

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICO MOLECULAR DE LÍNEAS NO
COMERCIALES DEL GUSANO DE SEDA *Bombyx mori* L.
MEDIANTE POLIMORFISMO DE LONGITUD DE FRAGMENTOS
AMPLIFICADOS (AFLP)**

**ADRIANA PATRICIA ARTEAGA OROZCO
HEIDY CATALINA NAVIA MOROCHO**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO BIOLOGÍA
POPAYÁN
2005**

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICO MOLECULAR DE LÍNEAS NO
COMERCIALES DEL GUSANO DE SEDA *Bombyx mori* L.
MEDIANTE POLIMORFISMO DE LONGITUD DE FRAGMENTOS
AMPLIFICADOS (AFLP)**

**ADRIANA PATRICIA ARTEAGA OROZCO
HEIDY CATALINA NAVIA MOROCHO**

**Trabajo de Grado presentado como requisito
para optar el título de Biólogas**

**Directora
PATRICIA EUGENIA VELEZ VARELA
M.Sc.**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO BIOLOGÍA
POPAYÁN
2005**

Nota de aceptación:

Director M.Sc. PATRICIA E. VELEZ VARELA

Jurado M.Sc. MARTHA I. ALMANZA P.

Jurado M.Sc. NELSON ROJAS MARTINEZ

Fecha de sustentación:

Popayán, 11 de Marzo de 2005

Esta tesis es una parte de nuestras vidas y comienzo de otras etapas por esto y más, la dedicamos a Dios y a nuestros padres por permitirnos realizar este sueño.

"El éxito debe medirse, no por la posición a la que ha llegado una persona, sino por su esfuerzo por triunfar" Booker Tallaferro.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a:

Patricia Eugenia Vélez Varela, Bióloga y Directora del trabajo de grado de la Universidad del Cauca, por su orientación y dirección en el trabajo de grado.

Ph.D Álvaro H. Alegría, Director del Centro de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad Tecnológica de Pereira. Por darnos la oportunidad de realizar el trabajo de grado en el laboratorio y proporcionarnos el material biológico y reactivos necesarios para realizar el trabajo.

Enrique Aguilar Fernández, Biólogo y asesor del trabajo en el Centro de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad Tecnológica de Pereira Por su apoyo y colaboración para la realización de esta investigación.

Duverney Gaviria Arias, Biólogo Genetista e investigador del Centro de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad Tecnológica de Pereira. Por transmitirnos sus conocimientos y orientarnos para lograr el objetivo del trabajo.

Martha Almanza, Bióloga y Jefe de departamento de Ciencias Agropecuarias de la Universidad del Cauca. Por su orientación en el trabajo de grado.

Universidad del Cauca. Por su formación durante el transcurso de nuestra carrera.

Universidad Tecnológica de Pereira. Por su apoyo económico y soporte institucional dado para la realización de este trabajo.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron o participaron en la realización de esta investigación, hacemos extensivo nuestro más sincero agradecimiento.

CONTENIDO

	pág.
RESUMEN	18
INTRODUCCIÓN	19
1. MARCO TEORICO	21
1.1 CADENA PRODUCTIVA DE LA SERICULTURA EN COLOMBIA	21
1.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL GUSANO DE SEDA <i>Bombyx mori</i> L.	22
1.3 ESPECIES DE GUSANOS DE SEDA	22
1.3.1 Características de razas de <i>Bombyx mori</i> l. según el voltinismo	23
1.3.1.1 Univoltino	24
1.3.1.2 Bivoltino	24
1.3.1.3 Polivoltino	24
1.3.2 Clasificación de razas de <i>Bombyx mori</i> L. según el origen geográfico	24
1.3.2.1 Raza japonesa	24
1.3.2.2 Raza china	25

1.3.2.3 Raza tropical	25
1.4 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GUSANO DE SEDA, <i>Bombyx mori</i> L	25
1.4.1 Características biológicas y fisiológicas	25
1.4.2 Morfología general de la larva	27
1.4.3 Morfología y fisiología de la glándula sericígena del gusano de seda	28
1.4.4 Características genéticas	29
1.5 MARCADORES MOLECULARES	29
1.5.1 Longitud de Fragmentos de Restricción Polimórficos (RFLP)	30
1.5.2 ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD)	30
1.5.3 Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP)	30
1.5.3.1. Digestión del ADN con dos endonucleasas de restricción	32
1.5.3.2. Adaptadores y Iniciadores de AFLP	32
1.5.3.3 Reacciones de Amplificación	33
1.6 MARCADORES MOLECULARES EN GUSANO DE SEDA, <i>Bombyx mori</i> L.	33
1.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34
1.7.1 Diversidad genética	35

1.7.2	Matriz de similaridad genética	35
1.7.3	Métodos de agrupamiento	36
1.7.4	Distancia genética	36
1.7.5	Estructura de poblaciones	36
2.	MATERIALES Y METODOS	38
2.1	MATERIAL BIOLÓGICO	38
2.2	EXTRACCIÓN DE ADN	41
2.3	ESPECTROFOTOMETRÍA	41
2.4	ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA PARA EL CONTROL DE CALIDAD DEL ADN	41
2.5	POLIMORFISMO DE LONGITUD DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLP)	41
2.5.1	Digestión con endonucleasas de restricción	42
2.5.2	Ligación de adaptadores	42
2.5.3	Amplificación pre-selectiva	42
2.5.4	Amplificación Selectiva	42
2.5.5	Separación de los fragmentos de ADN mediante electroforesis de gel denaturalizante de poliacrilamida.	43

2.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	43
2.6.1	Diversidad genética	43
2.6.2	Matriz de similaridad genética	43
2.6.3	Análisis de agrupamiento	44
2.6.4	Distancia genética	44
2.6.5	Estructura de poblaciones	44
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
3.1	EXTRACCIÓN DE ADN	45
3.2	PERFILES DE AFLP	47
3.3	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	48
3.3.1	Diversidad genética.	49
3.3.1.1.	Loci polimórfico y heterocigosidad	49
3.3.1.2.	Matriz de similaridad genética	50
3.3.2	Correlación cofenética	51
3.3.3	Correlación de matrices	51
3.3.4	Similaridad genética	52

3.3.5	Distancia genética	54
3.3.6	Estructura de poblaciones	56
4.	CONCLUSIONES	57
5.	RECOMENDACIONES	59
	BIBLIOGRAFÍA	60
	ANEXOS	62

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Especies de gusano de seda que producen fibras naturales.	23
Cuadro 2. Códigos asignados a cada una de las líneas de gusano de seda utilizadas para el análisis con marcadores AFLP.	38
Cuadro 3. Parámetros de diversidad genética obtenidos de las 11 líneas de gusano de seda analizadas con las cuatro pares de combinaciones de iniciadores de AFLP (152 bandas polimórficas).	49
Cuadro 4. Estimadores de similaridad genética con cuatro marcadores AFLP en líneas de gusano de seda entre genotipos de una misma línea que conforman las poblaciones no comerciales, comerciales y población total.	50
Cuadro 5. Coeficientes de correlación cofenética obtenidos a partir de la comparación de la matriz de similaridad de la población total con los métodos de agrupamiento.	51
Cuadro 6. Coeficientes de correlación cofenética obtenidos a partir de la comparación de la matriz de similaridad de las líneas comerciales, no comerciales y la población total a partir de UPGMA con los cuatro marcadores de AFLP.	51
Cuadro 7. Correlación de las matrices de las cuatro pares de combinaciones de iniciadores de AFLP con la población total.	52
Cuadro 8. Correlación de las matrices de las cuatro pares de Combinaciones de AFLP's con la matriz total.	52
Cuadro 9. Fuentes de varianza de la estructura poblacional de las 11 líneas de gusano de seda. Análisis de Varianza Molecular dentro y entre poblaciones de las muestras de gusano de seda <i>Bombyx mori</i> L. a partir de datos de los cuatro pares de combinaciones de AFLP.	56
Cuadro 10. Parámetros estadísticos de la estructura poblacional de las 11 líneas de gusano de seda, obtenidos de las cuatro pares de combinaciones de iniciadores de AFLP.	56

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla1. Resumen de características según voltinismo del gusano de seda.	24
Tabla 2. Matriz de distancia (Nei, 1972) del dendograma de poblaciones de las líneas de gusano de seda.	55

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Ciclo de vida del gusano de seda. Muestra el crecimiento del gusano de seda en su tamaño y duración larval para cada instar.	26
Figura 2. Morfología de la larva del gusano en el quinto instar. Ca : Cabeza, es : espiráculos, me : marca estelar, mc : marca creciente, mo : marca ocular, pa : patas abdominales, pt : patas torácicas, ptr : patas traseras, rc : remo caudal.	27
Figura 3. Estructura de la glándula sericígena en el quinto instar del gusano de seda. as : glándula anterior, F : glándula de Filippi, ms : glándula media, ph : pezón hilador, ps : glándula posterior.	28
Figura 4. Ilustración de la técnica de AFLP.	31
Figura 5. Larvas de líneas no comerciales de Gusanos de Seda <i>Bombyx mori</i> L. Fotografía digital (cámara NIKON).	39
Figura 6. Dendograma de líneas comerciales de gusano de seda (<i>Bombyx mori</i>) de origen japonés (J) y chino (C). Los recuadros muestran las líneas seleccionadas como control para el presente estudio.	40
Figura 7. Ensayo de digestión negativo con la endonucleasa de restricción <i>MspI</i> en muestras de ADN de la parte posterior de la glándula de líneas no comerciales de gusano de seda. Gel de agarosa al 1%, se observa el ADN control (carriles 1,3,5,7,9) y muestras no digeridas (carriles 2,4,6,8,10).	45
Figura 8. Muestras de ADN extraídas de la parte posterior de la glándula sericígena de las nueve líneas no comerciales con el protocolo de Andy Brower (1998). Gel de agarosa 1%. Fotografía digital (cámara NIKON).	46
Figura 9. Ensayo de digestión positivo con la endonucleasa de restricción <i>MspI</i> , comparando líneas comerciales (Japonesas y Chinas) y no comerciales. Gel de Agarosa 1%. Fotografía digital (cámara NIKON)	46
Figura 10. Perfil parcial de 16 individuos de gusano de seda analizados con marcadores AFLP; se observa el patrón de bandas obtenido con el par de iniciadores de AFLP, <i>EcoRI</i> AGG y <i>MseI</i> CAC. La flecha indica el grado de homología entre las bandas de la línea Multilunar. Gel denaturalizante de poliacrilamida (6%).	47

- Figura 11. Dendograma de líneas comerciales de gusano de seda a partir de las cuatro combinaciones de iniciadores de AFLP *EcoRI* ACG/*Msel* CAA, *EcoRI* ACG/*Msel* CAC, *EcoRI* ACG/*Msel* CAT y *EcoRI* AGG/*Msel* CAC. Líneas japonesas: K10, K20 y SG3, y chinas: SC1, CA y CTS. 48
- Figura 12. Dendograma de subpoblaciones de líneas de gusano de seda a partir de las cuatro combinaciones de iniciadores de AFLP *EcoRI* ACG/*Msel* CAA, *EcoRI* ACG/*Msel* CAC, *EcoRI* ACG/*Msel* CAT y *EcoRI* AGG/*Msel* CAC. Los individuos aparecen con códigos según la línea y el número de individuo: no comerciales: ClsxK03 (1), Multilunar (2), Daizo (5), Transparente (6), Cebra (8), Capullo verde (12), Z (15), YP (16), YM (17), y comerciales K10, K20, SG3, SC1, CTS y CA. 53
- Figura 13. Dendograma de subpoblaciones de líneas no comerciales de gusano de seda a partir de las cuatro combinaciones de iniciadores de AFLP *EcoRI* ACG/*Msel* CAA, *EcoRI* ACG/*Msel* CAC, *EcoRI* ACG/*Msel* CAT y *EcoRI* AGG/*Msel* CAC. Los individuos aparecen con códigos según la línea y el número de individuo: ClsxK03 (1), Multilunar (2), Daizo (5), Transparente (6), Cebra (8), Capullo verde (12), Z (15), YP (16), YM (17). 54
- Figura 14. Dendograma de poblaciones de líneas de gusano de seda basado en la matriz de distancia de Nei a partir de las cuatro combinaciones de iniciadores *EcoRI* ACG/*Msel* CAA, *EcoRI* ACG/*Msel* CAC, *EcoRI* ACG/*Msel* CAT y *EcoRI* AGG/*Msel* CAC. Cada población corresponde a líneas no comerciales ClsxK03, Multilunar, Daizo, Transparente, Cebra, capullo verde, Z, YP y YM, y comerciales K10, K20, SG3, SC1, CTS y CA del gusano de seda. 55

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Protocolo de extracción de ADN genómico de insecto. Reportado por Andy Brower (1998) y desarrollado en el laboratorio de Rick Harrison en 1980, con contribuciones de Steve Bogdanowicz, Ben Normark, Bernie Crespi y Andy Brower.	62
Anexo B. Matriz de similaridad de líneas de gusano de seda. Generado por el programa NTSYSpc versión 2.02.	63
Anexo C. Dendograma de subpoblaciones de líneas de gusano de seda a partir del par de iniciadores de AFLP <i>EcoRI</i> ACG/ <i>MseI</i> CAA. Los individuos aparecen con códigos según la línea y el número de individuo: no comerciales: ClsxK03 (1), Multilunar (2), Daizo (5), Transparente (6), Cebra (8), Capullo verde (12), Z (15), YP (16), YM (17) y comerciales K10, K20, SG3, SC1, CTS y CA].	64
Anexo D. Dendograma de poblaciones de líneas de gusano de seda basado en la matriz de distancia de Nei (1978), a partir de la combinación de iniciadores <i>EcoRI</i> ACG/ <i>MseI</i> CAA. Este dendograma esta basado en la matriz de distancia de Nei (1978) usando el algoritmo UPGMA. Cada población corresponde a líneas no comerciales ClsxK03, Multilunar, Daizo, Transparente, Cebra, capullo verde, Z, YP y YM, y comerciales K10, K20, SG3, SC1, CTS y CA del gusano de seda.	65
Anexo E. Dendograma de subpoblaciones de líneas de gusano de seda, a partir del par de iniciadores de AFLP <i>EcoRI</i> ACG/ <i>MseI</i> CAC. Los individuos aparecen con códigos según la línea y el número de individuo: no comerciales: ClsxK03 (1), Multilunar (2), Daizo (5), Transparente (6), Cebra (8), Capullo verde (12), Z (15), YP (16), YM (17) y comerciales K10, K20, SG3, SC1, CTS y CA].	66
Anexo F. Dendograma de poblaciones de líneas de gusano de seda basado en la matriz de distancia de Nei (1978), a partir de la combinación de iniciadores <i>EcoRI</i> -ACG/ <i>MseI</i> CAC . Cada población corresponde a líneas no comerciales ClsxK03, Multilunar, Daizo, Transparente, Cebra, capullo verde, Z, YP y YM, y comerciales K10, K20, SG3, SC1, CTS y CA del gusano de seda.	67

- Anexo G. Dendograma de subpoblaciones de líneas de gusano de seda a partir del par de iniciadores de AFLP *EcoRI* ACG/*MseI* CAT. Los individuos aparecen con códigos según la línea y el número de individuo: no comerciales: ClsxK03 (1), Multilunar (2), Daizo (5), Transparente (6), Cebra (8), Capullo verde (12), Z (15), YP (16), YM (17) y comerciales K10, K20, SG3, SC1, CTS y CA]. 68
- Anexo H. Dendograma de poblaciones de líneas de gusano de seda basado en la matriz de distancia de Nei (1978), a partir de la combinación de iniciadores *EcoRI* ACG/ *MseI* CAT. Cada población corresponde a líneas no comerciales ClsxK03, Multilunar, Daizo, Transparente, Cebra, capullo verde, Z, YP y YM, y comerciales K10, K20, SG3, SC1, CTS y CA del gusano de seda. 69
- Anexo I. Dendograma de subpoblaciones de líneas de gusano de seda a partir del par de iniciadores de AFLP *EcoRI* ACG/*MseI* CAT. Los individuos aparecen con códigos según la línea y el número de individuo: no comerciales: ClsxK03 (1), Multilunar (2), Daizo (5), Transparente (6), Cebra (8), Capullo verde (12), Z (15), YP (16), YM (17) y comerciales K10, K20, SG3, SC1, CTS y CA]. 70
- Anexo J. Dendograma de poblaciones de líneas de gusano de seda basado en la matriz de distancia de Nei (1978), a partir de la combinación de iniciadores *EcoRI* AGG/ *MseI* CAC. Cada población corresponde a líneas no comerciales ClsxK03, Multilunar, Daizo, Transparente, Cebra, capullo verde, Z, YP y YM, y comerciales K10, K20, SG3, SC1, CTS y CA del gusano de seda. 71

GLOSARIO

BLASTOCINESIS: movimiento del embrión en el huevo como en ciertos insectos y cefalópodos.

DEVANABILIDAD: proceso por el cual se procesa el hilo de la seda, simbolizándose en porcentaje.

FIBROINA: proteína principal de las fibras de seda, producida a partir del fibroinógeno.

GLÁNDULA DE FILIPPI: glándulas de la seda, pares, accesorias, de las larvas de los lepidópteros.

HEMOLINFA: fluido del celoma de los insectos, que se considera equivalente a la sangre y a la linfa de las formas superiores.

INTEGUMENTO: Envoltura del cuerpo compuesta por uno o más tejidos que sirve para aislar y proteger el cuerpo del medio ambiente. Ejemplos son la cutícula y la piel.

MARCADOR CODOMINANTE: marcador que permite la identificación de alelos homólogos y permite registrar estados homocigotos y heterocigotos.

MARCADOR DOMINANTE: marcador que se registra como presencia (dominante) o ausencia (recesivo), y de esta manera no permite la identificación del genotipo heterocigoto (Aa).

MARCADORES MULTILOCUS: marcadores que exploran muchos loci en el genoma, como los RAPD (ADN Polimórfico Amplificados al Azar) y AFLP (Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados) entre otros.

MUSCARDINA: enfermedad del gusano de seda causada por hongos.

POLIMÓRFICO: presencia de más de un alelo para un locus dado en la población.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR): método por el cual un fragmento de ADN puede ser amplificado in vitro para producir millones de copias.

SERICINA: proteína adhesiva que es secretada por la división posterior de la glándula sericígena y que recubre la fibroína del filamento.

RESUMEN

Este estudio evalúa y compara la diversidad genética de 9 líneas no comerciales de gusano de seda pertenecientes al Centro de Desarrollo Tecnológico de la Sericultura (CDTS) mediante marcadores moleculares como AFLP. La muestra la componen 45 individuos de 9 líneas no comerciales (CIs x K03, Multilunar, Daizo, Transparente, Cebra, Capullo Verde, Z, YP, y YM) y 6 líneas comerciales (K10, K20, SG3, SC1, CTS y CA) utilizadas como muestra control para tener confiabilidad de los resultados. Los parámetros de diversidad genética muestra una gran diversidad de alelos en la población total que entre las líneas no comerciales y comerciales, aportando la mayoría de esta diversidad genética las líneas no comerciales. Los valores de similaridad y distancia genética evidencian un componente genético compartido entre las líneas de gusano de seda, sin presentar nodos definidos entre las líneas comerciales y no comerciales. Finalmente la variabilidad entre y dentro de las líneas, sugiere la existencia de un único y amplio **pool** de genes compartidos con separaciones genéticas limitadas entre grupos.

Palabras claves: líneas comerciales y no comerciales de gusano de seda, AFLP, CDTS, UPGMA, correlación cofenética (r), matriz de similaridad.

INTRODUCCIÓN

La sericultura es el conjunto de prácticas necesarias para la producción de capullos de seda, que combina la producción de huevos y cría de gusanos de seda con el cultivo de morera, para lograr la formación de capullos de gusanos de seda, *Bombyx mori* L.

Colombia cuenta con cerca de tres décadas de historia en sericultura, los cuales se dividen en dos etapas: evaluación del comportamiento de la morera y del gusano de seda, y el segundo, la consolidación de la producción serícola gracias al establecimiento de un Banco de germoplasma con híbridos de gusanos colombianos. Para mantener el desarrollo tecnológico y científico de este sector en Colombia, se crea el Centro de Desarrollo Tecnológico de la Sericultura (CDTS), ubicado en la granja “El píamo”, vereda la Honda, Municipio de Pereira y por lo tanto, sede principal de las actividades en sericultura del país. Esta granja que conserva el banco de germoplasma de *Bombyx mori* L., es la única que produce los híbridos de gusanos de seda que se crían y distribuyen en toda Colombia. Así mismo, esta corporación mixta sin ánimo de lucro, cumple con cuatro funciones básicas: investigación, transferencia de tecnología, promoción de la actividad y capacitación de sericultores.

Para la realización de estas actividades el CDTS ha buscado la cooperación de entidades como CENICAFE, CORPOICA y la Universidad Tecnológica de Pereira (UTP), entre otras, las cuales han facilitado sus instalaciones para desarrollar proyectos encaminados a mejorar la producción de seda en Colombia.

En un banco de germoplasma la variedad de individuos sirven como fuentes genéticas para mantener la variabilidad de la especie como un todo o para crear variación en nuevas líneas. Sin embargo, la restricción legal por los gobiernos de algunos países y la dificultad en el intercambio de fuentes genéticas, implican que este deba ser conformado por *fuentes propias*, por el aislamiento de líneas puras a partir de variedades híbridas, por los materiales promisorios y los híbridos desarrollados mediante mejoramiento genético. Lo que indica que el mantenimiento del banco de germoplasma contribuye con el desarrollo continuo de la sericultura en un país. Para lograr este propósito los marcadores moleculares han mostrado gran ventaja en relación a los morfológicos por caracterizar y evaluar a nivel de ADN las diferencias entre individuos.

De esta manera, el CDTS ha centrado sus esfuerzos en caracterizar a nivel molecular las líneas de gusano de seda que conforman su banco de germoplasma para determinar la variabilidad genética, generar perfiles de ADN únicos, evaluar su banco de germoplasma para seleccionar líneas promisorias y ampliar el número de líneas productivas. Por esto, la caracterización genética aunque es un paso preliminar es muy importante para establecer programas de mejoramiento genético.

La caracterización de estas líneas comerciales y no comerciales de gusano de seda con marcadores moleculares como los AFLP ha sido realizadas en el Centro de Biología Molecular y Biotecnología de la UTP. Los AFLPs fueron seleccionados por su capacidad de realizar un escrutinio de muchas regiones de ADN distribuidas al azar a lo largo del genoma, y su utilidad en proveer diferencias genéticas entre individuos y poblaciones.

Finalmente, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar a nivel molecular líneas no comerciales de gusano de seda con el propósito de generar información que permita realizar estudios de genética de poblaciones dada la carencia de información biológica y morfológica de estas líneas. Además, con estos resultados se espera contribuir al conocimiento preliminar de su diversidad genética, las relaciones genéticas entre las diferentes líneas y su identificación a nivel molecular.

1. MARCO TEORICO

1.1 CADENA PRODUCTIVA DE LA SERICULTURA EN COLOMBIA

La red andina de la seda¹ informa, que a partir del año 2.000 el proyecto de Sericultura en Colombia se viene desarrollando bajo el concepto de “cadena productiva”, en el cual se involucraron los cuatro sectores de la economía (Primario, Secundario, de Servicios y del Conocimiento). Este modelo se inicia con la producción de los híbridos (larvas) por parte del CDTs, único centro en Colombia que cuenta con Banco de Germoplasma de gusano de seda para la producción de híbridos. Esta entidad vende las larvas a los sericultores del país, quienes terminan el proceso de cría y obtienen el capullo fresco que lo venden a la planta industrial (SEDACOL) ó a los mismos grupos artesanales. Cuando el capullo es vendido a SEDACOL, esta industria produce hilo de seda que le vende también a los grupos artesanales para que estos produzcan tejidos que llegan al consumidor final. La producción de capullo en Colombia en el 2002 alcanzó las 34.9 toneladas, de las cuales el 82% fueron vendidas en forma oficial a la planta industrial de Pereira y el 18% fue dejado para uso artesanal en Risaralda, Caldas y Cauca.

En el sector primario de la cadena se encuentran más de 200 campesinos productores de capullo en cinco departamentos colombianos (Caldas, Risaralda, Cauca, Valle y Quindío), que cultivan la morera y producen la materia prima para la producción de hilos y prendas de seda. En el sector secundario se encuentran participando hoy en Colombia la ONG “Vida y Futuro” con su proyecto “Seda Natural de Colombia” - SEDACOL y un grupo de cerca de 400 artesanos de la seda en el Eje Cafetero, Cauca y Valle, que transforman los capullos en seda cruda, hilos y prendas. SEDACOL recibe las cosechas de capullos de los sericultores colombianos y transforma el capullo en hilo para las artesanas.

En el sector terciario, el CDTs con el respaldo de la Gobernación de Risaralda, Gobernación de Caldas, Ministerio de Agricultura y otras entidades brinda servicios de capacitación, asistencia técnica, transferencia de tecnología y suministro de híbridos (gusanos) para los sericultores del país. Y en el sector del conocimiento (cuaternario), igualmente el CDTs con la colaboración de su

¹Red Andina. redandina.com

Comité Técnico y Científico en donde ha participado CENICAFE, CORPOICA y las Universidades de Caldas, UTP y UNISARC ha generado la tecnología y el conocimiento suficiente y adecuado para el desarrollo de la sericultura en Colombia y para que esta pueda ser competitiva a todos los niveles. Es decir, que la tecnología y el conocimiento generado se transmite a través de los servicios de asistencia técnica y capacitación en forma directa a los sericultores y artesanos, los sericultores producen capullo para la industria y para los procesos artesanales y los artesanos a su vez obtienen productos para ser comercializados en los mercados internos y externos.

En el Departamento del Cauca, tanto sericultores como artesanos se encuentran agremiados en la Corporación para el Desarrollo de la Sericultura del Cauca – CORSEDA. Colombia tiene un potencial excelente e infinito para el desarrollo de la industria de la sericultura en el mundo, basado en las siguientes ventajas: condiciones agro-climáticas favorables, condiciones socioeconómicas y disponibilidad de recursos genéticos superiores.

Colombia es capaz de preservar sus propios recursos genéticos de gusano de seda y producir huevos libres de enfermedades. Así mismo la calidad del capullo de Colombia es reconocida como de óptima calidad, el peso y longitud del capullo alcanzan 2.2 a 2.5 gramos y 1500 m, dando como resultado un 30 % más de beneficio para los sericultores colombianos. El CDTS de Colombia tiene una capacidad instalada y técnica para la producción de un máximo de 35.000 cajas de huevos híbridos de gusanos de seda bivoltinos por año.

1.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL GUSANO DE SEDA *Bombyx mori* L.

Reino: Animalia
Phylum: Artrópoda
Subfilum : Hexápodo
Clase: Insecta
Orden: Lepidóptera
Superfamilia: Bombycoidea
Familia: Bombycidae
Género: *Bombyx*
Especie: *mori*

1.3 ESPECIES DE GUSANOS DE SEDA

Existen varias especies en la clase Insecta que producen fibras o sedas naturales, como se muestra en el Cuadro 1. De ellos, el gusano de seda,

Bombyx mori L. el cual se alimenta con morera (*Morus alba*) es el más importante y contribuye con más del 95% de la producción mundial de seda. El porcentaje restante lo producen especies silvestres, que no se alimentan de morera y que pertenecen a la familia Saturniidae. Por lo tanto, el término "seda" se refiere, en general, a la seda producida por las larvas que se alimentan de morera ².

Cuadro 1. Especies de gusano de seda que producen fibras naturales.

Familia	Nombre científico	Clase de comida	Voltinismo	Etapas de hibernación	Origen	Referencia
Bombycidae	<i>Bombyx mori</i>	Morera	Univoltino, bivoltino polivoltino	Huevo	China	Domesticado
	<i>Bombyx mandarina</i>	Morera	Bivoltino, polivoltino	Huevo	China, Japón	Silvestre
Saturniidae	<i>Antheraea pernyi</i>	Roble	Univoltino, bivoltino	Pupa	China, India	Capullo moreno
	<i>Antheraea yamamai</i>	Roble	Univoltino	Huevo	Japón	Capullo verde
	<i>Antheraea mylitta</i>	Terminalia	Univoltino, bivoltino polivoltino	Pupa	India	Capullo grande
	<i>Antheraea assama</i>	Magnolia	Polivoltino	-	India	Capullo dorado
	<i>Philosomia cynthia ricini</i>	Ricino(Eri)	Polivoltino	-	India	4 muda, 20 días

Fuente: Yoshitake, 1984

1.3.1 Características de razas de *bombyx mori* l. según el voltinismo. El carácter genético que determina el número de generaciones en un año bajo condiciones naturales, se denomina voltinismo. Según el carácter del gusano de seda, se presentan tres tipos de voltinismo (univoltino, bivoltino y polivoltino) ³:

² CIFUENTES CORREA, Cesar Augusto y WOOK SOHN, Kee. Manual técnico de la sericultura. Pereira: convenio Sena-CDTS, 1998. p.109.

³ Ibid., p. 113 -116.

1.3.1.1 Univoltino. Los gusanos univoltinos producen solamente una generación en un año bajo condiciones naturales. Estas variedades son adecuadas para regiones frías, su duración larval es larga y el cuerpo larval es grande en tamaño. El filamento del capullo es de muy buena calidad, pero estas razas no son apropiadas para condiciones de temperatura y humedad alta, debido a que no son resistentes a condiciones ambientales desfavorables.

1.3.1.2 Bivoltino. Los gusanos bivoltinos tienen dos generaciones bajo condiciones naturales y son adecuadas para regiones templadas. El período larval es corto comparado con la raza univoltina y las larvas son relativamente más resistentes a condiciones de temperatura y humedad alta. Aunque la calidad del capullo es inferior a la del univoltino.

1.3.1.3 Polivoltino. Los gusanos polivoltinos tienen varias generaciones y son aptas para regiones tropicales. Se caracterizan por presentar un periodo larval muy corto y larvas muy resistentes a condiciones adversas como a la temperatura alta. Sin embargo, su capullo es muy pequeño, con porcentaje y cantidad de seda cruda baja y filamento delgado (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de características según voltinismo del gusano de seda.

Carácter	Univoltino	Bivoltino	Multivoltino
Resistencia del gusano	Baja	Intermedia	Alta
Calidad del capullo	Buena	Intermedia	Mala

Fuente: Cifuentes y Wook, 1998.

1.3.2 Clasificación de razas de *Bombyx mori* L. según el origen geográfico. Diferentes climas y regiones produjeron diversas razas del gusano de seda con diferentes características, debido al aislamiento geográfico por muchos siglos. Según el origen geográfico, el gusano de seda es clasificado en razas Japonesa, China, Europea, Tropical y Coreana. Pero se destacan las características de las razas geográficas japonesa, china y tropical⁴.

1.3.2.1 Raza japonesa. Esta raza presenta tres marcas larvales; la ocular, la creciente y la estelar, las cuales en su conjunto son llamadas marcas normales. Generalmente las larvas de raza japonesa son fuertes y resistentes a un medio ambiente desfavorable, pero el periodo larval es comparativamente

⁴ Ibid., p. 111 -113.

largo. Estas razas forman capullos con cintura en forma de maní y color usualmente blanco, aunque en algunas razas son verdes o amarillos. Esta raza tiende a producir un mayor número de capullos dobles e hilos cortos y gruesos. El carácter univoltino y bivoltino se hacen presentes en este grupo.

1.3.2.2 Raza china. Las larvas de esta raza comen activamente hojas de morera y su crecimiento es comparativamente rápido y uniforme. La mayoría de estas razas no tienen las marcas larvales y no son muy sensibles a la temperatura y humedad alta y a la muscardina. La forma del capullo es ovalada (elíptica) o esférica, y el color del capullo es en general blanco, además presentan el color amarillo dorado, rosado y rojo. El filamento del capullo es delgado y largo con buena devanabilidad. Se encuentra univoltino, bivoltino y polivoltino en estas razas..

1.3.2.3 Raza tropical. Estas razas se originaron en India y el sudeste Asiático. Los huevos de estas razas son pequeños y livianos con corteza brillante. En este grupo son muy comunes las razas polivoltinas, las cuales producen huevos no hibernados. Las larvas son tolerantes a alta temperatura y humedad, y la duración larval es muy corta. El tamaño de las larvas es el más pequeño de las razas y producen capullos pequeños en forma elíptica con colores verde, amarillo o blanco. La corteza de los capullos es suelta y liviana, con mucha borra y filamento delgado. Estas razas producen poco capullos dobles, el porcentaje de seda es muy bajo.

1.4 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GUSANO DE SEDA, *Bombyx mori* L

1.4.1 Características biológicas y fisiológicas. El gusano de seda es monófago naturalmente, que se alimenta únicamente de la hoja de morera (*Morus alba*) durante la etapa larval. Además, es holometábolo presentando una metamorfosis completa desde huevo hasta la etapa de adulto. Su ciclo de vida dura alrededor de 50 a 55 días y presenta cuatro etapas bien definidas: huevo, larva, pupa o crisálida y polilla (Figura 1). Así mismo, su etapa larval comprende 5 edades o instares, en los que muda su cutícula anterior por una nueva más grande. El primer instar comprende desde el nacimiento de la larva hasta su primera muda. La larva del gusano de seda recién nacida es de color negro, con muchas setas o pelos y tiene una longitud de 3mm, en esta etapa solo se alimenta de hojas tiernas de morera. Después de 3 o 4 días le gusano de seda realiza su primera muda que dura 20 a 24 horas, alcanzando una longitud de 7 mm. Al iniciar su crecimiento comienza a cambiar rápidamente de color, y casi al final de su tercera edad el gusano de seda es blanco o tiene rayas grises y mide 25 mm. En la cuarta edad, se empieza a distinguir el macho de la hembra alcanzando una longitud de 40mm, sin embargo la hembra es más grande que el macho. En esta etapa se alimenta de todo tipo

de hojas de morera y su apetito es insaciable. Finalmente, el gusano de seda en el quinto instar ingiere mas o menos 88% de la morera y su longitud llega a 70mm con un peso de 4 o 5 gramos, aumentando su peso 10.000 veces durante los 23 a 25 días de su etapa larval.

Figura 1. Ciclo de vida del gusano de seda. Muestra el crecimiento del gusano de seda en su tamaño y duración larval para cada ínstar.

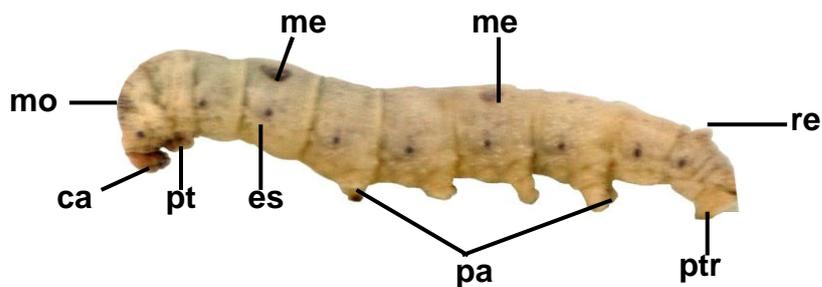


La glándula de seda crece rápidamente durante el quinto instar y finalmente alcanza cerca de un 40% del peso larval. Cuando el gusano está desarrollado completamente y deja de comer, el integumento larval se ve como transparente y comienza a buscar el lugar de encapullado. El gusano de esta etapa se llama gusano maduro, el cual empieza a formar capullos por más o menos dos días en 23 a 25°C. El capullo está conformado por 5 partes: la borra, la corteza, la pupa, el forro de la pupa y la piel del gusano, el filamento de seda de la corteza puede llegar hasta 800 a 1.400 m de longitud. Dentro del capullo de seda, el gusano hacen dos mudas para convertirse en crisálida o pupa, proceso que dura alrededor de dos días. La etapa de crisálida o pupa dura alrededor de 10 a 15 días dependiendo de la variedad y la temperatura, y finalmente se transforma en polilla. Las polillas copulan y la hembra pone más

o menos 500 huevos terminando su ciclo de vida. Los huevos recién puestos son de color amarillo, al cabo de un par de días empiezan a ponerse marrón claro y poco a poco se oscurecen.

1.4.2 Morfología general de la larva. La morfología exterior de la larva se observa claramente en el quinto instar, por el tamaño de la larva y sus caracteres distintivos. Al igual que otros insectos, el cuerpo de la larva está formado de cabeza, tórax y abdomen. Los tres segmentos seguidos a la cabeza conforman el tórax y la parte comprendida entre el cuarto y el décimo tercer segmento el abdomen (Figura 2). La cabeza está cubierta por quitina, la cual es un protector duro de color negro marrón, mientras que el tórax y el abdomen están cubiertos por la cutícula, la cual es más flexible⁵.

Figura 2. Morfología de la larva del gusano en el quinto instar. **Ca**: Cabeza, **es**: espiráculos, **me**: marca estelar, **mc**: marca creciente, **mo**: marca ocular, **pa**: patas abdominales, **pt**: patas torácicas, **ptr**: patas traseras, **rc**: remo caudal.



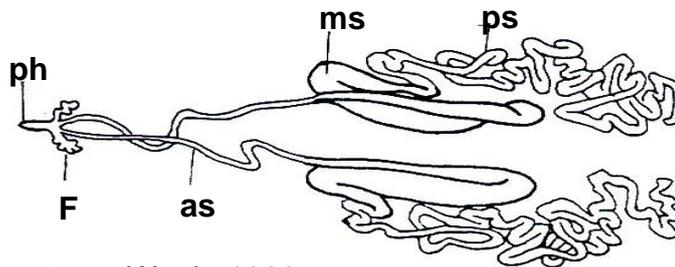
Entre cada segmento larval hay una membrana inter-segmental, la cual facilita el movimiento del gusano. Del primer al tercer segmento encontramos 3 pares de patas torácicas, del sexto al noveno segmento 4 pares de patas abdominales, y en el último segmento se encuentra una pata trasera. Las patas torácicas le sirven para sostener las hojas de morera durante la alimentación, mientras que las patas abdominales y las patas traseras sirven para el movimiento. Generalmente los gusanos comerciales que crían los sericultores tienen tres tipos de marcas larvales: marca ocular en el segundo segmento, marca creciente en el quinto segmento, y marca estelar en el octavo segmento. Hay otros tipos de marcas larvales como cebra, cebra negra y multilunar, que son controlados por otros tipos de genes. Aparte de las marcas larvales, existen otros mutantes morfológicos, tales como el integumento transparente, los colores del cuerpo y de hemolinfa, y las formas corporales diferentes⁶.

⁵ Ibid., p.146

⁶ Ibid., p.147

1.4.3 Morfología y fisiología de la glándula sericígena del gusano de seda. La larva del gusano de seda tiene un par de glándulas de seda, situadas en ambos lados ventrales del intestino medio y posterior, y se dividen en tres regiones diferentes: anterior, media y posterior (Figura 3). La región anterior está cerca de la cabeza, abierta al pezón hilador que es una parte del labio. Es un tubo estrecho abierto en la parte frontal que no secreta sustancia particular, sino que es el lugar donde el filamento de seda es formado con la ayuda de la glándula de Filippi. La región media es la más grande de las tres regiones y tienen tres divisiones bien definidas formando una figura en S. Esta región no es solamente un lugar de reserva para la maduración de la fibroína, sino que también secreta sericina, la proteína viscosa que encierra dos pares de fibroína para formar el filamento de seda. La región posterior de la glándula sericígena es muy larga con muchas curvas y secreta exclusivamente la fibroína, la proteína principal del hilo de seda que compone entre el 75 a 85% de la seda. La fibroína consta de varios aminoácidos, entre ellos glicina, alanina, serina y tirosina, son los componentes principales que ocupan el 90% de la fibroína⁷.

Figura 3. Estructura de la glándula sericígena en el quinto instar del gusano de seda. **as**: glándula anterior, **F**: glándula de Filippi, **ms**: glándula media, **ph**: pezón hilador, **ps**: glándula sericígena posterior.



Fuente : Cifuentes y Wook, 1998.

La glándula sericígena se deriva del ectodermo y se presenta 36 horas antes de la blastocinesis en la etapa embrionaria. Desde su aparición, realizan división celular por 60 horas, terminando la división 24 horas después de la blastocinesis. El número de células de las glándulas sericígenas es determinado en la etapa embrionaria llegando hasta aproximadamente 1000 células y difieren según la variedad de gusano, pero no difieren entre las glándulas derecha e izquierda, entre sexos ni según las condiciones de incubación o de cría. El número de células en un par de glándulas de seda es aproximadamente 600 en la región anterior, 500 en la región media y 1000 en la región posterior⁸.

⁷ Ibid., p.165-166

⁸ SHIMURA K. The physiology and biology of spinning in *Bombyx mori*, citado por CIFUENTES CORREA, Cesar Augusto y WOOK SOHN, Kee. Manual técnico de la sericultura. Pereira: convenio Sena-CDTS, 1998. p.167.

1.4.4 Características genéticas. El número total de cromosomas en *Bombyx mori* L. es 56 (2n), son holócentricos, altamente condensados con centrómeros difusos y no presentan características especiales que permitan identificarlos⁹.

El gusano de seda, *Bombyx mori* L. es un sistema modelo para estudios genéticos por su gran tamaño, facilidad de cría en el laboratorio y su importancia económica en la producción de seda. La glándula de la seda es el tejido más usado como modelo para estudiar la regulación génica y la diferenciación celular en el gusano de seda. La característica más importante de este tejido es su estructura simple, con una sucesión de áreas que comprenden un número fijo de células, cada una expresando un conjunto específico de genes que codifican proteínas de la seda¹⁰.

1.5 MARCADORES MOLECULARES

El análisis molecular de la variabilidad del ADN permite determinar puntos de referencia en los cromosomas, conocidos como "marcadores moleculares". Éstos últimos se definen como cualquier fenotipo molecular proveniente de un gen expresado o bien de un segmento específico de ADN correspondiente a regiones expresas o no del genoma. Estos marcadores pueden ser utilizados en diversas aplicaciones, tanto en estudios básicos de genética como en la práctica del mejoramiento, al generar perfiles moleculares característicos de cada individuo estudiado. Las ventajas que representan los marcadores moleculares en relación a los morfológicos se pueden resumir en cuatro aspectos: mayor nivel de polimorfismo para cada locus estudiado; neutralidad con respecto a efectos fenotípicos, con un nivel nulo o mínimo de interacciones entre locus (epistasia y pleiotropía); generalmente son codominantes (pueden distinguirse heterocigotos de los homocigotos); y pueden estudiarse en cualquier estadio de la especie¹¹. Además para maximizar su utilidad debe tener una buena distribución a lo largo del genoma, alto grado de polimorfismos y buena repetibilidad de los ensayos¹².

⁹ Nagaraju, J. Recent advances in molecular genetics of the silk moth, *Bombyx mori* [online]. India: Center for DNA fingerprinting and diagnostics, 1999 [cited 30 august 1999]. Disponible en internet: www.cdfd.org.in/jnagcs.html.

¹⁰ Ibid., Disponible en internet: www.cdfd.org.in/jnagcs.html.

¹¹ RAMIREZ, Hernando. Biotecnología I. Palmira: Universidad Nacional de Colombia, 2000.

¹² CHENG, H.H. and CRITTENDEN, L.B. Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken, citado por ARANGUREN MENDEZ, José Atilio. Caracterización y relaciones filogenéticas de cinco razas asnales españolas en peligro de extinción mediante la utilización de marcadores microsatélites: su importancia en los programas de conservación. Bellaterra, 2002, p.20. Trabajo de grado de (Doctor en Veterinaria). Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria.

1.5.1 Longitud de Fragmentos de Restricción Polimórficos (RFLP). Es una de las primeras técnicas descritas y consiste en detectar las diferencias en la secuencia del ADN de diferentes individuos, basándose en el uso de enzimas de restricción que cortan el ADN en sitios donde se encuentra una secuencia específica de nucleótidos. La identificación de los fragmentos requiere del uso de geles de electroforesis que permitan separar los fragmentos de diferentes tamaños y transferirlos a una membrana de nitrocelulosa (o nylon) por capilaridad o vacío a través de un proceso denominado **Southern Blotting**. La técnica de RFLP produce marcadores codominantes, permitiendo detectar estados alélicos, es decir el genotipo heterocigoto del homocigoto. La limitación de esta técnica es que identifica pocos loci, por lo que la variabilidad obtenida es reducida¹³.

1.5.2 ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD). La técnica involucra la amplificación de un ADN molde con iniciadores cortos (alrededor de 10 pb) de secuencia aleatoria pero con un mínimo contenido de guanina y citosina de 50%. La amplificación con estos iniciadores se caracteriza por temperaturas de alineamiento bajas de 37 a 40°C, que generan una serie de fragmentos de diferente tamaño a partir del ADN molde. Los fragmentos amplificados, pueden ser separados en geles de poliacrilamida o agarosa, y visualizados por tinción con nitrato de plata o bromuro de etidio respectivamente¹⁴.

Esta técnica requiere un ADN de óptima calidad, libre de proteínas, polisacáridos o compuestos fenólicos que disminuyan la actividad de la *Taq polimerasa*. La principal limitación de los ensayos RAPD es la baja repetibilidad de los análisis, así mismo, dado que es un marcador de tipo dominante, no discrimina la existencia de heterocigotos¹⁵.

1.5.3 Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP). El análisis de AFLP representa la tecnología más reciente para la obtención de un gran número de marcadores moleculares en genomas procariotes y eucariotes. Es una técnica de análisis molecular multilocus de tipo dominante que combina la especificidad de las endonucleasas de restricción con la velocidad y practicidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La técnica involucra cinco pasos (Figura 4), digestión del ADN con dos enzimas de restricción, ligación de adaptadores específicos, amplificación pre-selectiva de los fragmentos de restricción, amplificación selectiva y separación de los fragmentos de ADN mediante electroforesis en gel de poliacrilamida¹⁶.

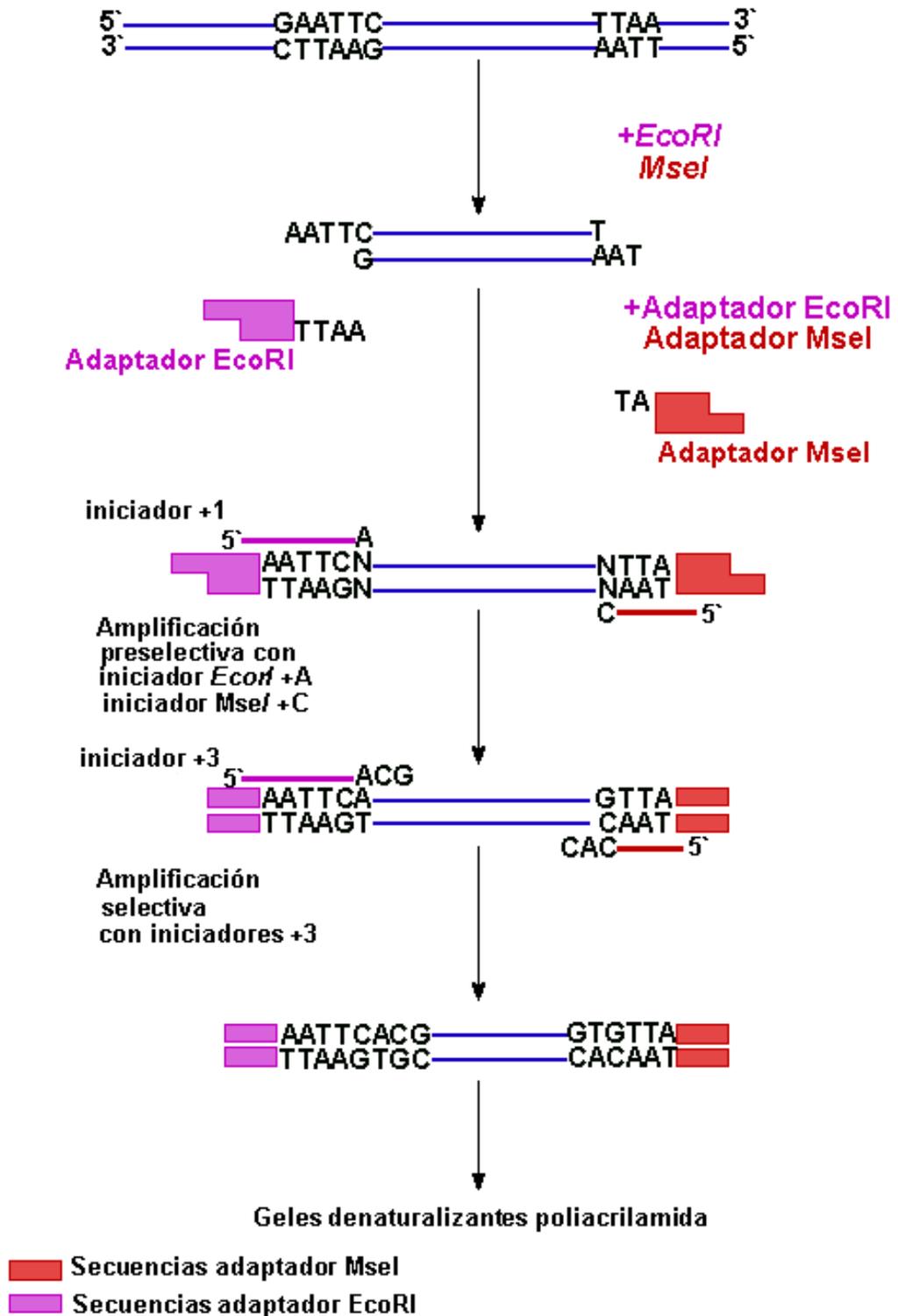
¹³ Ibid., p. 20

¹⁴ RAMIREZ, Op. cit.

¹⁵ ARANGUREN, Op. cit., p.20-21.

¹⁶ VOS, Pieter *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. En: nucleic Acids Research. Vol. 23, No. 21. (1995); p. 4407-4414

Figura 4. Ilustración de la técnica de AFLP.



1.5.3.1 Digestión del ADN con dos endonucleasas de restricción. El ADN es digerido por dos endonucleasas de restricción *EcoRI* con un sitio de reconocimiento de seis pares de bases (G[↓]AATTC) y *MseI* con un sitio de reconocimiento de cuatro pares de bases (T[↓]TAA). En la digestión con *EcoRI* (corte raro) y *MseI* (corte frecuente) se obtienen tres clases de fragmentos de restricción: fragmentos grandes *EcoRI-EcoRI*, fragmentos pequeños *MseI-MseI* y fragmentos de tamaño intermedio *EcoRI-MseI* que serán amplificados de manera eficiente por la *Taq polimerasa*. Por lo tanto estas enzimas generan fragmentos de ADN de un rango de tamaño óptimo (< 1 Kb) y extremos cohesivos requeridos para la ligación de adaptadores específicos¹⁷.

1.5.3.2 Adaptadores e iniciadores de AFLP. La amplificación de los fragmentos de restricción se logra por la unión de adaptadores específicos de doble hebra que poseen terminales complementarios a los extremos de los sitios de restricción resultantes de la digestión con las endonucleasas. Por ejemplo, los adaptadores *EcoRI* específicos se unen a los extremos cohesivos producidos por la *EcoRI*, mientras que los adaptadores *MseI* se unen específicamente a los extremos resultantes del corte con la enzima *MseI*. Las secuencias de los adaptadores que flanquean las secuencias de ADN genómico sirven como un sitio de enlace para el alineamiento de los iniciadores de AFLP. Usando esta estrategia, es posible amplificar muchos fragmentos de ADN sin tener conocimiento de la secuencia¹⁸. Los adaptadores de AFLP consisten de una secuencia central y una secuencia específica de la enzima¹⁹. La estructura del adaptador de *EcoRI* es:

5-CTCGTAGACTGCGTACC
CATCTGACGCATGGTTAA-5

La estructura del adaptador de *MseI* es:

5-GACGATGAGTCCTGAG
TACTCAGGACTCAT-5

Los iniciadores utilizados en la PCR consisten de una secuencia específica de 20 a 25 nucleótidos complementarios a la secuencia de los adaptadores, y de 1 a 3 nucleótidos adicionales de secuencia arbitraria en su extremo 3' que pueden mostrar mayor o menor nivel de polimorfismo para un organismo determinado²⁰.

¹⁷ Ibid., p. 4406.

¹⁸ Ibid., p. 4407.

¹⁹ Ibid., p.4408.

²⁰ Ibid., p. 4410.

La estructura de los iniciadores de AFLP consiste de tres partes, una secuencia central (NÚCLEO), una secuencia específica de la enzima (ENZ) y una extensión selectiva (EXT).

	NUCLEO	ENZ	EXT
EcoRI	5-GACTGCGTACC	AATTC	N-3
MseI	5-GATGAGTCCTGAG	TAA	N-3

1.5.3.3 Reacciones de amplificación. La selección de los fragmentos que serán amplificados se realiza en dos etapas consecutivas. En la primera reacción llamada preamplificación, el ADN molde es amplificado con iniciadores de AFLP que contienen sólo un nucleótido selectivo adicional. En una segunda etapa de mayor intensidad de selección, el producto de PCR de la reacción de preamplificación es diluido y usado como molde para la amplificación selectiva, con iniciadores de AFLP que poseen en su extremo 3' tres nucleótidos selectivos adicionales. Así, solamente los fragmentos de restricción que tengan secuencias flanqueadoras complementarias a los tres nucleótidos selectivos de los iniciadores de AFLP serán amplificados.

Típicamente, 50 a 100 fragmentos de restricción son coamplificados en cada reacción de AFLP y visualizados en un gel denaturalizante de poliacrilamida. Así, el perfil molecular obtenido de los individuos analizados permite identificar polimorfismos de ADN entre individuos, poblaciones y especies, por las diferencias en el modelo de bandas. Aunque esta técnica analiza simultáneamente varios loci no permite diferenciar el estado homocigoto del heterocigoto por ser un marcador de tipo dominante.

1.6 MARCADORES MOLECULARES EN GUSANO DE SEDA, *Bombyx mori* L.

Los estudios con marcadores moleculares han permitido obtener perfiles moleculares característicos de las diferentes líneas de gusano de seda estudiadas. Entre estos, la prueba minisatélite, **Banded Krait Minor satellite DNA-derived probe** (Bkm) permitió caracterizar 13 líneas del gusano de seda, seis bivoltinas (Hu₂₀₄, KA, NB₁, NB₇, NB_{4D2} y NB₁₈) y siete polivoltinas (C. Nichi, Gungnong, Moria, Nistari, Pure Mysore, Diazo y Sarupat). Este estudio generó bandas específicas para las variedades bivoltinas y polivoltinas, además reveló alto grado de relación genética entre las líneas NB_{4D2} y NB₁₈²¹. Estudios posteriores con RAPD en estas líneas, permitieron amplificar 13 genotipos con 40 iniciadores de secuencia aleatoria originando 216 productos

²¹NAGARAJU, Javaregowda *et al.* DNA fingerprinting in silkworm, *Bombyx mori*, using banded krait minor satellite DNA-derived probe. *En*: Electrophoresis. No.16. (1995); p.1639-1642.

amplificados. Finalmente, los resultados mostraron dos nodos definidos, uno con seis genotipos bivoltinos y otro con siete genotipos polivoltinos²². Así mismo, se usaron técnicas como RFLP y tres técnicas basadas en PCR: RAPD, ISSR-PCR (Repeticiones de Secuencia Inter-Simple) y SSR (Secuencias Simples Repetidas) para determinar el porcentaje de polimorfismo detectado con cada una. Así, RFLP produjo 180 bandas de las cuales 97% son polimórficas, SSR 15 loci de los cuales el 86% son polimórficos, SSR-PCR 39 fragmentos de los cuales el 76.98% son polimórficos y RAPD generó 74.4% de fragmentos polimórficos. Indicando que ISSR-PCR (0.957) revela alto grado de diversidad y RAPD (0.744) baja diversidad. Las pruebas de RAPD, ISSR-PCR y RFLP claramente separan las variedades bivoltinas y polivoltinas del gusano de seda²³.

Estudios recientes reportan la caracterización molecular de 23 líneas (12 líneas de origen japonés y 11 líneas de origen chino) de gusano de seda *Bombyx mori* L. con el marcador molecular AFLP, revelando dos grupos definidos que corresponden a las líneas de origen japonés y chino. Además., el análisis de la estructura poblacional evidenció que aunque las dos variedades no son muy diferentes entre sí, existe diferenciación genética en la población ²⁴.

1.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Existe una gran diversidad de estadísticos para cuantificar la variabilidad genética y resumir la información a términos más manejables. Los estadísticos más empleados son: porcentaje de loci polimórficos, heterocigosidad insesgada, similaridad genética, distancia genética y estructura poblacional. Sin embargo, para el análisis de datos obtenidos con marcadores dominantes tales como AFLP, Lynch y Milligan²⁵ desarrollaron la teoría general para estimar parámetros insesgados de genética de poblaciones con un ajuste estadístico que se limita al análisis de aquellos loci con una frecuencia menor a $1-(3/N)$, es decir bandas que su frecuencia sea 0.94 para $N = 50$.

²² NAGARAJA, Ganachari M. and NAGARAJU, Javaregowda. Genome Fingerprinting of the silkworm, *Bombyx mori*, using random arbitrary primers. En : Electrophoresis. No.16. (1995); p.1633-1638

²³ NAGARAJU, J. *et al.* Comparison of multilocus RFLPs and PCR-based marker systems for genetic analysis of the silkworm, *Bombyx mori*. En : Heredity 86. (jan 2001); p.588-597.

²⁴ ALEGRIA SOTO, Alvaro Hernan, *et al.* Caracterización molecular de líneas de *Bombyx mori* mediante AFLP. En : Socolen, 2004.

²⁵ LYNCH, M. and MILLIGAN, B. G. Analysis of Population Genetic Structure with RAPD Markers. En: Molecular Ecology. No. 3. (1994); p.93.

El análisis con el criterio Lynch y Milligan tiene los siguientes supuestos: la interpretación del patrón de bandas en los geles se realiza de manera inequívoca y cada locus es tratado como un sistema de dos alelos, ausencia (alelo recesivo) y presencia (alelo dominante) de bandas.

1.7.1 Diversidad genética. El estimador insesgado de diversidad genética es,

$$\hat{H}_j(i) = 2\hat{q}(i)[1 - \hat{q}_j(i)] + 2\text{Var}[\hat{q}_j(i)]$$

la probabilidad que dos genes, aleatoriamente escogidos de la población j , difieran en el locus i -ésimo. Esta medida es equivalente a la heterocigosidad que representa un mejor estimador de la variación genética, ya que es precisa. Para el análisis de marcadores dominantes, se define como la probabilidad de que un par de alelos escogidos al azar contengan un marcador y un nulo ²⁶.

El promedio sobre todos los loci observados L , la media de la diversidad genética observada en la población j -ésimo es ,

$$\hat{H}_j = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^L \hat{H}_j(i)$$

Además de la heterocigosidad, existe otro parámetro para cuantificar la diversidad genética y es el porcentaje de loci polimórficos. Un locus se considera polimórfico si el alelo más común presenta una frecuencia menor al 95% en la población bajo estudio²⁷, estos parámetros son obtenidos del programa TFPGA versión 1.3 (**Tools for Population Genetic Analyses**)²⁸.

1.7.2 Matriz de similaridad genética. La cuantificación de similaridad o diferencias entre individuos de las líneas de gusano de seda analizadas se calculó con el coeficiente de Dice²⁹, proporcionado por el programa por el programa estadístico NTSYSpc versión 2.02 (**Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System**)³⁰.

²⁶ Ibid., 94

²⁷ ARANGUREN, Op. cit., 32.

²⁸ MILLER, M.P. Tools for population genetic analysis (TFPGA) [programa de computador en línea] versión 1.3. [Arizona]: Northern Arizona University, Department of Biological Sciences. [1 february 2000]. Disponible en internet: <http://herb.bio.nau.edu/~miller>.

²⁹ NEI, Masatoshi and LI, Wen-Hsiung. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. En: Genetics. Vol. 76, No. 10. (oct 1979); p. 5260-5273.

³⁰ ROHLF, F.J. NTSYSpc: numerical taxonomy and multivariable [programa de computador en disco] versión. New York: Exeter Software.

Comúnmente el coeficiente de similaridad se considera como un “descriptor” de bandas compartidas. Así el coeficiente de Dice mide la proporción de bandas compartidas en ambas muestras dividida por el promedio de bandas presentes en cada muestra y calculado de la siguiente manera,

$$Dice = \frac{2a}{(2a + b + c)}$$

1.7.3 Métodos de agrupamiento. Las matrices de distancia genética entre poblaciones puede ser convertida en un dendograma utilizando el método de agrupamiento medio usando promedios aritméticos UPGMA (**Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages**) o los “vecinos más cercanos” (**Neighbour Joining**), el criterio de selección entre estos dependerá del valor de correlación cofenética suministrado por el programa estadístico NTSYSpc versión 2.02.

1.7.4 Distancia genética. El dendograma de distancia genética esta basado en la matriz de distancia de Nei³¹, proporcionado por el programa TFGA versión 1.3. Esta medida de distancia entre poblaciones³², D_{jk} , provee una estimación del número medio de mutaciones que separan los genes de dos poblaciones.

El estimador insesgado \hat{D}_{jk} esta dado por,

$$\hat{D}_{jk} = -\ln\left(\frac{\hat{J}_{jk}}{\sqrt{\hat{J}_j \hat{J}_k}}\right) - \frac{Var(\hat{H}_{jk})}{2j_{jk}^2} + \frac{Var(\hat{H}_j)}{4j_j^2} + \frac{Var(\hat{H}_k)}{4j_k^2}$$

donde $J_j = 1 - H_j$ es la identidad génica dentro de la población j , y $\hat{J}_{jk} = 1 - \hat{H}_{jk}$ es la identidad génica entre las poblaciones j y k .

1.7.5 Estructura de poblaciones. Este análisis, determina entre los diferentes grupos, cuales presentan mayores diferencias. Se utiliza el programa AMOVA-PREP para generar matrices de distancia con base en el coeficiente de DICE y para crear archivos de distancia, grupo y población. Este programa fue diseñado para automatizar los procesos de preparación de archivos de salida que van a ser usados por AMOVA.

³¹ Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. En : American Naturalist: (1972); p. 283-292.

³²LYNCH AND MILLIGAN, Op. cit., 96.

La diferenciación o estructura de la población se mide por el siguiente parámetro,

$$Gst = (H_T - H_S) / H_T$$

Donde H_s representa la diversidad genética dentro de la subpoblación y H_T se define como la heterocigosidad media esperada por locus en la población total. Por otra parte el valor de flujo génico (Nm) suministrado por el programa POPGENE versión 1.32, permite determinar hasta qué punto cada población local de una especie, es una unidad evolutiva independiente.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Las nueve líneas no comerciales de gusano de seda caracterizadas genéticamente con AFLP, fueron suministradas por el banco de germoplasma del Centro de Desarrollo Tecnológico de la Sericultura (CDTS). Para la caracterización de las nueve líneas de gusano de seda (Cls x K03, Multilunar, Daizo, Transparente, Cebra, Capullo Verde, Z, YP, y YM) (Figura 5) se analizaron cinco larvas por línea para un total de 45 individuos. Cabe destacar que estas líneas no poseen información genealógica, biológica, ni características cuantitativas y cualitativas de producción. Así mismo, se analizaron seis líneas comerciales de gusano de seda, 3 de origen japonés (K10, K20 y SG3) y 3 de origen chino (SC1, CTS, CA), suministradas por el C.D.T.S. por ser representativas en el dendograma obtenido de su caracterización molecular llevada a cabo en el Centro de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad Tecnológica de Pereira (Figura 6). Estas líneas se consideraron como población control para tener confiabilidad de los resultados obtenidos. Así, finalmente la población de estudio comprendió un total de 51 individuos designados con códigos como se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2. Códigos asignados a cada una de las líneas de gusano de seda utilizadas para el análisis con marcadores AFLP.

Líneas	Origen Geográfico	Muestra	Líneas
No Comerciales	DESCONOCIDO	1	Cls x K03
		2	Multilunar
		5	Daizo
		6	Transparente
		8	Cebra
		12	Capullo Verde
		15	Z
		16	YP
		17	YM
Comerciales	JAPONESAS	10.1	K10
		10.2	K20
		10.3	SG3
	CHINAS	11.1	SC1
		11.2	CTS
		11.3	CA

Figura 5. Larvas de líneas no comerciales de Gusanos de Seda *Bombyx mori* L. Fotografía digital (cámara NIKON).

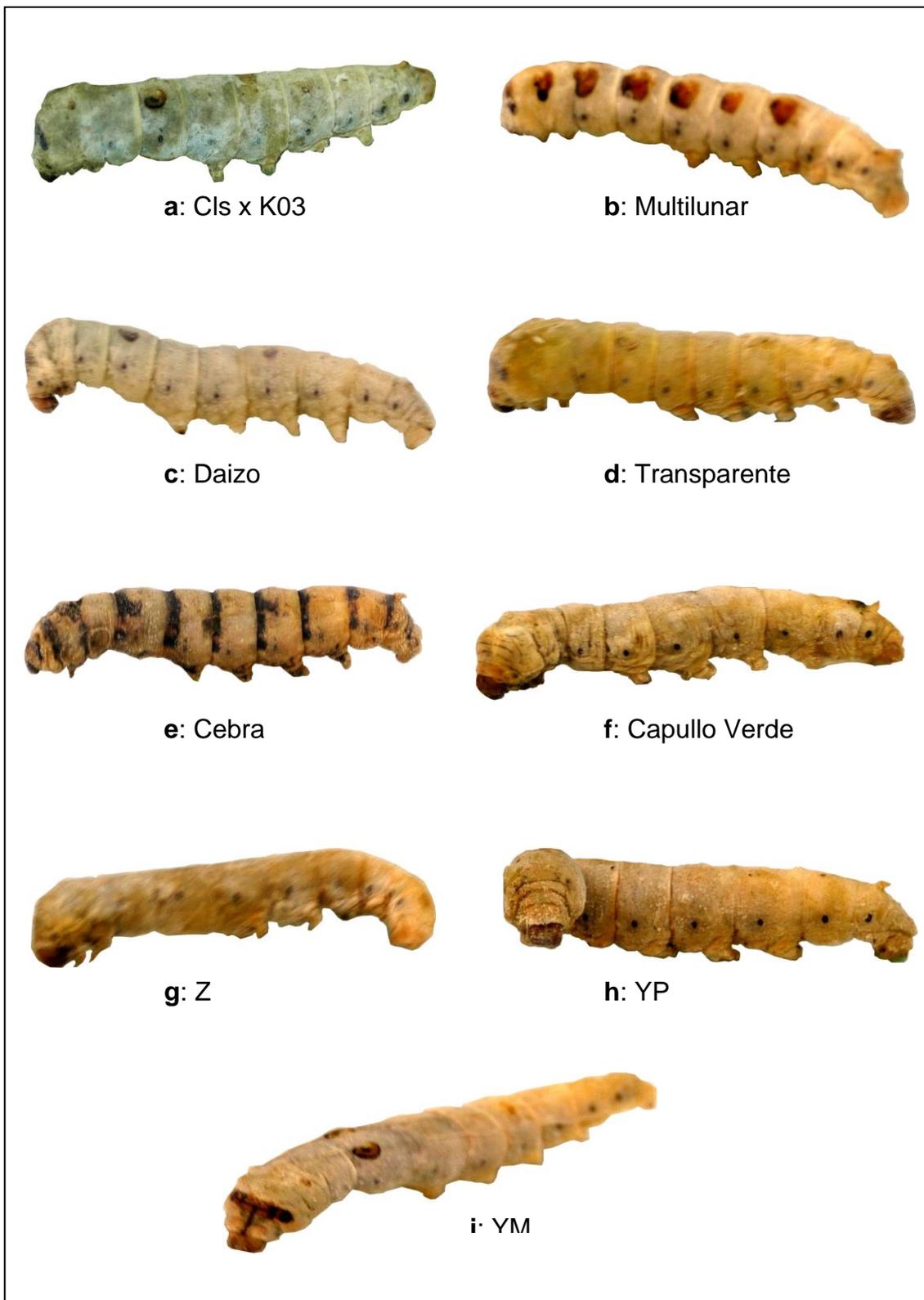
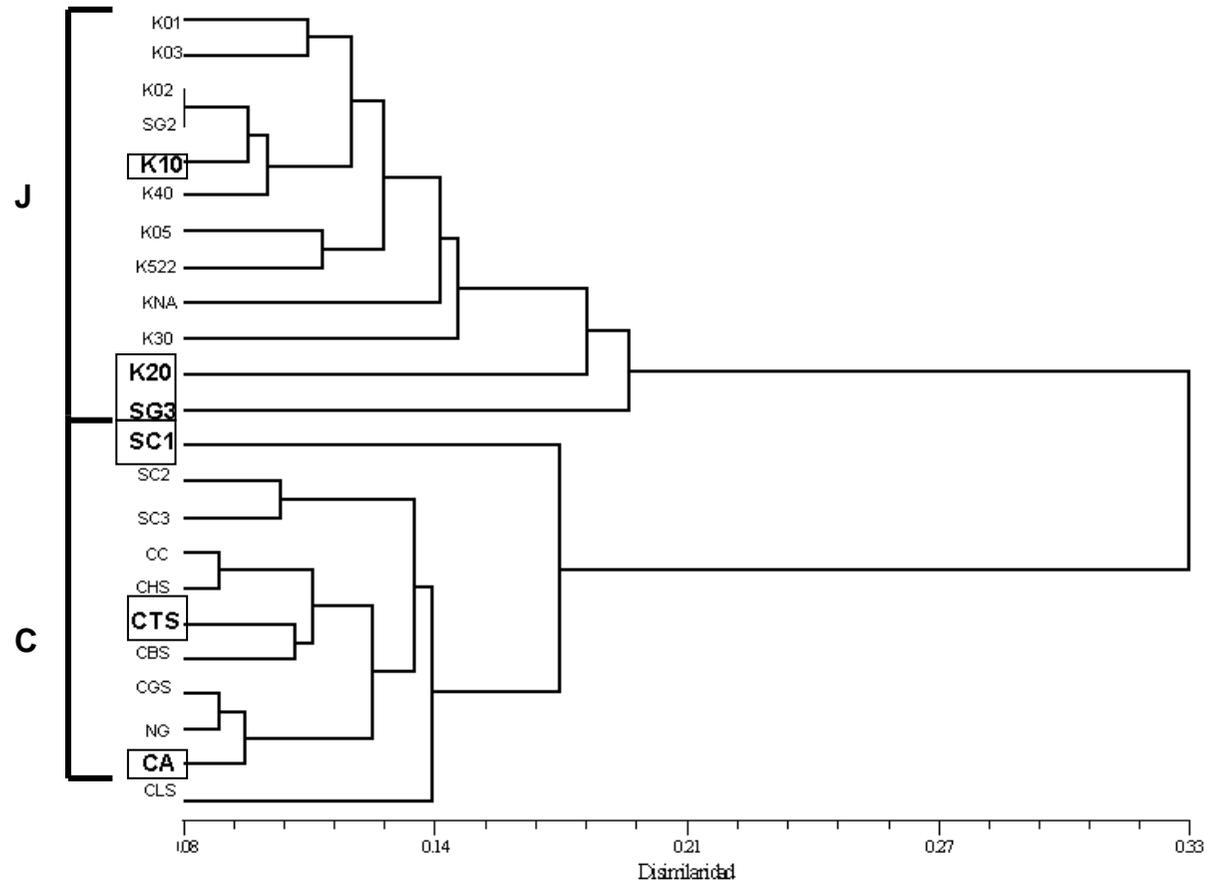


Figura 6. Dendrograma de líneas comerciales de gusano de seda (*Bombyx mori*) de origen japonés (J) y chino (C). Los recuadros muestran las líneas seleccionadas como control para el presente estudio.



Fuente: Alegría et al., 2004.

2.2. EXTRACCIÓN DE ADN

Para la extracción de ADN de las 45 larvas de gusano de seda a partir de la glándula sericígena se realizó una disección de los gusanos para extraer el tejido con sus partes (anterior, media y posterior) y extraer el ADN con el protocolo de Andy Brower, 1998 (Anexo A).

2.3 ESPECTROFOTOMETRÍA

La concentración de ADN de las muestras extraídas se determinó con la medida de absorbancia a 260nm utilizando un espectrofotómetro de luz visible (UV-1601, UV-Visible **Spectrophotometer** SHIMADZU) y aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Abs.260nm} \times \text{factor de dilución de la muestra (1:50)} \times 50\mu\text{g/mL}$$

Una absorbancia de 1 corresponde a 50 $\mu\text{g/mL}$ para un ADN de doble cadena.

2.4 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA PARA EL CONTROL DE CALIDAD DEL ADN

Para preparar el gel de agarosa 0.8%, se disuelve 0.4 g de agarosa en 50 mL de TBE 1X aplicando calor. Posteriormente se adiciona 1 μL de bromuro de etidio y se deja solidificar en el molde de la cámara de electroforesis.

Antes de servir las muestras de ADN en el gel, se adiciona a cada una 2 μL de **buffer** de carga para un volumen total de 7 μL . Las muestras se sirvieron en el gel sumergido en TBE 1X y se dejaron correr por 15 minutos a 70 voltios en la cámara de electroforesis horizontal (BIO-RAD Mini-Sub Cell GT).

2.5 POLIMORFISMO DE LONGITUD DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLP)

Las líneas de gusano de seda antes mencionadas fueron analizadas con el Sistema de Análisis de AFLP I (**AFLP Analysis System, AFLP Starter Primer Kit, GIBCOBRL®**) siguiendo el protocolo descrito en este manual. Este sistema de análisis de AFLP ha sido diseñado para genomas que se encuentren en un rango de 5×10^8 a 6×10^9 pb. La técnica involucra cinco pasos: digestión de ADN con endonucleasas de restricción, ligación de adaptadores

de secuencia específica, amplificación pre-selectiva, amplificación selectiva y separación electroforética de los fragmentos amplificados.

2.5.1 Digestión con endonucleasas de restricción. El ADN extraído fue digerido con dos endonucleasas de restricción simultáneamente (*EcoRI* y *MseI*). La reacción se llevó a cabo con 9 μL de ADN muestra a una concentración de 150 ng, 2,5 μL de **buffer** de reacción 5X [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM de Acetato de Magnesio, 250 mM Acetato de potasio], y 1 μL de *EcoRI/MseI*. La mezcla de la reacción se incubó 2 horas a 37°C y luego 15 minutos a 70°C para inactivar las endonucleasas de restricción.

2.5.2 Ligación de adaptadores. El ADN digerido se liga con adaptadores de secuencia específica correspondiente a *EcoRI* y *MseI*. Al ADN digerido se le adicionan 12 μL de solución de unión de adaptadores [adaptadores *EcoRI/MseI*, 0.4 mM ATP, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM Acetato de Magnesio, 50 mM Acetato de Potasio] y 0,5 μL de T4 ADN Ligasa. La mezcla se incubó a 20°C \pm 2°C por 2 horas, posteriormente se realiza una dilución 1:10.

2.5.3 Amplificación pre-selectiva. En este paso, los iniciadores de AFLP *EcoRI* y *MseI* contienen un nucleótido selectivo. Esta reacción se llevó a cabo adicionando 2,5 μL de ADN molde diluido (1:10), 20 μL del iniciador de preamplificación, 2,5 μL de **buffer** 10X con Magnesio [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 15 mM MgCl_2 , 500 mM KCl] y 0,5 μL *Taq polimerasa* (5 unit/ μL). La amplificación se realiza en 20 ciclos durante 30s a 94°C, 60s a 56°C y 60s a 72°C utilizando un termociclador (Perkin-Elmer 9700). El producto de PCR se diluye 1:5.

2.5.4 Amplificación Selectiva. En este paso, los iniciadores de AFLP *EcoRI* y *MseI* contienen tres nucleótidos selectivos. Así, las cuatro pares de iniciadores recomendadas por ser las más polimórficas en la caracterización genética de 23 líneas comerciales de gusano de seda *Bombyx mori* L. fueron:

- *EcoRI* ACG - *MseI* CAA
- *EcoRI* ACG - *MseI* CAC
- *EcoRI* ACG - *MseI* CAT
- *EcoRI* AGG - *MseI* CAC

Para la amplificación selectiva se prepararon dos soluciones por separado. La solución 1 contiene 0,5 μL de Primer *EcoRI* y 4,5 μL Primer *MseI* (contiene dNTPs). La solución 2 contiene 7,9 μL de agua destilada, 2 μL de **buffer** 10X con Mg y 0,1 μL de *Taq polimerasa* ADN, suficientes para una reacción de AFLP. Esta reacción se llevó a cabo adicionando 5 μL de ADN diluido (1:5),

5 μL de la Solución 1 y 10 μL de la Solución 2 para un volumen total de 20 μL . La amplificación se realiza en 36 ciclos de PCR con el siguiente programa de temperaturas: un ciclo a 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos y 72°C por 60 segundos. La temperatura de alineamiento baja 0.7°C durante 12 ciclos y finalmente se realizan 23 ciclos: 30s a 94 °C, 30s a 56°C y 60s a 72°C.

2.5.5 Separación de los fragmentos de ADN mediante electroforesis de gel denaturalizante de poliacrilamida. Para preparar el gel denaturalizante de poliacrilamida 6% se disuelve 31,23 g de Urea, 5,7 g de Acrilamida, 0,195 g de Bis-acrilamida con 3,25 mL de TBE 20X en 65 mL de TBE 1X aplicando calor y para lograr el proceso de polimerización se adiciona 325 μL de Persulfato de Amonio (APS 10%) y 32,5 μL de TEMED.

El gel polimerizado se coloca en la cámara de electroforesis vertical (HOEFER SQ3 sequencer) y se adiciona TBE 1X hasta sumergirlo completamente. Antes de servir las muestras de ADN en el gel, se adiciona 10 μL de solución de parada y se desnaturalizan a una temperatura de 95°C durante 2 minutos. Se sirven 5 μL de la muestra y se corren a una potencia de 87W con una temperatura de 55°C.

Para visualizar los fragmentos de ADN separados en el gel se realiza una tinción con plata siguiendo el protocolo descrito en el Sistema de Secuenciamiento de DNA (Promega, TM 023)

2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis del gel se llevó a cabo de manera visual señalando las bandas intensas y claramente definidas. Así mismo, las bandas se registran en una matriz binaria como un sistema de dos alelos, es decir, presencia o ausencia de bandas de 1 y 0, respectivamente. Sin embargo, el análisis estadístico se restringe a aquellas bandas con una frecuencia menor a $1-(3/N)$ según el criterio de Lynch y Milligan (1994) por medio de paquetes estadísticos.

2.6.1 Diversidad Genética. La diversidad genética se evaluó a través de la heterocigosidad y porcentaje de loci polimórficos. Estos parámetros fueron estimados a partir de la matriz de datos usando la expansión de Taylor suministrada por el programa estadístico TFPGA versión 1.3.

2.6.2 Matriz de similaridad genética. Para estudiar el conjunto de individuos se partió de la definición de similaridad de Nei-Li (1979), también conocida como similaridad de DICE.

El coeficiente de DICE omite la consideración de pares negativos (0-0) y da doble peso a los pares positivos (1-1), lo que lo hace muy útil en términos de similaridad a nivel del ADN, en la que la ausencia compartida de una banda no es necesariamente una indicación de similaridad entre dos aislamientos. La matriz de similaridad se construyó con el programa SIMQUAL del paquete NTSYSpc versión 2.02, para determinar la asociación genética de las líneas del gusano de seda.

2.6.3 Análisis de agrupamiento. A partir de la matriz de similaridad se construyó un agrupamiento con el programa SAHN de NTSYS-pc. El método utilizado fue el de unión media UPGMA que es el más usado y el que produce menor distorsión al compararse con la matriz original de similaridad. A partir de las matrices se construyeron dendogramas de subpoblaciones (Anexo C, E, G, I) con el programa TREE de NTSYS-pc. Sin embargo, para este análisis se tuvo en cuenta únicamente el dendograma de subpoblaciones generado a partir de la matriz de similaridad de los datos corregidos según el criterio de Lynch y Milligan.

2.6.4 Distancia Genética. La matriz de distancia genética de Nei obtenida a partir de cada una de las combinaciones de iniciadores, se representó en dendogramas de poblaciones (Anexo D, F, H, J) por medio del programa TFPGA versión 1.3. Del mismo modo, se generó un dendograma de poblaciones a partir de la matriz genética de Nei de los datos corregidos según el criterio de Lynch y Milligan. Sin embargo, el análisis de diferenciación genética de las líneas se basa en este último dendograma.

2.6.5 Estructura de Poblaciones. El análisis de la estructura poblacional, se llevó a cabo con las fuentes de varianzas y el coeficiente de diferenciación poblacional G_{st} suministrados por los paquetes estadísticos AMOVA-PREP y WINAMOVA. Para calcular las fuentes de varianza dentro y entre poblaciones y el coeficiente de diferenciación genética (G_{st}) a partir del programa estadístico WINAMOVA versión 1.55, los datos son previamente transformados con el programa PRE-AMOVA versión 1.01. Además, para complementar el análisis se calcula la tasa de migración mediante el flujo génico (N_m) proporcionado por el programa estadístico POPGENE versión 1.32.

Se realiza la prueba de significancia a los diferentes estadísticos mediante remuestreos y análisis permutacionales del tipo **bootstrapping** de 1000 replicaciones para cada programa estadístico anteriormente mencionado.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 EXTRACCIÓN DE ADN

Primero, se estableció un banco de germoplasma con muestras de tejido de la parte anterior, media y posterior de las glándulas sericígenas de las líneas no comerciales de gusano de seda (45 individuos). Segundo, se realizó la extracción de ADN de estos tejidos con el protocolo "Extracción de ADN de gusano de seda a partir de glándula" para establecer cual de las tres partes (anterior media y posterior) de la glándula sericígena contenía mayor cantidad de ADN. Los resultados señalaron que la parte posterior presenta mayor cantidad de ADN y requería menor tiempo para la extracción. Sin embargo, el ADN de la parte posterior presentó resultados negativos en la digestión con la endonucleasa de restricción *MspI* (Figura 7), lo que condujo a probar el protocolo **salting out** y, pruebas de purificación de las muestras de ADN con sales y solventes orgánicos, con resultados negativos en la calidad de ADN. Finalmente, con el protocolo reportado por Andy Brower (Anexo A) se extrajo ADN de buena calidad y se obtuvo resultados positivos de digestión con *MspI* (Figuras 8 y 9). Al protocolo se le realizaron las siguiente modificaciones: 5 μ L de proteinasa K con un tiempo de incubación de 3 horas y 5 μ L de RNasa; se omitió el paso de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico y en su lugar se adicionó un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico. La precipitación del ADN se realizó a -20°C toda la noche. El ADN extraído fue de óptima calidad y en promedio se obtuvo una concentración de 307.64 ng/ μ L para todos los individuos (Figura 8).

Figura 7. Ensayo de digestión negativo con la endonucleasa de restricción *MspI* en muestras de ADN de la parte posterior de la glándula de líneas no comerciales de gusano de seda. Gel de agarosa al 1%, se observa el ADN control (carriles 1,3,5,7,9) y muestras no digeridas (carriles 2,4,6,8,10).

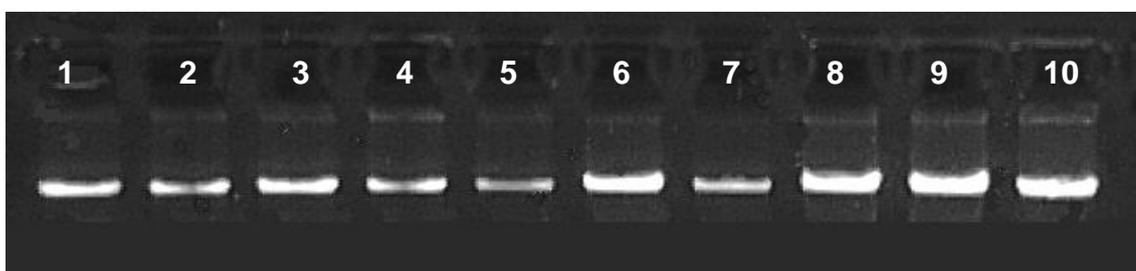


Figura 8. Muestras de ADN extraídas de la parte posterior de la glándula sericígena de las nueve líneas no comerciales con el protocolo de Andy Brower (1998). Gel de agarosa 1%. Fotografía digital (cámara NIKON).

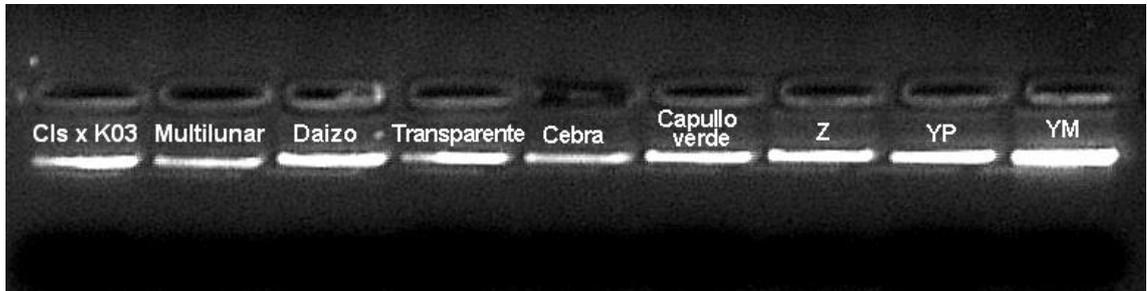
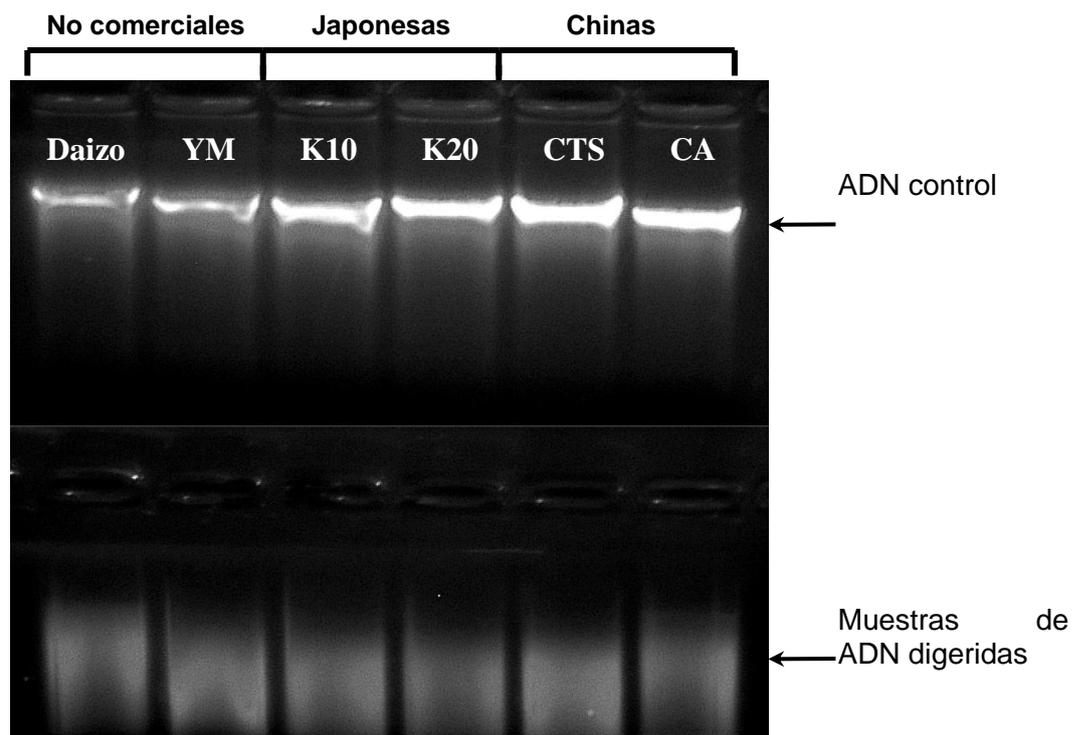


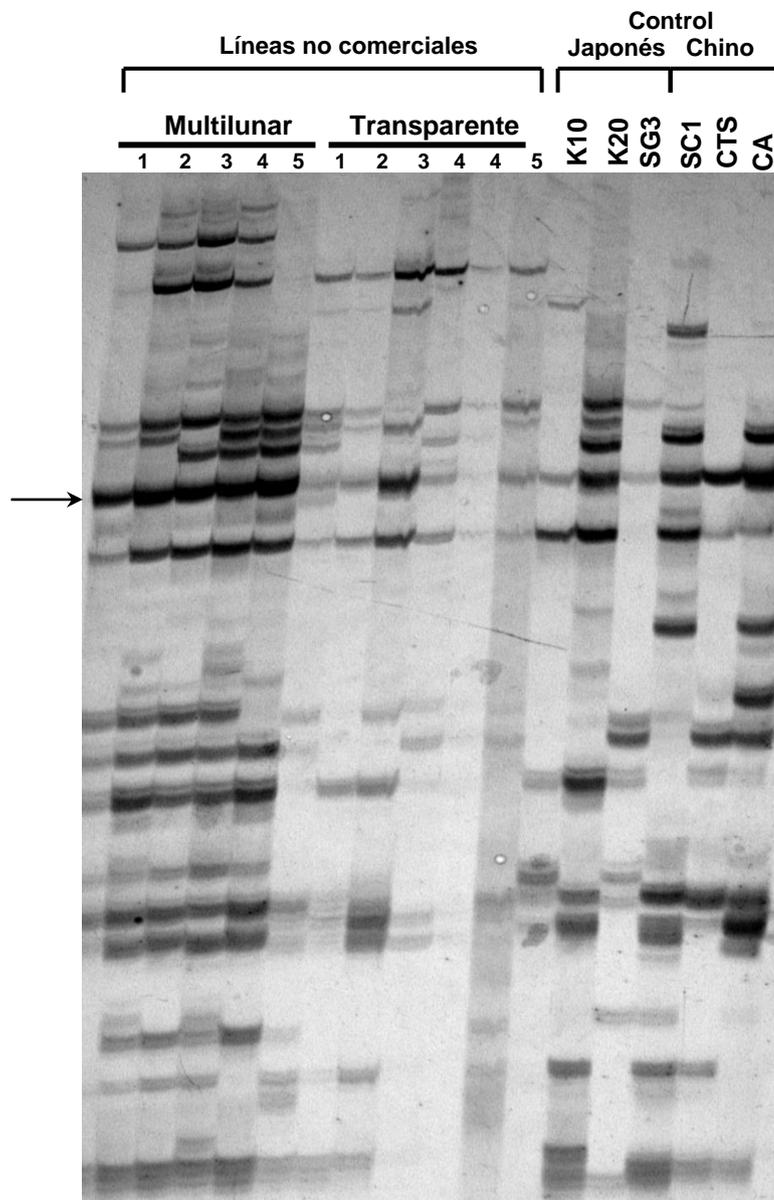
Figura 9. Ensayo de digestión positivo con la endonucleasa de restricción *MspI*, comparando líneas comerciales (Japonesas y Chinas) y no comerciales. Gel de agarosa 1%. Fotografía digital (cámara NIKON).



3.2 PERFILES DE AFLP

La calidad del ADN permitió obtener un patrón de bandas amplificadas comparable entre líneas (Figura 10). Este aspecto es relevante si se considera que se deben cumplir exitosamente cinco etapas: digestión, ligación de adaptadores, pre-amplificación, amplificación selectiva y electroforesis.

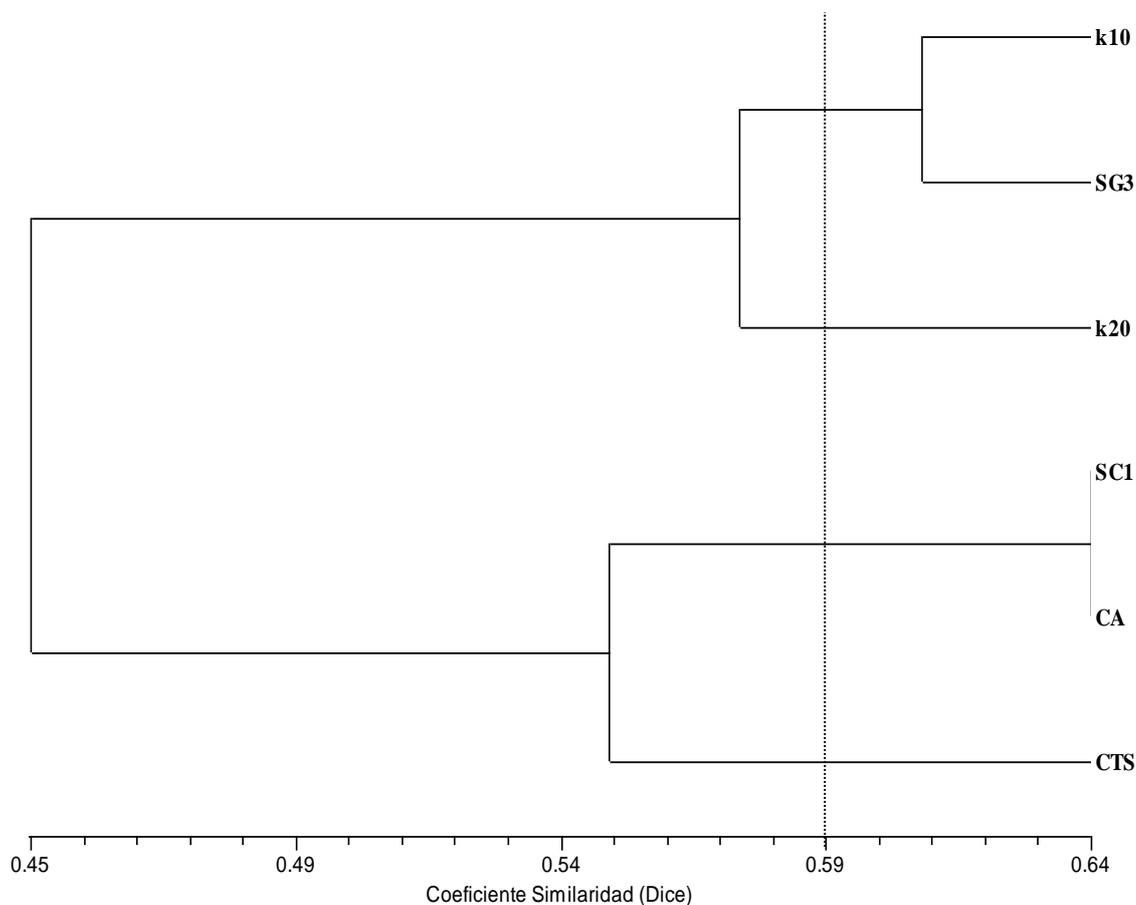
Figura 10. Perfil parcial de 16 individuos de gusano de seda analizados con marcadores AFLP; se observa el patrón de bandas obtenido con el par de iniciadores de AFLP, *EcoRI* AGG y *MseI* CAC. La flecha indica el grado de homología entre las bandas de la línea Multilunar. Gel denaturalizante de poliacrilamida (6%).



3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La amplificación de las muestras de ADN obtenido de las líneas de gusano de seda: 9 líneas no comerciales y 6 líneas comerciales (3 líneas de origen chino y 3 líneas de origen japonés), generó con los cuatro pares de combinaciones de iniciadores de AFLP (*EcoRI* ACG/ *MseI* CAA, *EcoRI* ACG/ *MseI* CAC, *EcoRI* ACG/ *MseI* CAT y *EcoRI* AGG/ *MseI* CAC) un total de 156 bandas o fragmentos de ADN. Sin embargo, para el análisis estadístico se realizó la corrección según el criterio de Lynch y Milligan, analizando finalmente un total de 152 bandas con los programas estadísticos mencionados en la metodología. Así mismo, la confiabilidad del estudio se comprobó al generar un dendograma de líneas comerciales que muestra nodos definidos correspondientes a las líneas de origen japonés y chino, con un coeficiente de similitud promedio de 0.51 (Figura 11).

Figura 11. Dendograma de líneas comerciales de gusano de seda a partir de las cuatro combinaciones de iniciadores de AFLP *EcoRI* ACG/*MseI* CAA, *EcoRI* ACG/*MseI* CAC, *EcoRI* ACG/*MseI* CAT y *EcoRI* AGG/*MseI* CAC. Líneas japonesas: K10, K20 y SG3, y chinas: SC1, CA y CTS.



3.3.1 Diversidad Genética.

3.3.1.1 Loci polimórfico y heterocigosidad. La diversidad de las líneas de gusano de seda, se evaluó mediante el porcentaje de loci polimórficos y heterocigosidad insesgada. De las 152 bandas analizadas, el 96,71% fueron polimórficas representando aproximadamente 146 fragmentos amplificados (Cuadro 3). Las líneas que presentaron menores porcentajes de loci polimórficos y heterocigosidad insesgada fueron las líneas no comerciales Multilunar y Daizo (20.39% y 21.05%; 0.1 y 0.1; respectivamente).

En contraste, las líneas que presentaron los mayores porcentajes de loci polimórficos y heterocigosidad insesgada fueron las líneas no comerciales Cls x K03 y YM (63.82% y 59.2%; 0.24 y 0.24; respectivamente) revelando un alto número de alelos diferentes. Esto es posible de explicar con base en el origen de la línea no comercial Cls x K03, dado que ésta es una cruce entre la raza china y japonesa, mostrando alto grado de variabilidad genética.

Cuadro 3. Parámetros de diversidad genética obtenidos de las 11 líneas de gusano de seda analizadas con las cuatro pares de combinaciones de iniciadores de AFLP (152 bandas polimórficas).

	Líneas	Heterocigosidad insesgada	% Loci Polimórfico
No comerciales	Cls x K03	0,24	63,82
	Multilunar	0,10	20,39
	Daizo	0,10	21,05
	Transparente	0,22	48,68
	Cebra	0,18	43,42
	Capullo Verde	0,16	35,53
	Z	0,15	34,87
	YP	0,21	51,97
	YM	0,24	59,21
	Total	0,34	92,76
Comerciales	Japonesas	0,23	52,63
	Chinas	0,19	42,11
	Total	0,27	75,0
Población Total		0,37	96,71

3.3.1.2 Matriz de similaridad genética. El rango de distribución de la matriz de similaridad genética (Anexo B) de los datos de la población total es mayor (0.22 - 0.97) que entre las líneas no comerciales (0.38 - 0.97) y comerciales (0.51 - 0.64) de gusano de seda (Cuadro 4). Lo que indica una gran diversidad de alelos en la población total que entre las líneas de gusano de seda, sin embargo las líneas no comerciales aportan la mayoría de esta diversidad genética.

El promedio de similaridad genética de los genotipos de las líneas no comerciales (0.75) indica que están genéticamente más relacionados que los genotipos de las líneas comerciales (0.59) (Cuadro 4). Esto es posible, debido a que las líneas comerciales son de diferente origen geográfico manteniendo su componente genético japonés y chino. En contraste, las líneas no comerciales aunque poseen gran diversidad de alelos estos son compartidos entre los individuos, revelando que no se ha dado un proceso de selección.

Es importante resaltar que los individuos que conforman las líneas genéticas Multilunar y Daizo presentaron promedios de similaridad altos (0.92 y 0.88; respectivamente) en comparación con los individuos que conforman las otras líneas, lo que indica uniformidad genética en estas líneas. Por otra parte, la cruce Cls x K03 como se esperaba presenta un promedio de similaridad de 0.53, debido a su componente genético japonés y chino.

Cuadro 4. Estimadores de similaridad genética con cuatro marcadores AFLP en líneas de gusano de seda entre genotipos de una misma línea que conforman las poblaciones no comerciales, comerciales y población total.

	Líneas	Número de genotipos	Rango de distribución	Promedio de similaridad genética
No Comerciales	Cls x K03	5	0.38 - 0.75	0.53
	Multilunar	5	0.86 - 0.97	0.92
	Daizo	5	0.77 - 0.97	0.88
	Transparente	5	0.62 - 0.75	0.69
	Cebra	5	0.72 - 0.83	0.76
	Capullo Verde	4	0.65 - 0.88	0.76
	Z	5	0.80 - 0.85	0.82
	YP	5	0.64 - 0.87	0.72
	YM	5	0.60 - 0.80	0.70
	Total	44	0.38 - 0.97	0.75
Comerciales	Japonesas	3	0.57 - 0.61	0.59
	Chinas	3	0.51 - 0.64	0.58
	Total	6	0.51 - 0.64	0.59
Población total		50	0.22- 0.97	0.57

3.3.2 Correlación cofenética. Para establecer el grado de confiabilidad de los agrupamientos se calculó el índice cofenético a partir de la comparación entre la matriz de similitud (coeficiente de Dice) y el método de agrupamiento. Así, los resultados indican que el agrupamiento por UPGMA representa mejor los datos de la población estudiada que el método **Neighbor-joining** (0.84 y 0.42; respectivamente)(Cuadro 5).

El índice cofenético de la población total fue bueno, sin embargo el índice del dendograma de las líneas no comercial es mejor ($r=0.86$) demostrando que los datos son robustos y consistentes (Cuadro 6).

Cuadro 5. Coeficientes de correlación cofenética obtenidos a partir de la comparación de la matriz de similitud de la población total con los métodos de agrupamiento.

Método Agrupamiento	Correlación Cofenética	Grado de ajuste
UPGMA	0.84	$0.8 \leq r < 0.9$ Buen ajuste
Neighbor-joining	0.42	$r < 0.7$ Mal ajuste

Cuadro 6. Coeficientes de correlación cofenética obtenidos a partir de la comparación de la matriz de similitud de las líneas comerciales, no comerciales y la población total a partir de UPGMA con los cuatro marcadores de AFLP.

Comparaciones	No de Genotipos	Índice cofenético
Comerciales	6	0.77
No comerciales	44	0.86
Población total	50	0.84

3.3.3 Correlación de matrices. El promedio de correlación entre los cuatro pares de iniciadores de AFLP fue bajo ($r=0.35$), siendo las combinaciones de iniciadores *EcoRI* ACG / *MseI* CAC y *EcoRI* ACG / *MseI* CAT las que muestran menor correlación ($r=0.25$) indicando diferencias importantes en el escrutinio del genoma de las líneas analizadas; recomendándola para posteriores estudios en gusano de seda. Sin embargo, las combinaciones de iniciadores *EcoRI* ACG / *MseI* CAA y *EcoRI* ACG / *MseI* CAC con una alta correlación es medianamente informativas (Cuadro7).

Por otra parte las correlaciones de cada una de las matrices de cada combinación de iniciadores de AFLP con la matriz total de la población fue alta ($0.67 \leq r \leq 0.78$). En general, no hay diferencias significativas entre cada una de

las matrices y la matriz total, indicando que estas combinaciones no son suficientemente informativas para realizar un escrutinio apropiado (Cuadro 8).

Cuadro 7. Correlación de las matrices de las cuatro pares de combinaciones de iniciadores de AFLP con la población total.

Iniciadores de AFLP	EcoRI ACG/ MseI CAA	EcoRI ACG/ MseI CAC	EcoRI ACG/ MseI CAT	EcoRI AGG/ MseI CAC
EcoRI ACG/ MseI CAA	1			
EcoRI ACG/ MseI CAC	0.46	1		
EcoRI ACG/ MseI CAT	0.40	0.25	1	
EcoRI AGG/ MseI CAC	0.34	0.36	0.30	1

Cuadro 8. Correlación de las matrices de las cuatro pares de combinaciones de AFLP's con la matriz total.

Combinaciones de Iniciadores	Matriz Total
EcoRI ACG - MseI CAA	0.78
EcoRI ACG - MseI CAC	0.73
EcoRI ACG - MseI CAT	0.67
EcoRI AGG - MseI CAC	0.67

3.3.4 Similaridad genética. El análisis de similaridad genética se realizó a partir del dendograma de subpoblaciones obtenido a partir de los cuatro pares de iniciadores de AFLP. El dendograma de las líneas analizadas no reveló nodos definidos entre líneas comerciales y no comerciales, formando grupos relacionados entre sí con una similaridad promedio de 0.57 (Figura 12). Este agrupamiento sugiere que los individuos de las líneas de gusano de seda tienen en común por lo menos la mitad de su información genética. Por otra parte el dendograma de líneas no comerciales muestra asociación entre individuos de la misma línea (Figura 13). En contraste, los individuos pertenecientes a las líneas Cls x K03, YM y YP presentan mayor dispersión, al formar grupos genéticos diferentes revelando un componente genético amplio.

Figura 12. Dendrograma de subpoblaciones de líneas de gusano de seda a partir de las cuatro combinaciones de iniciadores de AFLP *EcoRI* ACG/*MseI* CAA, *EcoRI* ACG/*MseI* CAC, *EcoRI* ACG/*MseI* CAT y *EcoRI* AGG/*MseI* CAC. Los individuos aparecen con códigos según la línea y el número de individuo: no comerciales: ClsxK03 (1), Multilunar (2), Daizo (5), Transparente (6), Cebra (8), Capullo verde (12), Z (15), YP (16), YM (17), y comerciales K10, K20, SG3, SC1, CTS y CA.

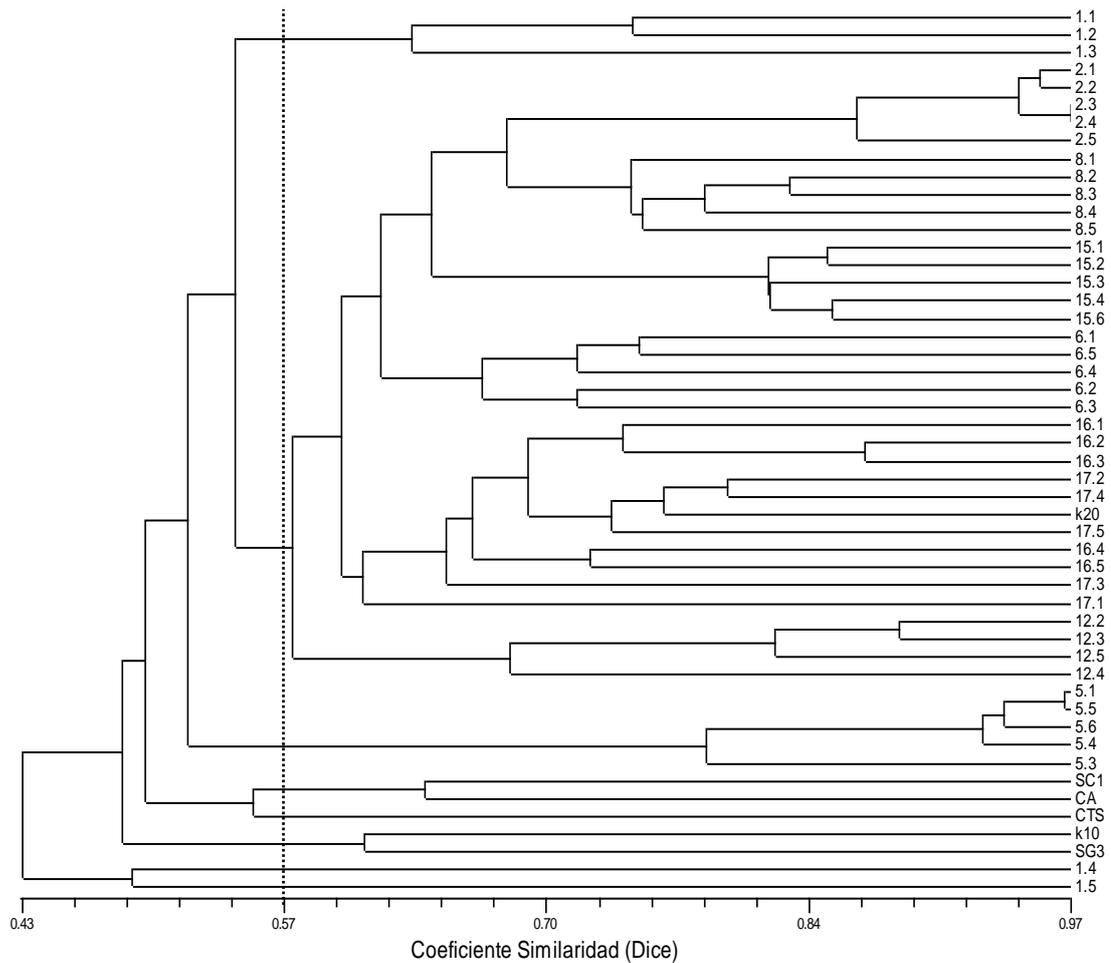
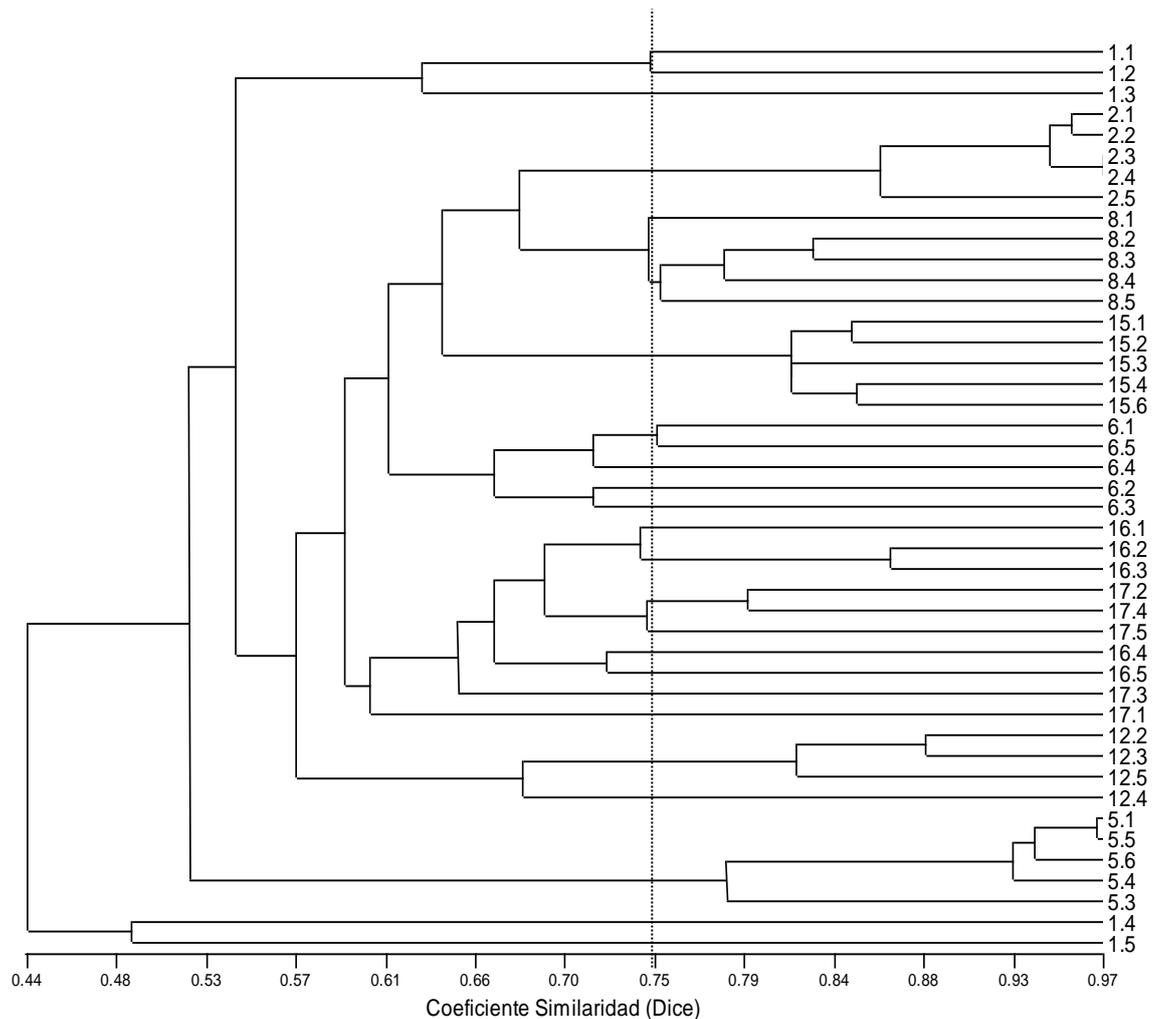


Figura 13. Dendograma de subpoblaciones de líneas no comerciales de gusano de seda a partir de las cuatro combinaciones de iniciadores de AFLP *EcoRI* ACG/*MseI* CAA, *EcoRI* ACG/*MseI* CAC, *EcoRI* ACG/*MseI* CAT y *EcoRI* AGG/*MseI* CAC. Los individuos aparecen con códigos según la línea y el número de individuo: ClsxK03 (1), Multilunar (2), Daizo (5), Transparente (6), Cebra (8), Capullo verde (12), Z (15), YP (16), YM (17).

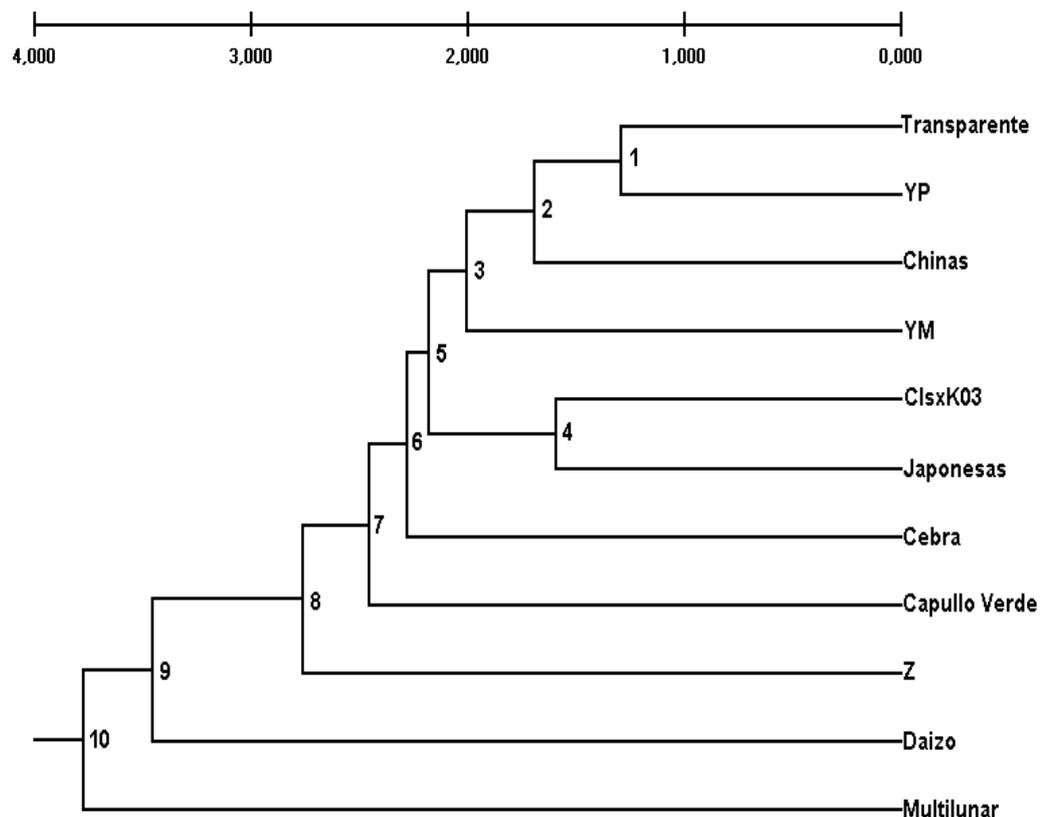


3.3.5 Distancia genética. El dendograma de la figura 14 basado en la matriz de distancia insesgada de Nei (Tabla 2), muestra que el rango de distancia genética de las líneas de gusano de seda varía entre 0.13 a 0.38. Estos valores no evidencian una diferenciación genética apreciable (38%), complementando los valores de similitud genética antes mencionados y confirmando un componente genético compartido entre las líneas de gusano de seda.

Tabla 2. Matriz de distancia Nei del dendograma de poblaciones de las líneas de gusano de seda.

Nodo	Distancia
1	0,13
2	0,17
3	0,20
4	0,16
5	0,22
6	0,23
7	0,25
8	0,28
9	0,35
10	0,38

Figura 14. Dendograma de poblaciones de líneas de gusano de seda basado en la matriz de distancia de Nei a partir de las cuatro combinaciones de iniciadores *EcoRI* ACG/*MseI* CAA, *EcoRI* ACG/*MseI* CAC, *EcoRI* ACG/*MseI* CAT y *EcoRI* AGG/*MseI* CAC. Cada población corresponde a líneas no comerciales ClsxK03, Multilunar, Daizo, Transparente, Cebra, capullo verde, Z, YP y YM, y comerciales K10, K20, SG3, SC1, CTS y CA del gusano de seda.



3.3.6 Estructura de poblaciones. Para este análisis se tuvieron en cuenta tres parámetros estadísticos: las fuentes de varianza, el coeficiente de diferenciación poblacional y flujo genético

Para el análisis de las fuentes de varianza se tuvo en cuenta la significancia de la prueba de Barlett ($p < 0.000999$), la cual demostró homogeneidad de varianzas en los datos. Así los datos muestran que la varianza entre líneas (43,03%) y dentro de líneas (56,97%) es similar con un nivel de significancia de $p < 0,0010$ (Cuadro 9) . Lo que indica que la variabilidad es similar entre y dentro de líneas, sugiriendo la existencia de un único y amplio **pool** de genes compartidos con separaciones genéticas limitadas entre grupos.

Cuadro 9. Fuentes de varianza de la estructura poblacional de las 11 líneas de gusano de seda. Análisis de Varianza Molecular dentro y entre poblaciones de las muestras de gusano de seda *Bombyx mori* L. a partir de datos de los cuatro pares de combinaciones de AFLP.

FUENTE DE VARIACIÓN	DF	MS	VC	% TOTAL	P	B
Varianza entre líneas	10	75,51	12,9	43,03	<0,0010	<0,00099
Varianza dentro de líneas	39	17,07	17,07	56,97		

Del mismo modo, el coeficiente G_{st} (0.43) no evidencia una estructura poblacional definida, es decir que las líneas no se definen como poblaciones individuales si no como una población total. Esto es posible por el alto valor de flujo de genes (0,45), considerando el tamaño de la población (50 individuos) y el tiempo de generación del gusano de seda (55 días) (Cuadro 10).

Por último podemos indicar que la caracterización de las líneas y la variabilidad estimada dentro y entre líneas proveen la primera evidencia molecular que soporta las relaciones genéticas de las líneas no comerciales.

Cuadro 10. Parámetros estadísticos de la estructura poblacional de las 11 líneas de gusano de seda, obtenidos de las cuatro pares de combinaciones de iniciadores de AFLP.

	Nm	Gst
Población Total	0,45	0,43

4. CONCLUSIONES

La diversidad genética es mayor en la población total que entre las líneas comerciales y no comerciales de gusano de seda, aportando la mayoría de esta diversidad las líneas no comerciales.

Las líneas no comerciales aunque poseen gran diversidad de alelos estos son compartidos entre los individuos, revelando que no se ha dado un proceso de selección.

Los individuos de las líneas Multilunar y Daizo presentaron promedios de similitud altos en comparación con los individuos que conforman las otras líneas, indicando uniformidad genética en estas líneas.

La correlación entre la matriz de cada combinación de iniciadores y la total no es significativamente diferente, indicando que las combinaciones no son suficientemente informativas para realizar un escrutinio apropiado del genoma del gusano de seda.

El dendograma de las líneas analizadas no reveló nodos definidos entre líneas comerciales y no comerciales de gusano de seda, sugiriendo que los individuos tienen en común por lo menos la mitad de su información genética.

El dendograma de líneas no comerciales muestra asociación entre individuos de la misma línea. Sin embargo, los individuos pertenecientes a las líneas Cls x K03, YM y YP presentan mayor dispersión en el agrupamiento, revelando un componente genético amplio.

Las fuentes de varianza evidencian que la variabilidad es similar entre y dentro de líneas, sugiriendo la existencia de un único y amplio **pool** de genes compartidos con separaciones genéticas limitadas entre grupos.

El coeficiente de diferenciación genética G_{st} no evidencia una estructura poblacional definida.

Por último podemos indicar que la caracterización de las líneas y la variabilidad estimada dentro y entre líneas proveen la primera evidencia molecular que soporta las relaciones genéticas de las líneas no comerciales.

5. RECOMENDACIONES

Los resultados de este trabajo demuestran la necesidad de considerar un gran número de individuos por línea, debido a la alta variabilidad encontrada dentro de las líneas analizadas.

La falta de información de las líneas no comerciales requiere trabajos de caracterización biológica y morfológica, para fundamentar las relaciones genéticas entre las líneas.

Es necesario complementar el análisis con otras combinaciones de iniciadores de AFLP que permitan hacer una mayor escrutinio del genoma del gusano de seda. Así mismo, con otras técnicas moleculares para ampliar el conocimiento genético de las líneas no comerciales del gusano de seda.

BIBLIOGRAFÍA

ALEGRÍA S, Álvaro H. *et al.* Caracterización molecular de líneas de *Bombyx mori* (Lepidóptera: Bombycidae) mediante AFLP. En : Socolen.

ARANGUREN MENDEZ, José Atilio. Caracterización y relaciones filogenéticas de cinco razas asnales españolas en peligro de extinción mediante la utilización de marcadores microsátélites: su importancia en los programas de conservación. Bellaterra, 2002. Trabajo de grado (Doctor en Veterinaria). Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria. Unidad de Genética y Mejora Animal.

CIFUENTES CORREA, Cesar Augusto y WOOK SOHN, Kee. Manual Técnico de Sericultura: Cultivo de la morera y cría del gusano de seda en el trópico. Pereira : convenio SENA-CDTS, 1998. p. 109-167.

EXCOFFIER, Laurent. Analysis of Molecular Variance [programa de computador en disco] versión 1.55. [Geneva]: University of Geneva, Genetics and Biometry Laboratory. [1993].

LYNCH, M. and MILLIGAN, B. G. Analysis of Population Genetic Structure with RAPD Markers. En : Molecular Ecology. No. 3 (1994); p.91-99.

MILLER, M.P. Tools for population genetic analysis (TFPGA): A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. [programa de computador en línea] versión 1.3.: [Arizona]: Northern Arizona University, Department of Biological Sciences. [1 february 2000]. Disponible en internet: <http://herb.bio.nau.edu/~miller>.

NAGARAJA, Ganachari M. and NAGARAJU, Javaregowda. Genome fingerprinting of the silkworm, *Bombyx mori*, using random arbitrary primers. En: Electrophoresis. No.16 (1995); p.1633-1638.

NAGARAJU J. Recent advances in molecular genetics of the silk moth, *Bombyx mori*. India: Centre for DNA Fingerprinting and Diagnostics, 1999.

NAGARAJU, J *et al.* Comparison of multilocus RFLPs and PCR-based marker systems for genetic analysis of the silkworm, *Bombyx mori*. En : Heredity 86 (jan. 2001); p.588-597.

NAGARAJU, Javaregowda *et al.* DNA fingerprinting in silkworm, *Bombyx mori*, using banded krait minor satellite DNA-derived probe. En : Electrophoresis. No.16 (1995); p.1639-1642.

NEI, Masatoshi and LI, Wen-Hsiung. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. En : Genetics. Vol. 76, No. 10 (oct. 1979); p. 5260-5273.

Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. En : American Naturalist: (1972); p. 283-292.

RAMIREZ, Hernando. Biotecnología I. Palmira: Universidad Nacional de Colombia, 2000.

ROHLF, F. James. NTSYSpc-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. [programa de computador en disco] versión 2.02. [New York]: Exeter Software. [1998].

VOS, Pieter *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. En : nucleic Acids Research. Vol. 23, No. 21 (1995); p. 4407-4414

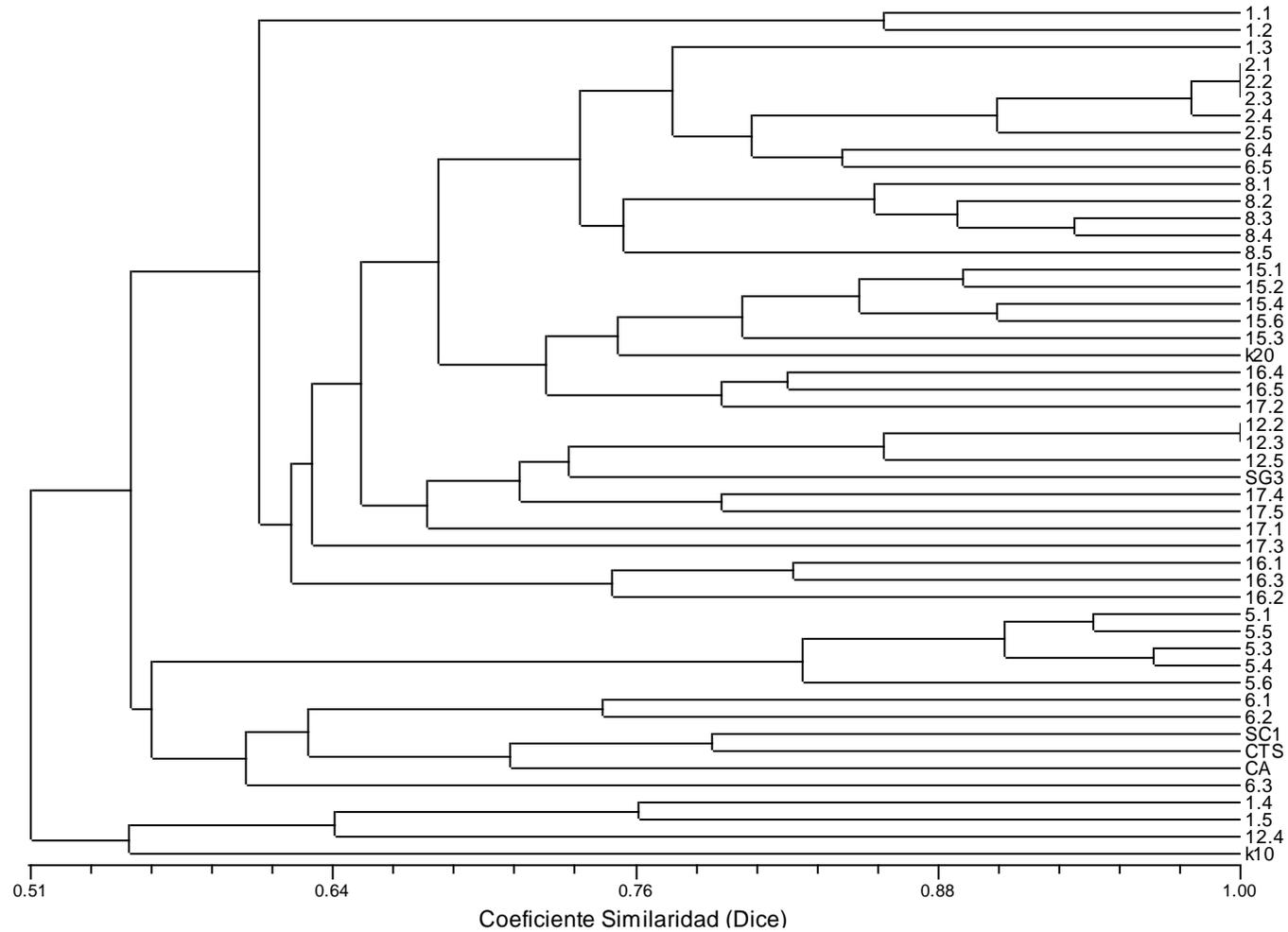
YEH, Francis C.; YANG, Rong-cai and BOYLE, Timothy. Population Genetic Analysis (POPGENE). [programa de computador en línea] versión 1.32. Lugar de publicación desconocido: University of Alberta. [1997]. Disponible en internet: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/index.htm>.

YOSHITAKE. Ciclo de vida del gusano de seda en Bioquímica de *Bombyx mori* L. Tokio, 1984. p.1-19

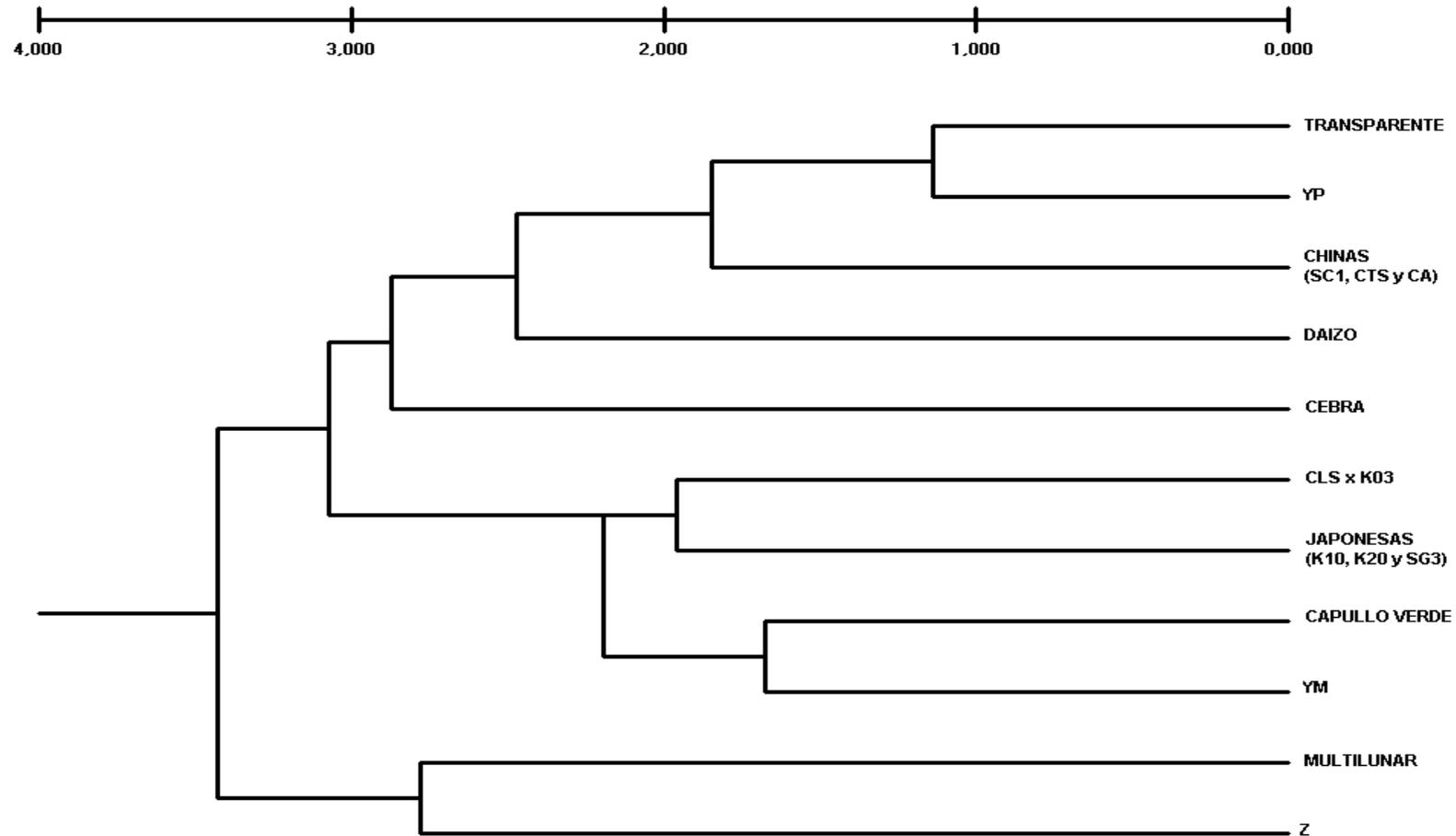
Anexo A. Protocolo de extracción de ADN genómico de insecto. Reportado por Andy Brower (1998) y desarrollado en el laboratorio de Rick Harrison en 1980, con contribuciones de Steve Bogdanowicz, Ben Normark, Bernie Crespi y Andy Brower.

Pesar 0.05 g de la glándula de seda y conservar en hielo. Adicionar 1 mL de **buffer** Lifton [200mM Glucosa, 50 mM EDTA, 100mM Tris-HCl, y 0.5% SDS] precalentado a 55°C y macerar la mezcla por 25 a 30 segundos. Añadir 5µL de proteinasa K (100ug/mL) para impedir que las nucleasas citoplasmáticas degraden el ADN e incubar la mezcla durante 3 horas a 55°C para que el tejido se disolviera en la solución. Después de cumplida la hidrólisis de la glándula, agregar 100 µL de acetato de potasio 8M e incubar a –20°C por 15 minutos. Centrifugar a 14000 rpm por 15 minutos y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo. Adicionar 5 µL de RNasa e incubar a 37°C por 30 minutos. Separar el ADN de las proteínas y demás componentes del lisado celular, adicionando un volumen de cloroformo, alcohol isoamílico 24:1. Agitar y centrifugar durante 5 minutos a 14000 rpm, quedando en la fase acuosa el ADN y en la fase orgánica las proteínas y demás componentes celulares. Lavar dos veces más con cloroformo, alcohol isoamílico como se describe anteriormente. A este producto extraído, adicionar dos volúmenes de etanol absoluto y 1/10 de acetato de sodio 3M para precipitar el ADN. Incubar a –20°C durante toda la noche y centrifugar a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C y descartar sobrenadante. Lavar el botón resultante con 1 mL de etanol al 70% y centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos a 4°C. Finalmente, secar al vacío el precipitado de ADN y resuspender durante 1 hora a 55°C en 400uL de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8).

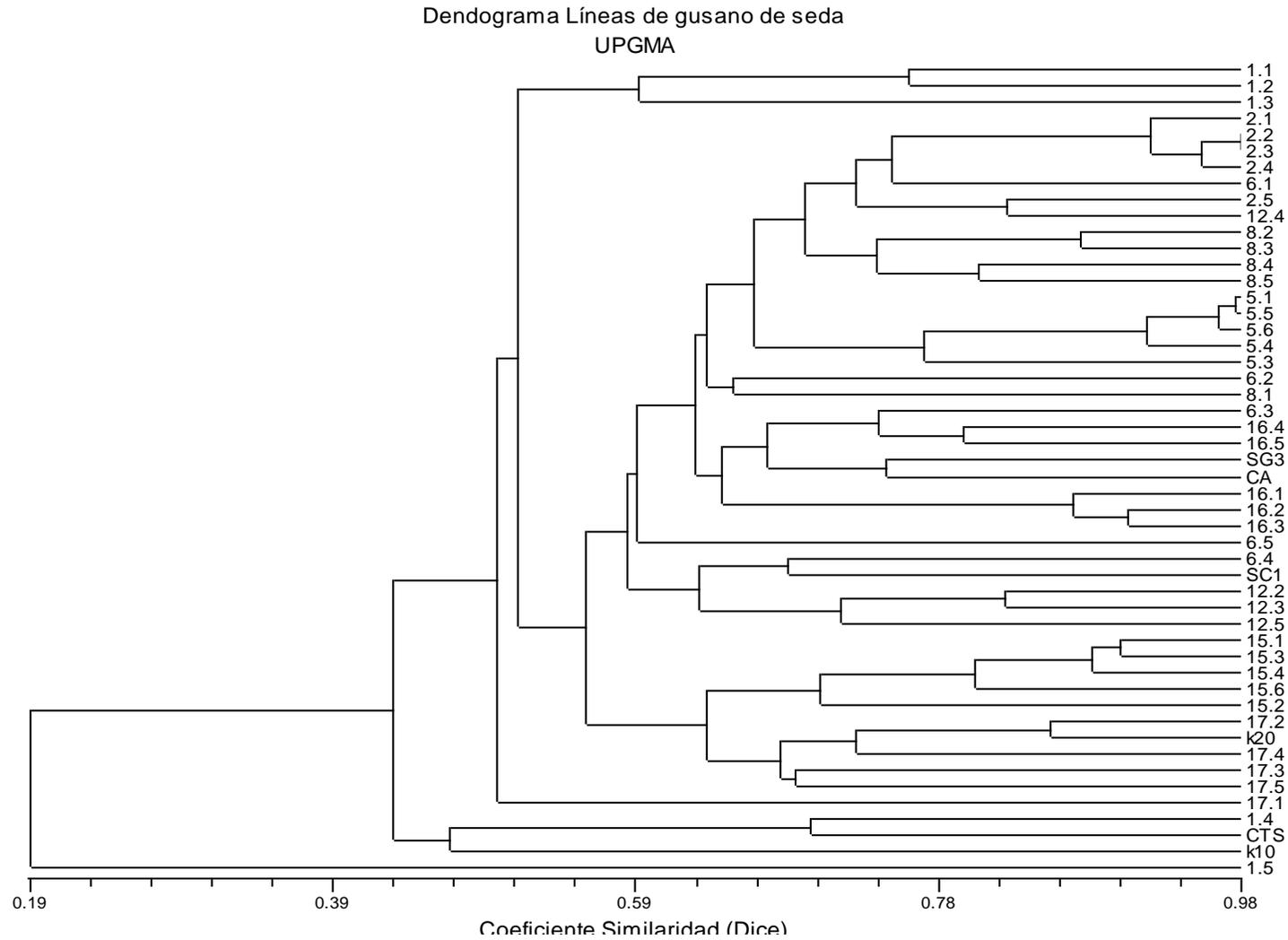
Anexo C. Dendograma de subpoblaciones de líneas de gusano de seda a partir del par de iniciadores de AFLP *EcoRI* ACG/*MseI* CAA. Los individuos aparecen con códigos según la línea y el número de individuo: no comerciales: ClsxK03 (1), Multilunar (2), Daizo (5), Transparente (6), Cebra (8), Capullo verde (12), Z (15), YP (16), YM (17) y comerciales K10, K20, SG3, SC1, CTS y CA].



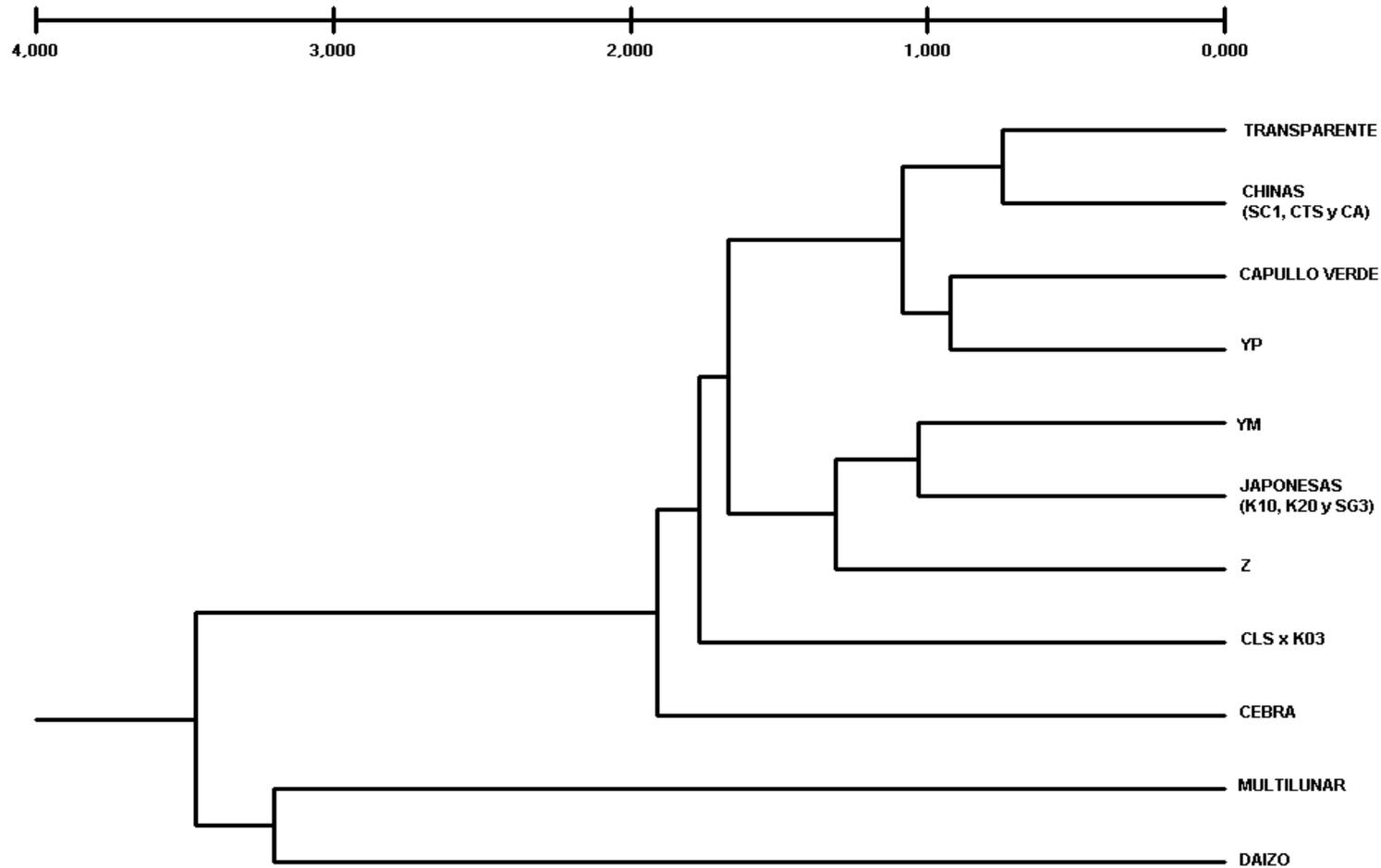
Anexo D. Dendograma de poblaciones de líneas de gusano de seda basado en la matriz de distancia de Nei (1978), a partir de la combinación de iniciadores *EcoRI* ACG/ *MseI* CAA. Este dendograma esta basado en la matriz de distancia de Nei (1978) usando el algoritmo UPGMA. Cada población corresponde a líneas no comerciales ClsxK03, Multilunar, Daizo, Transparente, Cebra, capullo verde, Z, YP y YM, y comerciales K10, K20, SG3, SC1, CTS y CA del gusano de seda.



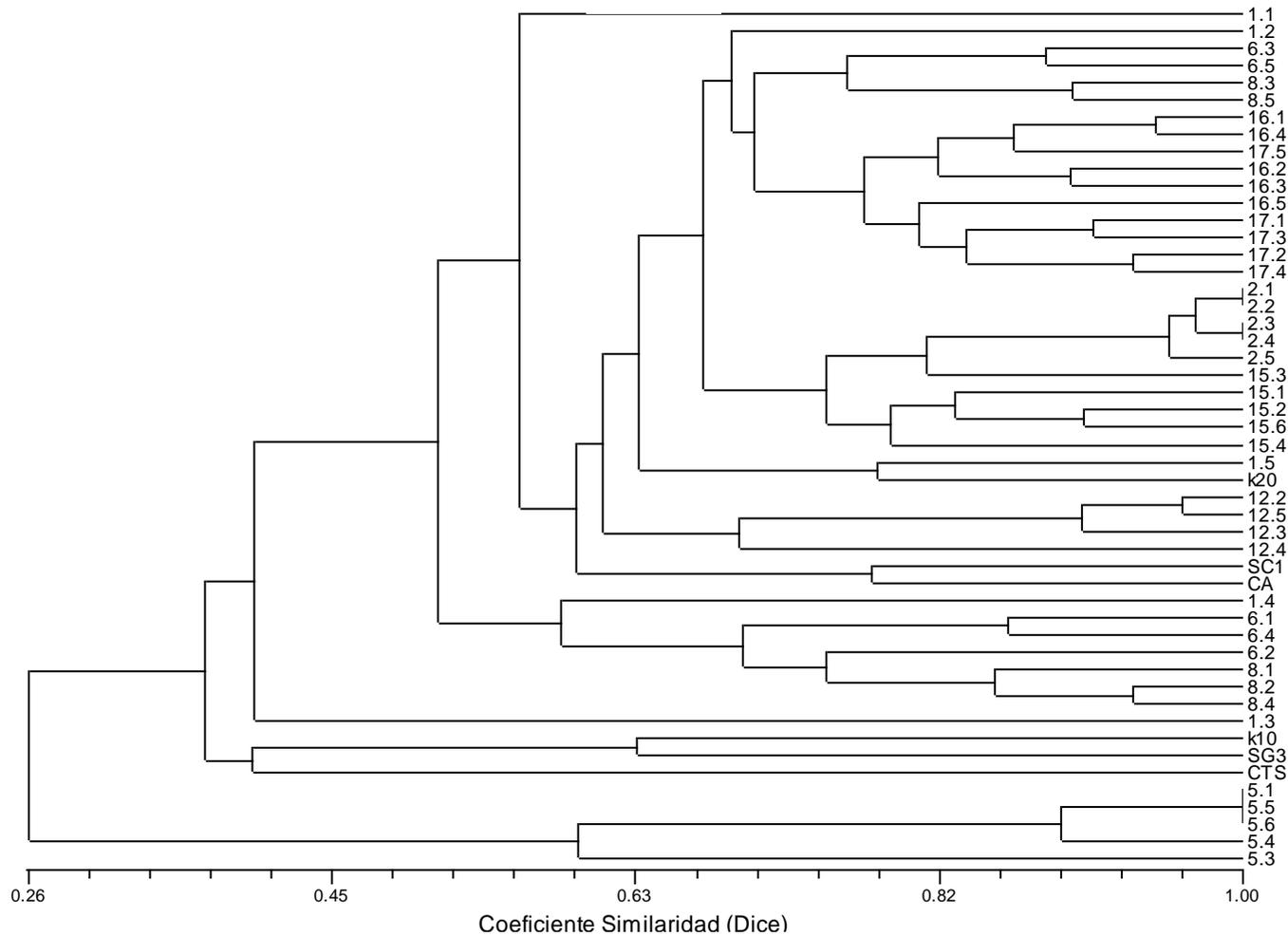
Anexo E. Dendrograma de subpoblaciones de líneas de gusano de seda a partir del par de iniciadores de AFLP *EcoRI* ACG/*MseI* CAC. Los individuos aparecen con códigos según la línea y el número de individuo: no comerciales: ClsxK03 (1), Multilunar (2), Daizo (5), Transparente (6), Cebra (8), Capullo verde (12), Z (15), YP (16), YM (17) y comerciales K10, K20, SG3, SC1, CTS y CA].



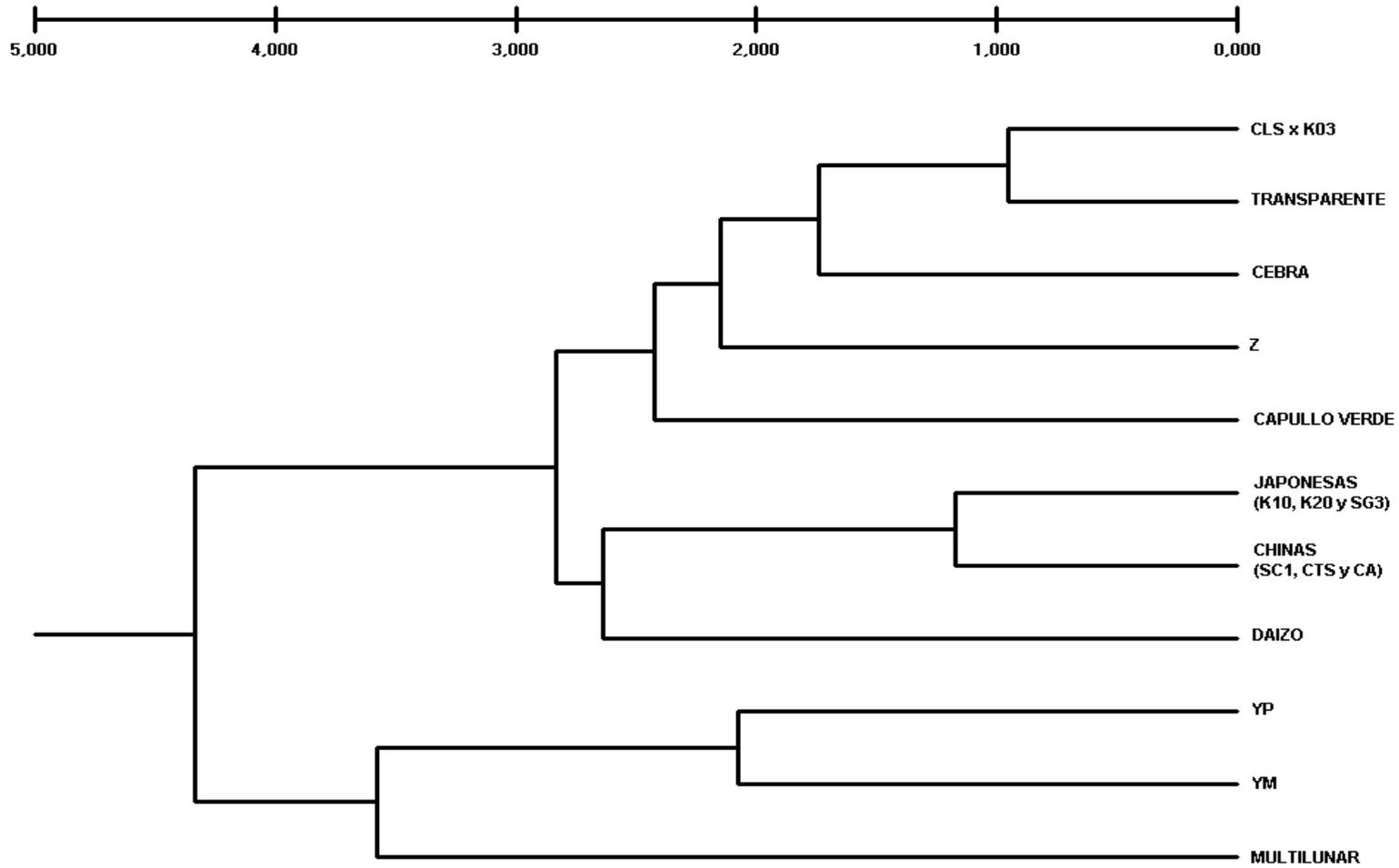
Anexo F. Dendograma de poblaciones de líneas de gusano de seda basado en la matriz de distancia de Nei (1978), a partir de la combinación de iniciadores *EcoRI* -ACG/ *MseI* CAC . Cada población corresponde a líneas no comerciales ClsxK03, Multilunar, Daizo, Transparente, Cebra, capullo verde, Z, YP y YM, y comerciales K10, K20, SG3, SC1, CTS y CA del gusano de seda.



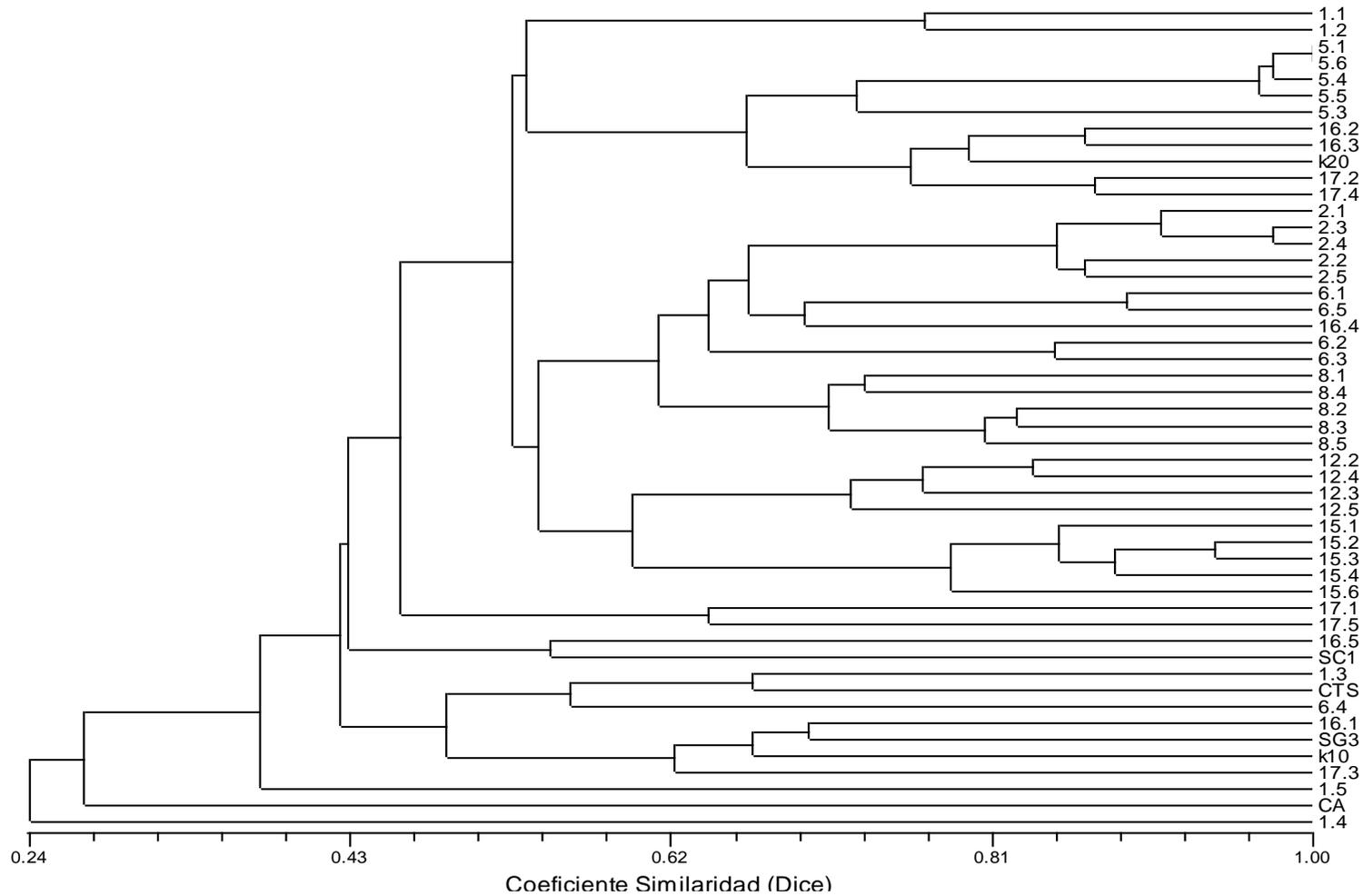
Anexo G. Dendograma de subpoblaciones de líneas de gusano de seda a partir del par de iniciadores de AFLP *EcoRI* ACG/*MseI* CA. Los individuos aparecen con códigos según la línea y el número de individuo: no comerciales: ClsK03 (1), Multilunar (2), Daizo (5), Transparente (6), Cebra (8), Capullo verde (12), Z (15), YP (16), YM (17) y comerciales K10, K20, SG3, SC1, CTS y CA].



Anexo H. Dendograma de poblaciones de líneas de gusano de seda basado en la matriz de distancia de Nei (1978), a partir de la combinación de iniciadores *EcoRI* ACG/ *MseI* CAT. Cada población corresponde a líneas no comerciales ClsxK03, Multilunar, Daizo, Transparente, Cebra, capullo verde, Z, YP y YM, y comerciales K10, K20, SG3, SC1, CTS y CA del gusano de seda.



Anexo I. Dendrograma de subpoblaciones de líneas de gusano de seda a partir del par de iniciadores de AFLP *EcoRI* ACG/*MseI* CAT. Los individuos aparecen con códigos según la línea y el número de individuo: no comerciales: ClsxK03 (1), Multilunar (2), Daizo (5), Transparente (6), Cebra (8), Capullo verde (12), Z (15), YP (16), YM (17) y comerciales K10, K20, SG3, SC1, CTS y CA].



Anexo J. Dendograma de poblaciones de líneas de gusano de seda basado en la matriz de distancia de Nei (1978), a partir de la combinación de iniciadores *EcoRI* AGG/ *MseI* CAC. Cada población corresponde a líneas no comerciales ClsK03, Multilunar, Daizo, Transparente, Cebra, capullo verde, Z, YP y YM, y comerciales K10, K20, SG3, SC1, CTS y CA del gusano de seda.

