

Caracterización molecular de líneas de *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) mediante AFLP

Molecular characterization of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) strains by AFLP

DUVERNEY GAVIRIA A.¹, ENRIQUE AGUILAR F.², LILIANA RAMÍREZ L.³, ÁLVARO ALEGRÍA S.⁴

Resumen. Veintitrés líneas de gusano de seda *Bombyx mori* L. (12 líneas de origen japonés y 11 líneas de origen chino), pertenecientes al banco de germoplasma de gusano de seda del CDTS (Centro de Desarrollo Tecnológico de la Sericultura) se analizaron utilizando la técnica de Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP). Se emplearon cuatro combinaciones de iniciadores. Las cuatro combinaciones ensayadas arrojaron 247 bandas con un polimorfismo promedio de 54,6%, las cuales después de ser corregidas según el criterio de Lynch y Milligan resultaron en 168 bandas con un polimorfismo de 90,4%. El dendrograma construido utilizando el algoritmo UPGMA para los datos de disimilitud, reveló dos grupos muy bien definidos que corresponden a las razas geográficas japonesa y china. El promedio de heterocigocidad fue mayor en las líneas de la raza japonesa, observándose una dispersión mayor en el análisis de UPGMA y de los componentes principales. El estudio de la estructura poblacional indica que aunque las dos razas no son muy diferentes entre sí, existe un componente de varianza mayor entre los grupos establecidos que dentro de éstos, lo que muestra un grado significativo de diferenciación genética.

Palabras clave: Sericultura. Estructura poblacional. Marcadores moleculares.

Abstract. Twenty-three silkworm *Bombyx mori* L. strains (twelve Japanese and eleven Chinese strains), belonging to the CDTS (Technological Development Center for Sericulture) silkworm germplasm bank, were analyzed using the Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) technique. Four combinations of primers were used. The four assayed combinations produced 247 bands with an average polymorphism of 54,6%; which, when corrected using Lynch and Milligan's criteria, resulted in 168 bands with a polymorphism of 90,4%. The dendrogram was built using the UPGMA algorithm for the dissimilarity data, revealing two very well defined groups that correspond to the Japanese and Chinese geographical races. The heterozygosity average was higher in the Japanese race lines, showing a greater dispersion in the UPGMA and the main components analysis. The population structure study indicate that although the two races are not very different from each other, there exists a component of greater variance between the established groups than within them, which shows a significant level of genetic differentiation.

Key words: Sericulture. Population structure. Molecular markers.

Introducción

Dentro de las diversas variedades de polillas que secretan fibras de seda, se incluyen *Bombyx mori* L. de la familia Bombycidae y las especies silvestres de la familia Saturniidae: *Antherae mylitta* Drury, *Antherae pernyi* Guérin-Ménéville, *Antherae assama* Westwood y *Antherae yamamai* Guérin-Ménéville. Con una historia de más de 5.000 años de domesticación, el gusano de seda, *B. mori*, es la especie más importante a nivel agronómico como productor de seda; es el lepidóptero mejor estudiado debido a su rico repertorio de mutacio-

nes bien caracterizadas que afectan virtualmente cada carácter de la morfología del organismo como también de su comportamiento y desarrollo. Su genoma haploide, con un tamaño de 560 Mb, es 3,8 veces más grande que el de *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae) y se distribuye en 28 cromosomas holocéntricos de tamaño muy reducido (Nagaraju 2002).

El "stock" genético del gusano de seda domesticado lo componen un gran número de ecotipos y líneas autocruzadas artificialmente que se distribuyen en regiones templadas (líneas que presentan

diapausa) y tropicales (líneas sin diapausa). Estas variedades difieren, entre otros, en los caracteres cualitativos y cuantitativos que afectan la calidad de la seda. Las líneas sin diapausa son pobres productoras de seda, presentan crecimiento rápido, peso corporal bajo y fibras de seda gruesas y cortas, son resistentes y se sabe que se pueden desarrollar aún en condiciones desfavorables como las encontradas en regiones tropicales con temperaturas altas y humedad alta propicias para condiciones de sanidad baja y el desarrollo de pestes y enfermedades. Las líneas tropicales de gusano de seda, sin embargo, presentan un gran número de

1 Biólogo. Asistente de investigación- CENBIOTEP-Universidad Tecnológica de Pereira E-mail: dugaar@utp.edu.co

2 Autor para correspondencia: Biólogo, Docente- Facultad Ciencias de la Salud CENBIOTEP-Universidad Tecnológica de Pereira. La Julita, Pereira-Risaralda, Teléfono: 3215393, E-mail: eaf578@yahoo.com

3 Licenciada Biología y Química. Técnico-Centro de Desarrollo Tecnológico de la Sericultura (CDTS).

4 Doctor en Biología Molecular y Bioquímica, Director-CENBIOTEP-Universidad Tecnológica de Pereira. E-mail: AlvaroHAlegriaSA@netscape.net

crías al año; es decir, son polivoltinas, lo que de alguna manera compensa su productividad baja. Las líneas con diapausa, producen mayor cantidad de seda y de mejor calidad, presentan una vida larval larga, peso corporal alto y fibras de seda largas y delgadas aunque sólo se pueden obtener una o máximo dos crías al año (uni o bivoltinas). En estas últimas, a pesar de ser mejores productoras de seda, su cría en regiones tropicales no es viable dada su alta susceptibilidad a pestes y malas condiciones de cría (Sharma *et al.* 1990).

Dado el trabajo que con el gusano de seda se ha llevado a cabo desde hace muchos años, en este momento se cuenta con una gran cantidad de ecotipos y más de 3.000 líneas mejoradas, y aproximadamente 400 mutantes hereditarios muchos de los cuales ya han sido mapeados (Doira 1992). La identificación y explotación de los polimorfismos al nivel de secuencias de ADN es uno de los desarrollos más significativos de la biología molecular; este tipo de polimorfismos ha sido usado con éxito en diversas especies de plantas y animales, tanto en programas de mejoramiento como de identificación varietal, QTLs y mapeo genético. El uso de marcadores moleculares posee varias ventajas sobre la identificación por caracteres morfológicos, ya que no se afectan por el ambiente, y pueden ser identificados en cualquier estadio de desarrollo (Nagaraju 2000).

En el gusano de seda, se han empleado muchas técnicas para identificar el polimorfismo a nivel molecular, como el uso de marcadores enzimáticos, estudiando amilasas de hemolinfa en líneas de gusanos tropicales y de regiones templadas (Nagaraju 2000). Los análisis permitieron identificar polimorfismo electroforético de las amilasas anódicas como cuatro bandas en las líneas sin diapausa y cinco bandas en las líneas con diapausa; la banda extra en las líneas de regiones templadas corresponde a una banda de migración lenta. Cuando la separación es catódica, se identificó una sola banda en las líneas sin diapausa y ninguna en las líneas con diapausa. En este estudio también se pudo determinar que las líneas de diapausa excretan cinco veces más almidón que las líneas sin diapausa (Nagaraju 2000). Los estudios moleculares de ADN basados tanto en marcadores que usan PCR como en aquellos que no, analizando trece líneas de gusano de seda seis con diapausa y siete sin diapausa, permitieron la separación de los individuos claramente en dos ra-

mas de un dendrograma, aquella de los individuos con diapausa y aquellos que no presentaban diapausa, al igual que permitió la identificación de marcadores exclusivos para cada uno de los dos grupos (Nagaraju *et al.* 1995). El análisis de hibridización con la sonda Bkm-2 (GATA₆₆TA), en las mismas trece líneas de gusano de seda, separó claramente los dos grupos y permitió la identificación de bandas específicas para cada uno, además de la identificación de bandas específicas de sexo (Nagaraju *et al.* 1995). Damodar *et al.* (1999) informaron sobre el análisis de 28 loci microsatélites (SSR) que permitió la identificación de un marcador, sat 211, con alelos específicos para líneas con y sin diapausa, al igual que la identificación de un marcador muy polimórfico, sat 2763, con un total de 17 alelos y con una heterocigocidad elevada (90%) que permitiría fácilmente identificar las relaciones de parentesco y geográficas, muy útil, por ejemplo, en el análisis de variedades silvestres o de especies de gusano en peligro de extinción. Análisis similares sobre las mismas líneas, usando otras técnicas, han arrojado resultados parecidos (Reddy *et al.* 1999). Un estudio comparativo de técnicas de multilocus arrojó resultados importantes a la hora de escoger un sistema de marcadores moleculares para un trabajo en gusano de seda y aunque los agrupamientos fueron similares y se explicaban por la presencia de diapausa, origen geográfico y relaciones de parentesco de los individuos, diferían levemente en el tipo y grado de polimorfismo detectado (Nagaraju *et al.* 2001). El presente estudio tuvo como objetivos analizar las características poblacionales y el grado de diversificación presente entre las líneas de gusano de seda *B. mori* mantenidas en el CDTS.

Materiales y Métodos

El estudio se desarrolló sobre 12 líneas de origen Japonés (KOI, K02, KO5, K10, K20, K30, K40, K522, SG3, SG2, NG, KNA) y 11 líneas de origen Chino (CA, CBS, CC, CJ, CGS, CHS, CLS, CTS, SC1, SC2, SC3), todas ellas pertenecientes al Centro de Desarrollo Tecnológico de la Sericultura (CDTS) mantenidas en la finca "El Pilamo", Risaralda.

Extracción de ADN. El ADN genómico fue extraído de la porción posterior de la glándula serígena (Suzuki *et al.* 1972). Se tomaron 0,3 g de glándula de seda de cada una de las líneas a analizar, manteniéndolas refrigeradas mientras se procesaban. El tejido se maceró en un tubo de microcentrífuga con amortiguador de

extracción (NaCl 50 mM, EDTA 50 mM, SDS 1%) a 50°C. A cada muestra se agregaron 10 µl de proteinasa K (100 µg/ml). Las muestras se maceraron periódicamente hasta no observar fragmentos, durante la incubación en el baño. Se llevó a cabo extracción con un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25-24-1) durante 5 min; posteriormente se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 minutos y se recuperó la fase acuosa en otro tubo al que se le agregó un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24-1), extra- yéndose durante 5 min. Después de 5 min de centrifugación se tomó la fase acuosa y se le agregaron dos volúmenes de etanol absoluto y 1/10 de acetato de sodio 3M para precipitar los ácidos nucleicos. Posteriormente se resuspendió en amortiguador TE (10mM de Tris-HCl, 1mM de EDTA, pH 8,0) y se incubó a 37°C durante 1 h después de la adición de ARNasa (100 µg/ml). El ADN genómico fue resuspendido y cuantificado por espectrofotometría y observado por electroforesis en gel de agarosa al 0,8%.

AFLP y selección de iniciadores. Las reacciones de AFLP (Vos *et al.* 1995) se llevaron a cabo usando el estuche comercial "AFLP Analysis system I" No. catálogo 10544-013, de la casa comercial INVITROGENE, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La amplificación selectiva por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó usando una extensión de tres nucleótidos para ambos iniciadores. Las cuatro combinaciones de iniciadores empleadas se escogieron por producir un número alto de polimorfismos no ambiguos, a partir del ensayo de 10 combinaciones sobre cuatro líneas de gusano. Los productos de PCR se mezclaron con 10 µl de solución de carga para secuenciación (98% formamida, 10mM EDTA, 0,025% xileno cianol, 0,025% azul de bromofenol), se calentaron por 3 min a 90°C y rápidamente se enfriaron en hielo; 5 µl de la mezcla se agregaron al gel de secuencia de poliacrilamida al 6% y se sometieron a 90 W durante 90 min. Después de terminada la corrida, el resultado se reveló mediante tinción con plata del estuche comercial "Silver sequence™ DNA sequencing system" de la casa comercial Promega No catálogo Q-4130, siguiendo las recomendaciones del fabricante. El registro permanente de estos resultados se realizó mediante fotografía digital transfiriendo las imágenes a formato TIFF con una cámara Nikon D'100.

Análisis estadístico. Las bandas de ADN se tomaron como un locus genético asumiendo además que los alelos marcadores de diferentes loci no comigran y que

cada locus puede ser tratado como un sistema de dos alelos (Lynch y Milligan 1994). De esta manera, se construyeron matrices de datos con 1 para la presencia y 0 para la ausencia de cada uno de los loci. Los datos se organizaron y analizaron por separado en razón de su origen geográfico y dentro de cada una de estas poblaciones se definieron subpoblaciones basándose en su relación de agrupamiento en el dendrograma.

Similaridad y análisis de agrupamiento.

La identificación de las relaciones para las 23 líneas de gusano analizadas se basó en las matrices construidas con los índices de similaridad (Nei y Li 1979). Los valores de disimilaridad se analizaron con el método de los pares de grupos no ponderados con media aritmética (UPGMA), y se construyó un dendrograma. Un análisis de componentes principales (Gower 1966) se llevó a cabo para mostrar la distribución de las relaciones en tres dimensiones. Todos estos análisis se hicieron usando NTSYS-pc ver. 2.01 (Rohlf 1998).

Estadística descriptiva y diversidad.

Antes de correr cada uno de los análisis el supuesto de homoscedasticidad (homogeneidad de varianzas) fue revisado mediante una prueba de Bartlett (Sokal y Rohlf 1981). Los programas POPGENE, ver. 1.32 (Yeh *et al.* 1997) y TFPGA (Tools for Population Genetic Analysis), ver. 1.3 (Miller 1999) se usaron para calcular, bajo el supuesto de equilibrio de Hardy-Weinberg, los siguientes parámetros: (i) frecuencia del alelo recesivo (0) y consecuentemente del dominante, con el método de la expansión de Taylor (Lynch y Milligan 1994), (ii) porcentaje de loci polimórficos, (iii) promedio de heterocigocidad no sesgada de todos los loci (Nei 1978), prueba de neutralidad, prueba exacta de diferenciación poblacional (Raymond y Rousset 1995). Estos análisis se realizaron tanto con las muestras crudas, como con aquellas a las cuales se les había aplicado una restricción al análisis para evitar el sesgo en bandas que presentasen una frecuencia mayor a $1-(3/N)$ (Lynch y Milligan 1994) datos no mostrados.

Estructura poblacional. El programa AMOVA-PREP (Miller 1998) se usó para transformar el conjunto de datos dominantes para el programa de Análisis Molecular de Varianza (AMOVA, ver. 1.55; Excofier *et al.* 1992). Los datos se analizaron como dos poblaciones y además como dos sub-poblaciones dentro de cada una de las poblaciones, para deter-

minar el componente aportado por cada una de las subdivisiones a los componentes de varianza total. Los análisis se realizaron tomando tanto los datos crudos como los datos corregidos con el factor $1-(3/N)$.

Distancia genética. La distancia genética se evaluó sobre las poblaciones y subpoblaciones con el programa TFPGA (Tools for Population Genetic Analysis), ver. 1.3 (Miller 1999), empleando el cálculo descrito por Nei (1978).

Resultados

Similaridad y análisis de agrupamiento.

La organización de los datos se llevó a cabo definiendo subpoblaciones dentro de cada una de las razas determinadas a través de la relación en el dendrograma y analizando además solamente dos poblaciones correspondientes a cada una de las razas geográficas. La significancia en la escogencia de estos grupos se comprobó estadísticamente con la prueba exacta de diferenciación de poblaciones (Raymond y Rousset 1995), encontrándose que el nivel de estructuración correspondiente a subpoblaciones no era significativo, pero sí el nivel de población. Los análisis individuales de cada una de las combinaciones usadas arrojaron resultados similares y presentaron

índices de correlación entre los datos de las diferentes matrices superiores al 90%, lo que significa que el número de combinaciones empleadas es suficiente para explorar la diversidad presente en estas líneas de gusano de seda. El nivel de polimorfismo para las combinaciones estuvo en el rango 65,6-75,8%, aunque se generó un gran número de fragmentos de restricción (247 bandas), a partir de las muestras individuales con la técnica de AFLP (Tabla 1). Solamente se usaron para el análisis, aquellos fragmentos que fueron polimórficos y se registraron sin ambigüedad; esta corrección se hizo según el criterio establecido por Lynch y Milligan en 1994 analizándose finalmente 168 bandas de los datos totales con un promedio de polimorfismo de 90,4% (Tabla 2). El resto de los análisis se llevaron a cabo solamente para los datos corregidos.

El dendrograma generado por el análisis de UPGMA de las 168 bandas para las cuatro combinaciones de iniciadores resolvió las 23 líneas de gusano de seda en dos grupos perfectamente definidos como raza japonesa y raza china (Fig. 1), a una distancia de 0,22 para las muestras de la raza japonesa y 0,18 para las muestras de la raza china. El análisis permitió identificar perfectamente cada uno de los indivi-

Tabla 1. Análisis de las combinaciones de AFLP usadas.

Combinación	Número de loci	Porcentaje de loci polimórficos
E-ACG/M-CAC	72	72,2
E-ACG/M-CAT	46	69,5
E-ACG/M-CAA	67	65,6
E-AGG/M-CAC	62	75,8
Total loci	247	54,6
Total loci (corrección de Lynch y Milligan 1994)	168	90,4

Tabla 2. Análisis de estadística descriptiva para cada una de las combinaciones y para la sumatoria de estas combinaciones.

Combinación	Nivel de análisis	Heterocigocidad	Flujo génico (Nm)	Distancia genética	Gst
1	Población 1	0,2199	0,6550	0,3599	0,4329
	Población 2	0,1333			
	Población total	0,3044			
2	Población 1	0,2435	0,5957	0,3476	0,4563
	Población 2	0,0738			
	Población total	0,2794			
3	Población 1	0,1838	0,9350	0,2378	0,3484
	Población 2	0,1684			
	Población total	0,2659			
4	Población 1	0,2632	0,3486	0,3114	0,3486
	Población 2	0,1667			
	Población total	0,3108			
Total	Población 1	0,2446	0,7712	0,3117	0,3933
	Población 2	0,1474			
	Población total	0,2983			
Total (Lynch y Milligan 1994)	Población 1	0,2585	0,7068	0,5052	0,4143
	Población 2	0,2253			
	Población total	0,3785			

duos; sin embargo, en la rama correspondiente a la raza japonesa se obtuvieron dos líneas (K02, SG2) que presentaron patrones de AFLP casi idénticos, distancia igual a 0,08 (Figs. 1 y 2).

Estadística descriptiva y diversidad. El conjunto de datos obtenido con las cuatro combinaciones de iniciadores muestra en el dendrograma y en el análisis de componentes principales, que la rama correspondiente a la raza japonesa es más heterogénea que la de la rama de la raza china. Esta observación es confirmada con los datos de heterocigocidad, los cuales siempre son mayores para las líneas de raza japonesa que para las líneas de raza china. El estimado del grado de diferenciación poblacional establecido por el valor G_{st} para cada uno de los loci indica un grado alto de diferenciación (Tabla 3).

Estructura poblacional. Los componentes de varianza se obtuvieron a partir de las muestras corregidas, con el programa AMOVA, ver. 1.55. (Excofier *et al.* 1992). Se analizaron las diferencias existentes entre y dentro de las dos razas evaluadas. Este análisis reveló que aunque los componentes de varianza dentro y entre poblaciones son similares, el componente de varianza entre poblaciones fue un poco mayor, lo que sugiere que existe diferenciación entre las dos razas, aunque parece que el grado de diferenciación no es muy alto (Tabla 4). Este resultado se confirmó adicionalmente con una comparación de poblaciones apareadas mediante la significancia del F_{st} . Se realizó además el análisis de varianza para los subgrupos definidos a partir de los análisis de conglomerados y se determinó que no se comportaban como grupos, lo que significa que no existen en estas poblaciones analizadas niveles de subdivisión menor a aquellos evaluados.

Discusión y Conclusiones

En el presente estudio se demuestra que la técnica de AFLPs puede ser usada exitosamente en gusano de seda para revelar polimorfismos a nivel del ADN útiles y que en algún momento pueden ser considerados como marcadores genéticos. Los resultados demuestran que esta técnica es valiosa en la identificación de la variabilidad genética en el gusano de seda. En general, la información arrojada por cada una de las combinaciones parece ser la misma, por lo cual se puede decir que el análisis parece estar abarcando la totalidad del genoma del gusano de

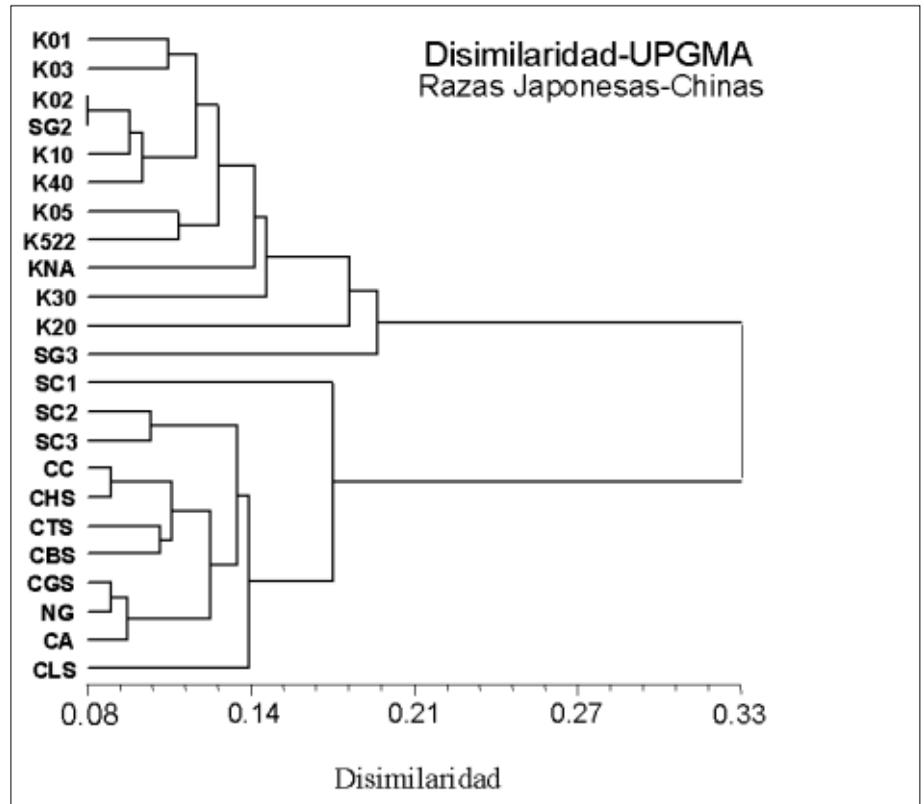


Figura 1. Dendrograma derivado de UPGMA que ilustra las relaciones entre las 23 líneas de las dos razas de gusano de seda *Bombyx mori*. Inferido a partir de los datos de las 168 bandas de AFLPs.

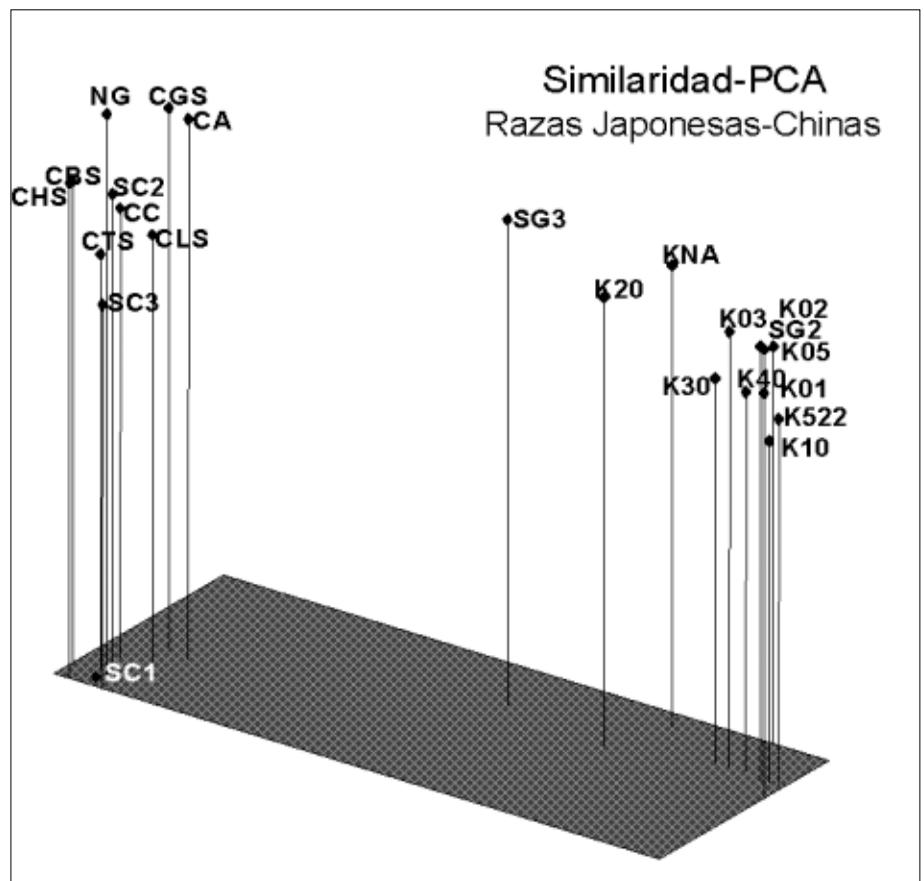


Figura 2. Análisis de componentes principales, una matriz de apareamiento simple, para los datos de similaridad obtenidos a partir de los análisis de 168 bandas de AFLPs.

Tabla 3. AMOVA-CORREGIDA. Análisis de los componentes de varianza dentro y entre poblaciones de las muestras de gusano de seda *Bombyx mori* L.

Fuente de variación	df	MS	VC	%Total	P	B
Varianza entre poblaciones	1	353,039	28,971	58,57	< 0,0099	< 0,009901
Varianza dentro de poblaciones	21	20,497	20,497	41,43		

seda. El análisis ha permitido la identificación de bandas específicas para cada una de las razas estudiadas, las cuales pueden tener gran utilidad en establecimiento de derechos de propiedad intelectual y la determinación de pureza del germoplasma tanto en las líneas puras como en los híbridos obtenidos para uso comercial.

Los conglomerados formados identificaron perfectamente las líneas sobre la base de su origen geográfico, indicando claramente los componentes japonés y chino de cada una de las líneas, los cuales, parecen estar acentuados debido a la estrategia de cómo son mantenidas las líneas, a través de procesos de endogamia. A pesar de que la diversidad observada fue baja, menor al 10%, los resultados permiten sugerir que las líneas a partir de las cuales se está manteniendo la raza japonesa fueron originalmente menos homogéneas que aquellas con las cuales se mantiene la raza china. Sin embargo, en el grupo de origen japonés se identificaron dos líneas casi idénticas y aunque en las líneas chinas se presentan más líneas similares entre sí, no se encontró ninguna con este grado bajo de diversidad. Las variedades geográficas de gusano de seda *B. mori* comparten un gran componente de su genoma. Este nivel de similaridad hace necesario el

estudio y evaluación de mayor cantidad de caracteres en cada una de las líneas que permita decir con mayor certeza si estas líneas, con altos niveles de similaridad, deben ser mantenidas y replicadas; es decir, si vale la pena sostenerlas como “stock” de mejoramiento. De igual manera, es importante evaluar las características de líneas como SG3, K20, K30 en la raza japonesa y sobre todo de la línea SC1 de la raza china, las cuales presentan patrones de AFLP que las ubican distantes de sus conglomerados.

Los resultados de los componentes de varianza sugieren que si se quieren implementar programas de mejoramiento y de obtención de híbridos de mayor productividad, es necesario aumentar la base genética introduciendo nueva líneas ya sea del mismo o de diferente origen geográfico, que permitan un grado mayor de diversidad poblacional.

El gusano de seda, *B. mori*, comprende un gran número de ecotipos y líneas sintéticas endogámicas que muestran un alto grado de divergencia con respecto al origen geográfico, caracteres morfológicos, cuantitativos y cualitativos. Entonces, es importante el estudio de la diversidad genética de varios genotipos de gusano de seda con el propósito de adelantar un programa de mejoramiento de líneas.

Tabla 4. AMOVA-CORREGIDA. Análisis de los componentes de varianza dentro y entre poblaciones y subpoblaciones de las muestras de gusano de seda *Bombyx mori*.

Fuente de variación	df	MS	VC	%Total	P	B
V. entre poblaciones	1	353,039	28,033	56,67	< 0,0099	0,009901
V. entre pob. dentro de subp.	2	30,464	1,986	4,02		
V. dentro de subpoblaciones	19	19,448	19,448	39,31		

Fuente de variación	df	MS	VC	%Total	P	B
V. entre subpoblaciones	3	137,989	20,866	51,76	< 0,0099	
V. dentro de subpoblación	19	19,448	19,448	48,24		

Fuente de variación	df	MS	VC	%Total	P	B
V. entre poblaciones	1	353,039	28,971	58,57	< 0,0099	0,009901
V. dentro de población	21	20,497	20,497	41,43		

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero por parte de COLCIENCIAS del proyecto con código 1110-12-11603 y de la Universidad Tecnológica de Pereira en el marco de la convocatoria en biotecnología.

Literatura citada

- ABRAHAM, E. G.; NAGARAJU, J.; DATTA, R. K. 1992. Biochemical studies of amylases in the silkworm, *Bombyx mori* L.: Comparative analysis in the diapausing and nondiapausing strain. *Insect Biochemical and Molecular Biology* 22 (8): 687-873.
- DAMODAR, K.; ABRAHAM, E. G.; NAGARAJU, J. 1999. Microsatellites in the silkworm, *Bombyx mori*: Abundance, polymorphism, and strain characterization. *Genome* 42: 1057-1065.
- DOIRA, H.; FUJII, H.; KAWAGUCHI, Y.; KIHARA, H.; BANNO, Y. 1992. Genetic stock and mutation of *Bombyx mori*. Institute of Genetic Resources, Kyushu University, Japan.
- EXCOFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- GOWER, J. C. 1966. Some distance properties of latent roots and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika* 53: 325-338.
- LYNCH, M.; MILLIGAN, B. G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99.
- MILLER, M. P. 1998. AMOVA-PREP 1.01. A program for the preparation of ANOVA input files from dominant marker raw data. Computer software distributed by the author.
- MILLER, M. P. 1999. Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: A windows program for the analysis of allozymes and molecular population genetic data. Computer software distributed by the author.
- NAGARAJU, J. 2000. Recent advances in molecular genetics of the silk moth, *Bombyx mori*. *Current Science* 78 (2): 151-161.
- NAGARAJU, J. 2002. Application of the genetic principles for improving silk production. *Current Science* 83 (4): 409-414.
- NAGARAJU, J.; SHARMA, A.; SETHURAMAN, B. N.; RAO, G. V.; SINGH, L. 1995. DNA fingerprinting in the silkworm *Bombyx mori* using banded krait minor satellite DNA-derived probe. *Electrophoresis* 16: 1639-1642.
- NAGARAJU, J.; REDDY, K. D.; NAGARAJA, G. M.; SETHURAMAN, B. N. 2001. Comparison of multilocus RFLPs and PCR-based markers systems for

- genetic analysis of the silkworm, *Bombyx mori*. *Heredity* 86: 588-597.
- NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- NEI, M.; LI, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76: 5269-5269.
- REDDY, K. D.; NAGARAJU, J.; ABRAHAN, E. G. 1999. Genetic characterization of the silkworm *Bombyx mori* by simple sequence repeat (SSR)-anchored PCR. *Heredity* 83: 681-687.
- ROHLF, F. J. 1998. NTSYS-PC numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 2.01. Owner's manual. Exeter publication, Setauket, NY, USA.
- RYMOND, M.; ROUSSET, F. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280-1283.
- SHARMA, A.; NIPHADKAR M. P.; NAGARAJU, J. SINGH, L. 1990. DNA fingerprint variability within and among the silkworm *Bombyx mori* varieties and estimation of their genetic relatedness using BKM-derived probe. *The Journal of Heredity* 90 (2): 315-319.
- SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. 1981. *Biometry*. 2nd ed. Freeman, NY. 832 p.
- SUZUKI, Y.; GAGE, L. P.; BROWN, D. D. 1972. The genes for fibroin in *Bombyx mori*. *Journal of Molecular Biology* 70: 637-649.
- YEH, F. C.; YANG, R. C.; BOYLE, T. B.; YE, Z. H.; MAO, J. X. 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, Alta.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DEER LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMEN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.

Recibido: 30-jul-04 • Aceptado: 25-dic-05