estado de São Paulo detém apenas 4,9% do total da produção brasileira, com 489 toneladas, principalmente da região de Bastos e Gália. Em 2002, existiam no Brasil 8.920 produtores de casulo de seda, sendo que 8.115 se encontravam no estado do Paraná. Entre setembro de 2003 e agosto de 2004, o Brasil exportou 1.453.305 kg de fio de seda com um faturamento de US\$ 33.986.989,00 ([www.tribunadonorte.com.br](http://www.tribunadonorte.com.br)).

No noroeste do estado do Paraná, o município de Nova Esperança é considerado o mais tradicional produtor de bicho-da-seda e referência nacional da produção de casulo verde, pois são 742 famílias que cultivam 3.061 hectares e produzem por ano 1.386 toneladas de casulos verdes. Somente esta atividade gera 2.226 empregos diretos e pelo preço médio de R\$ 6,00 o quilo, o que gera por ano no município um valor em torno de 8,3 milhões de reais. Essa região do estado produz em torno de 65% do total paranaense e a internacionalização das empresas de confecção dessa região poderá abrir espaço para a produção e exportação de artigos de seda. Embora essa região tenha se transformado em um importante pólo produtor de confecção, as exportações de seda concentram-se no fio grégia e torcido.

Na produção do bicho-da-seda é de extrema importância a identificação de



**Figura 3.** Ciclo biológico de *Bombyx mori*. A fase larval é dividida em 5 idades compreendendo aproximadamente 27 dias, fase na qual a lagarta aumenta aproximadamente 70 vezes o seu tamanho inicial. Na última idade a larva inicia a secreção de proteínas para a confecção do casulo, a qual pode durar até 3 dias. A pupa transforma-se em mariposa entre 10 a 12 dias. A mariposa está apta a reiniciar o ciclo através da reprodução com duração de 4-5 dias

mapas genéticos para caracterizar a biodiversidade e promover a obtenção de híbridos mais resistentes e produtivos. Na sericicultura, é de grande valor comercial a obtenção de híbridos que apresentem um alto rendimento de casulos por grama de ovo, resistência ao cultivo no campo, qualidade do fio de seda e tamanho e formato do casulo. As raças japonesas apresentam alto teor de seda ao casulo, e as raças chinesas apresentam uma maior resistência ao cultivo no campo. Desta forma, para obtenção do híbrido procura-se misturar as características genéti-

cas das raças japonesas e chinesas puras. As raças puras são resultantes do cruzamento de raças de mesma origem entre si, de modo a obter uma raça pura japonesa e outra raça pura chinesa, o cruzamento destas resulta no bicho-da-seda híbrido.

A atividade também engloba o cultivo da amoreira, cujo melhoramento genético é intensivamente estudado (Porto et al, 2003). Outro aspecto nessa área de atuação é que durante a fase de criação no campo as lagartas são susceptíveis a uma série de doenças causadas por fungos, vírus, bactérias e protozoários, podendo acarretar até a perda total da produção (Brancalhão, 2002). A COCAMAR, armazena um número considerável de raças geográficas de origens japonesas, chinesas e indianas, cuja herança genética é completamente desconhecida. As Figuras 1 e 2 apresentam, respectivamente, quatro dessas raças e seus casulos.

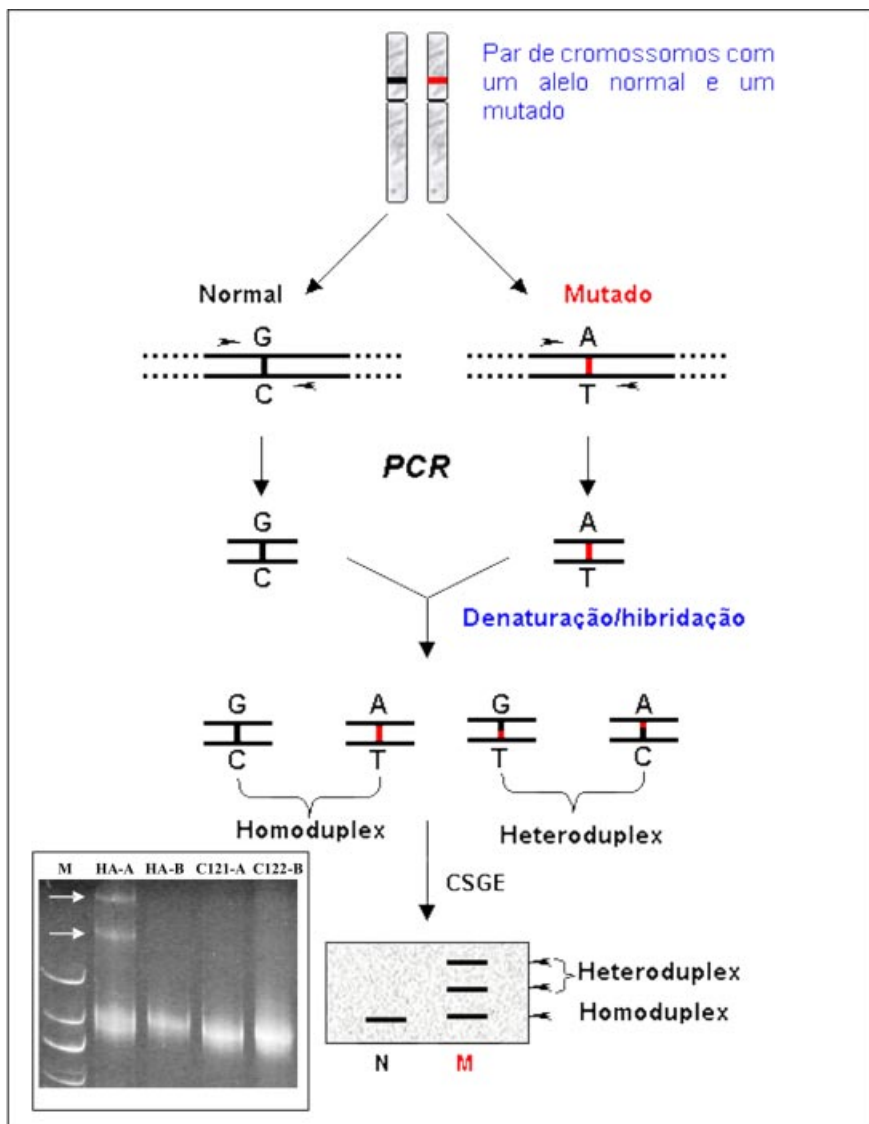
### A produção de casulos e o ciclo de vida

A produção de ovos do bicho-da-seda é uma atividade que tem a finalidade de suprir a demanda dos sericultores. As empresas/cooperativas entregam aos sericultores as lagartas de terceira idade e compram os casulos obtidos no final de cada ciclo de criação.

Os sericultores realizam de 8 a

### Quadro 2 – Princípios do CSGE

O CSGE é uma técnica de fácil análise, o que proporciona praticidade na comparação dos dados, com baixo custo, alta reprodutividade e sensibilidade. Primeiramente é realizada a amplificação de região suscetível à mutação (gene alvo) por primers específicos através de PCR (Polymerase Chain Reaction). O CSGE é baseado na eletroforese que detecta a sensibilidade conformacional da molécula do DNA em gel de agarose ou poliacrilamida. Assim, podem ser observadas as diferenças conformacionais quando dois alelos do gene apresentam alterações na seqüência de nucleotídeos. O uso de agentes desnaturantes facilita a detecção dessas diferenças na migração eletroforética. O CSGE é considerado uma ferramenta poderosa para a identificação de polimorfismo em genes alvos, o que permite uma possível correlação com o fenótipo. Esta metodologia permite a detecção de co-dominância, o que possibilita a identificação dos dois alelos do mesmo locus. A detecção de seqüências polimórficas de DNA (heteroduplex ou homoduplex), tem aplicações potenciais em programas de melhoramento de animais e plantas, como também na identificação das variedades de espécies e na evolução de loci genéticos (Figura 4).



**Figura 4.** Metodologia CSGE (Conformation-Sensitive Gel Electrophoresis). Esquema representativo de como a variabilidade de uma única base pode ser detectada pelo CSGE. No inserto, gel de poliácridamida onde segmento da cadeia leve do gene da fibroína foi amplificado e submetido à eletroforese após ciclos de denaturação e hibridação. As bandas heteroduplex presentes na raça japonesa HA-A de *Bombyx mori* estão assinaladas pelas setas. M, marcador de tamanho molecular, 100 pares de bases ladder, Invitrogen

10 criadas por safra devido às características do ciclo de vida do *B. mori* que apresenta quatro estádios completos de desenvolvimento: ovo, lagarta, casulo e, se finalizada a metamorfose, a mariposa. A fase larval é dividida em 5 idades compreendendo aproximadamente 27 dias; a alimentação é exclusiva de folhas de amoreira; a larva aumenta aproximadamente 70 vezes o seu tamanho inicial; na última idade a larva cessa a alimentação e inicia a secreção de proteínas para a confecção do casulo, que servirá de proteção para a

metamorfose, a qual pode durar até 3 dias. Se for mantida viva, a pupa transforma-se em mariposa entre 10 a 12 dias, terminando o ciclo de vida com o rompimento do casulo e quebra do longo fio de seda em muitos fios curtos. A mariposa está apta a reiniciar o ciclo através da reprodução com duração de 4-5 dias (Figura 3).

#### A genética do bicho-da-seda

O *B. mori* é geneticamente um inseto bastante conhecido, perdendo

apenas para a *Drosophila melanogaster*. O genoma haplóide de *B. mori* possui 475 Megabases (Mb), sendo 2,5 vezes maior do que o da *D. melanogaster* (175Mb) e 1,6 vezes maior do que o genoma do *Anopheles gambiae*, 280 Mb (Goldsmith et al, 2005).

Hoje, as possibilidades para a manipulação e estudos genéticos com o bicho-da-seda incluem mais de 400 mutações fenotipicamente visíveis, que foram mapeadas em cerca de 200 loci, compreendendo 28 grupos relacionados. Estas mutações afetam muitos aspectos fundamentais do ciclo de vida do inseto, tais como a formação da casca do ovo, o início do desenvolvimento embrionário, o hábito alimentar, a cor do casulo, as características do tegumento da lagarta e do adulto, fatores bioquímicos e outros. (Fujii, 1998).

Mediante as vantagens experimentais de trabalhar com o bicho-da-seda em relação a outros lepidópteros e sua importância econômica mundial, em 2000, após 12 anos de trabalho, duas equipes francesas, uma do Centro Nacional de Pesquisas Científicas (CNRS) e outra do Instituto Nacional de Pesquisas Agrônomicas (INRA) de Lyon (em colaboração com grupos japoneses e americanos) conseguiram o transgênico do bicho-da-seda utilizando transformação com um vetor contendo o transposon piggyBac, eficiente para inserir, no patrimônio genético do inseto, genes exógenos, úteis tanto para a produção de seda como para a indústria farmacêutica, na síntese de substâncias protéicas (colágeno, elastina e outros) e como fonte de biomateriais. (Tamura et al, 2000).

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

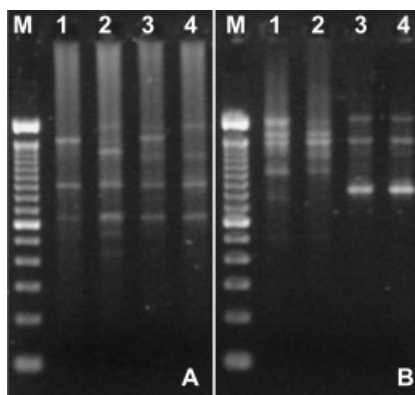
#### Genes envolvidos na produção do fio de seda

O casulo do *B. mori* é constituído principalmente de três componentes

protéicos: a fibroína, a sericina e a p25, que são secretados pela glândula sericígena. A parte posterior da glândula (PSG) sintetiza as moléculas de fibroína e a proteína p25, que formam o fio insolúvel de fibroína. A parte central da glândula (MSG) secreta a sericina, que fornece ao fio uma camada aderente. A parte anterior (ASG) é responsável em secretar um fio simples de seda, pronto para a formação do casulo (Hossain et al, 2003).

A fibroína apresenta duas cadeias polipeptídicas, cadeia leve (L) e pesada (H), cujos genes estão localizados nos cromossomos 14 e 25, respectivamente (Kimura et al, 1985). Esses polipeptídeos, H e L, estão ligados por pontes de dissulfetos na região carboxi-terminal de ambas as subunidades (Tanaka, et al, 1999). Algumas mutações no gene da cadeia leve da fibroína, denominadas Nd-s e Nd-s<sup>D</sup> (Mori et al, 1995), diminuem em 1% o nível de secreção da fibroína. Estas alterações impedem a ligação H-L, a qual é fundamental para a correta secreção do fio de seda.

O gene da cadeia pesada da fibroína contém ~16.788 pares de bases (pb)



**Figura 5.** Polimorfismo genômico em *Bombyx mori*. Perfil RAPD gerado a partir do DNA genômico das raças HA-A, HA-B, C121-A e C122-B (1,2,3 e 4 respectivamente), com os primers UBC 89 (A) e UBC 91 (B). M, marcador de tamanho molecular 100 pares de bases ladder, Invitrogen

e consiste de um intron e dois exons. As regiões 5' (+1 ~+1.449 pb) e 3' (+16.396 ~+16.788 pb) possuem seqüências idênticas em 99%, em relação às seqüências depositadas anteriormente (GenBank V00094, AB01736). Entretanto no segmento que compre-

ende de ~+1.900 a 400 pb acima do códon de terminação é diferente da seqüência descrita. Modificações nessa região do gene resultam em polimorfismos entre as diferentes raças de *B. mori*, sendo candidatas a serem utilizadas como ferramentas de caracterização molecular (Zhou et al, 2000).

O gene da cadeia leve da fibroína apresenta 13.472 pb contendo sete exons e um intron que ocupa 60% do gene com aproximadamente 8.145 pb. A região 3' desse intron é descrita como polimórfica, fato observado entre duas raças chinesas, C108 e p50 (Yasukochi, 1999).

O produto do gene P25 se associa ao complexo H-L por interações não covalentes, principalmente hidrofóbicas, unindo um arranjo de seis cadeias H-L da fibroína (Tanaka et al, 2000). A razão molar da cadeia pesada, cadeia leve e a P25 foi determinada como 6:6:1, tanto em casulos como no interior do lúmen da região posterior da glândula sericígena, sugerindo que a proteína p25, localizada internamente no complexo H-L, tem um importante papel em manter a integridade deste complexo (Inoue et al, 2000).

A sericina, outra proteína integrante do casulo, compreende uma família de glicoproteínas, geradas por *splicing* alternativo de dois genes na MSG, o Ser1 e o Ser2 (Michaille et al, 1990).

Os diversos polimorfismos encontrados nos genes que constituem o fio de seda podem ser fundamentais para determinar marcadores específicos e caracterizar as raças de bicho-da-seda que apresentam diferenças fenotípicas em inúmeras características complexas, tais como: comprimento da fibra de seda, crescimento larval e resistência à doenças, fornecendo ferramentas de grande valor para o melhoramento desse inseto (Nagarajau, et al, 2001).

Entre vários métodos para identificação da presença de mutações em genes candidatos, o CSGE (Conformation-Sensitive Gel Electrophoresis; Ganguly, et al, 1993; veja quadro 2) é um método simples e acurado para a detecção de marcadores de genes alvos.

### Marcadores Moleculares

O polimorfismo do DNA genômico de *B. mori* tem sido detectado através de marcadores moleculares tais como: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), RAPD (Ran-

### Quadro 3 – Marcadores RAPD

O advento da técnica de PCR causou um grande impacto na ciência, pois permitiu grandes avanços tanto em estudos de genética básica como aplicada, destacando-se entre estes a identificação de genótipos, estudos filogenéticos e melhoramento genético. Recentemente, diversas técnicas têm sido desenvolvidas com base na PCR, dentre elas destaca-se o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), um importante marcador molecular capaz de revelar polimorfismos de DNA entre indivíduos geneticamente relacionados. Esta técnica permite análise em grande escala, com pouca quantidade de DNA, evitando técnicas de transferência (*blotting*) e uso de sondas radioativas, além de não requerer nenhuma informação prévia acerca da seqüência-alvo. O RAPD utiliza como iniciadores oligonucleotídeos curtos (geralmente decâmeros), de seqüência nucleotídica arbitrária. A reação de amplificação procede em condições de baixa estringência, permitindo que ocorra o pareamento entre os iniciadores (*primers*) e o DNA-alvo, mesmo que não haja complementaridade total entre as duas seqüências. Como resultado, obtém-se um conjunto de fragmentos amplificados os quais, quando separados por eletroforese em gel, produzem um padrão de bandas específico conhecido como impressão digital genômica (*DNA fingerprint*). Os *fingerprints* permitem distinguir diferentes espécies e até mesmo populações distintas da mesma espécie. Cada banda representa um loci diferente e o número de bandas observadas ocorre em função da complexidade do genoma analisado. É um marcador genético dominante que não permite a distinção entre genótipos homozigóticos e heterozigóticos. O RAPD tem sido amplamente utilizado na diferenciação de linhagens, análise de variabilidade em bancos de germoplasma, estudo de estrutura genética de populações, estimativa de parâmetros genéticos, análise de paternidade, entre outros. Além disso, permite a discriminação entre populações diferentes e inferir sua correlação filogenética.

dom Amplified Polymorphic DNA; quadro 3), SSR (Simple Sequence Repeats) ou microssatélite e ISSR-PCR (Inter-Simple Sequence Repeat). O mapeamento destes marcadores de DNA no genoma do bicho-da-seda permitem o conhecimento do padrão de herança (homozigose e heterozigose) e a distância genética entre as diferentes raças cultivadas ao redor do mundo (Goldsmith et al, 2005). Estudos em criações de *B. mori* mostram a existência de variabilidade no padrão de crescimento e produtividade, sendo que, o rendimento de seda por casulo e a produção de ovos são os dois fatores de maior importância comercial na indústria sericícola.

A análise de um mapa de ligação tem sido realizada em duas raças parentais, denominadas C108 e p50 através do RAPD, metodologia esta que permitiu a identificação de marcadores ligados à resistência a fluoretos e também ao NPV (nuclear polyhedrosis virus), um patógeno em potencial para a criação do bicho-da-seda (revisão em Goldsmith et al, 2005).

A partir de estudos desse tipo em *B. mori*, os programas de melhoramento genético serão auxiliados na caracterização das raças puras e de seus híbridos, facilitando o monitoramento para a obtenção de um indivíduo híbrido que apresente as melhores características para a produção e sobrevivência no campo (Figura 5).

### Conclusão

Os resultados e impactos esperados no avanço do conhecimento desse projeto é de caráter significativo no aspecto científico, pois nenhuma informação genética é conhecida nesse acervo de raças de *B. mori*. A detecção de polimorfismos permitirá a análise dos processos envolvidos no melhoramento de *B. mori*. Informações que identifiquem genes envolvidos na resistência/produção, irá refletir na fixação do homem nas pequenas propriedades, proporcionando condições de manutenção de seu núcleo familiar. Nas cidades oferecerá o emprego no parque industrial e de transformação da matéria-prima, sendo uma atividade importante na economia rural e urbana dos municípios. Somando-se a essas características, a sericultura contribui para o desenvolvimento sustentável do país, em virtude de seu relevante aspecto

social e por se tratar de atividade de baixo impacto no meio ambiente.

### Referências

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

Fujii, H. (1998). Genetical stocks and mutations of *Bombyx mori*: important genetic resources. Fukuoka. Jpn: Kyushu Univ. 54 pp.

Ganguly, A.; Rock, M.J.; Prockop, D.J. (1993). Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci USA; 24; 91: 5217, 1994]. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10325-10329.

Goldsmith, M. R.; Shimada, T.; Abe, Hiroaki (2005). The genetics and genomics of the silkworm, *Bombyx mori*. *Ann. Rev. Entomol.* 50:71-100.

Hossain, K.S.; Ochi, A.; Ooyama, E.; Magoshi, J.; Nemoto, N. (2003). Dynamic Light Scattering of Native Silk Fibroin Solution Extracted from Different Parts of the Middle Division of the Silk Gland of the *Bombyx mori* Silkworm. *Biomacromolecules.* 4: 350-359.

Inoue, S.; Tanaka, K.; Arisaka, F.; Kimura, K.; Ohotomo, K.; Mizuno, S. (2000). Silk fibroin of *Bombyx mori* is secreted, Assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-Chain, L-Chain, and P25, with a 6:6:1 molar ratio. *J. Biol. Chem.* 275: 40517-40528.

Kimura, K.; Oyama, F.; Ueda, H.; Mizuno, S; Shimura K. (1985). Molecular cloning of the fibroin light chain complementary DNA and its use in the study of the expression of the light chain gene in the posterior silk gland of *Bombyx mori*. *Experientia.* 41(9): 1167-1171.

Kurin R. (2002). "The Silk Road: Connecting Cultures, Creating Trust." *Talk Story*, Fall, No. 21, 1-11. Smithsonian Center for Folklife and Cultural Heritage

Michaille, J.J.; Garel, A.; Prudhomme, J.C. (1990). Cloning and characterization of the highly polymorphic Ser2 gene of *Bombyx mori*. *Gene* 86: 177-184.

Mita, K. et al. (2004). The Genome Sequence of Silkworm, *Bombyx mori*.

*DNA Research* 11:27-35.

Mori, K.; Tanaka, K.; Kikuchi, Y.; Waga, M.; Waga, S.; Mizuno, S. (1995). Production of a chimeric fibroin light-chain polypeptide in a fibroin secretion-deficient naked pupa mutant of the silkworm *Bombyx mori*. *J. Molec. Biol.* 251:217-228.

Nagaraju, J.; Reddy, D.K.; Nagaraja, G.M.; Sethuraman, B.N. (2001). Comparison of multilocus RFLPs and PCR-based marker systems for genetic analysis of the silkworm, *Bombyx mori*. *Heredity.* 86: 588-597.

Porto, A. J. ; Okamoto, F. ; Otsuki, I. P. (2003). Estudo de cultivares de amoreira e de técnicas de manejo alimentar no desempenho do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.). *Boletim da Indústria Animal, Nova Odessa,* 60:71-82.

Porto, A. J. ; Okamoto, F. ; Cunha, E. A. ; Otsuki, I. P. (2004). Caracterização de oito raças do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.). *Ciência Rural, Santa Maria,* 34:259-264.

Secex (2003). Exportação de fios de seda no ano 2002. *Informativo Ano 7.*

Tamura, T.; et al. (2000). Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. *Nat. Biotechnol.* 18: 81-4.

Tanaka, K.; Kajiyama, N.; Ishikura, K.; Waga, S.; Kikuchi, A.; Ohtomo, K.; Takagi, T.; Mizuno, S. (1999). Determination of the site of disulfide linkage between heavy and light chains of silk fibroin produced by *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1432(1):92-103.

Tanaka, N.; Yokoyama, T.; Abe, H.; Tsuchida, K.; Ninagi, O.; Oshiki, T. (2000). Cytogenetic analysis shows that the unusually large chromosome in the sex-limited pB silkworm (*Bombyx mori*) strain consists of three chromosomes. *Hereditas.* 133(2): 95-103.

Tessari, C. A. (1999). Análise Setorial Fiação Tecelagem e Malharia, *Gazeta Mercantil.* Vol. 1, p. 70, São Paulo.

Xia, Q. et al and Genome analysis group (2004). A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science* 306: 1937-40.

Yasukochi Y. (1999). A simple and accurate method for generating co-dominant markers: an application of conformation-sensitive gel electrophoresis to linkage analysis in the silkworm. *Mol. Gen. Genet.* 261: 796-802.

Zhou, C.Z.; Confalonieri, F.; Medina, N.; Zivanovic, Y.; Esnault, C.; Yang, T.; Jacquet, M.; Janin, J.; Duguet, M.; Perasso, R.; Li, Z.G. (2000). Fine organization of *Bombyx mori* fibroin heavy chain gene. *Nucleic Acids. Res.* 28: 2413-2419.