

## **IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES AFLPS ASOCIADOS CON CARACTERES DE PRODUCTIVIDAD EN GUSANO DE SEDA, *BOMBYX MORI* (LINNAEUS, 1758) (LEPIDOPTERA: BOMBYCIDAE)**

AFLPS MOLECULAR IDENTIFICATION MARKERS ASSOCIATED WITH PRODUCTIVITY TRAITS IN SILKWORM, *BOMBYX MORI* (LINNAEUS, 1758) (LEPIDOPTERA: BOMBYCIDAE)

Duverney Gaviria<sup>1,5</sup>, Enrique Aguilar<sup>2,6</sup>, Herman Serrano<sup>1,3,7</sup>, Liliana Ramírez<sup>4</sup>, Álvaro Alegría<sup>1,8</sup>

### **Resumen**

El gusano de seda *Bombyx mori* se caracteriza por presentar una amplia variabilidad en los caracteres de productividad y desarrollo los cuales presentan herencia poligénica. Muchos caracteres morfo-bioquímicos de gusano del seda se han asociado con marcadores moleculares como los RFLPs y los RAPDs mapeándose en diferentes grupos de ligamiento. Sin embargo, se ha prestado poca atención a la definición de su verdadera función dentro del organismo completo. Para llevar a cabo una aproximación preliminar a este problema, se evaluaron cinco combinaciones de iniciadores AFLPs con un total de 302 bandas sobre el ADN genómico de 16 líneas de gusano de seda de origen japonés y chino. Dichas líneas presentaban diferentes características de productividad como peso de capullo y de corteza lo que permitió su discriminación en grupos definidos de alta y baja productividad. Los datos de productividad y la información de los marcadores moleculares para cada una de las líneas fueron correlacionados mediante análisis de varianza múltiple. Estos análisis se realizaron con los marcadores agrupados de acuerdo con las combinaciones de iniciadores utilizados. La significancia se fijó en el 95%. Se eliminaron los marcadores que tenían una presencia o ausencia menor al 5%. Para los restantes se asignó una cota de la varianza en base a la cual se determinó la significancia del marcador. Se identificaron marcadores asociados estadísticamente con peso de capullo y de corteza separadamente, al igual que algunos marcadores asociados con ambos caracteres de productividad.

*Palabras clave:* caracteres de productividad, marcadores moleculares, peso de capullo, peso de corteza, sericultura.

### **Abstract**

The silkworm *Bombyx mori* presents an ample variability in the traits of productivity and development. These traits are polygenic. Many morphologic and biochemical characteristics have been associated with molecular markers such as RFLPs and RAPDs, mapping in different linkage groups. Nevertheless, little attention has been devoted to define its true function within a complete organism. As a preliminary approach in this respect, five combinations of AFLPs primers with a total of 302 bands were evaluated on the genomic DNA of 16 lines of Japanese and Chinese strains. These strains displayed different characteristics in cocoon and shell weight that allowed their separation in groups of high and low productivity. The data on productivity and the information on molecular markers for each line were correlated using reiterative multivariate analysis of variance. The markers were grouped according to the combinations of primers used. The confidence level used was 95%. Markers that had a presence or absence of 5% or smaller were eliminated, and for the rest, an upper bound of the variance was used, to determine the marker's meaningfulness. The analysis allowed the identification of markers statistically associated with either cocoon weight or weight of shell as well as some markers associated with both productivity traits.

*Key words:* cocoon weigh, molecular markers, productivity traits, sericulture, shell weigh.

Recibido: julio de 2005; aceptado: junio de 2006.

Universidad tecnológica de Pereira. Pereira (Risaralda), Colombia: <sup>1</sup> Centro de Biología Molecular y Biotecnología (CENBIOTEP); <sup>2</sup> Facultad de Ciencias de la Salud; <sup>3</sup> Facultad de Matemáticas

<sup>4</sup> Centro de Desarrollo Tecnológico de la Sericultura (CDTS). Pereira (Risaralda), Colombia.

Correos electrónicos: <sup>5</sup> <duberney82@netscape.net>; <sup>6</sup> <eaf578@yahoo.com>; <sup>7</sup> <serrano@utp.edu.co>;

<sup>8</sup> <AlvaroHAlegriaSA@netscape.net>.

## INTRODUCCIÓN

La acción concertada de dos o más genes individuales, como también la interacción que se presenta entre ellos y con otros genes, determinan muchas de las características fenotípicas importantes de carácter cuantitativo. Durante las pasadas cinco décadas, la aplicación de métodos basados en la genética de poblaciones cuantitativa y la estadística ha permitido el desarrollo de animales con alta eficiencia productiva. Estos modelos están basados en modelos simplificados de acción génica que asumen un gran número de genes con pequeños efectos individuales en la expresión del genotipo (poligénicos) y enfatizan el efecto genético aditivo en su interacción. Se han logrado avances en algunos de los caracteres económicamente importantes en el ganado basándose en el desempeño fenotípico; sin embargo, varias limitaciones de estos métodos de mejoramiento se han ido haciendo evidentes con el tiempo. Su eficiencia disminuye cuando las características son difíciles de medir o tienen baja heredabilidad. Adicionalmente, la selección se ha limitado generalmente a aquellas características que pueden ser adecuadamente medidas en un gran número de animales (Montaldo et al., 1998). El uso de técnicas como los marcadores moleculares (*fingerprinting*) podría ayudar a resolver algunas de las limitaciones de dichos métodos.

El gusano de seda domesticado, *Bombyx mori* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Bombycidae) ha surgido como un modelo molecular en lepidópteros. Este es uno de los insectos mejor caracterizados genéticamente, solamente superado en este aspecto por el díptero la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) (Goldsmith, 1995; Nagaraju et al., 2001). La genética bien desarrollada de esta especie incluye 400 mutaciones descritas, las cuales han sido mapeadas a más de 200 loci, comprendiendo 28 grupos de ligamiento o cromosomas (Doira, 1992). Existen además, cientos de razas geográficas y líneas genéticamente mejoradas que son mantenidas en los diferentes países en donde la sericultura es una actividad

económica importante. Estas razas y líneas difieren no solamente en sus caracteres morfológicos bien identificados, sino también en aquellos caracteres complejos o cuantitativos como son el tamaño corporal, la duración larval, la tolerancia térmica, la resistencia a enfermedades y la productividad.

En el gusano de seda casi todos los caracteres económicamente importantes tales como la fecundidad, el peso de capullo, la longitud y el grosor de la fibra y la resistencia a baculovirus son caracteres cuantitativos (poligénicos). Sin embargo, muy poco se conoce acerca del número de genes involucrados, su localización cromosómica y sus productos génicos (Nagaraju et al., 2002). Se han usado extensamente las estrategias de cruzamiento como un medio de reforzar la heterosis. Una gran cantidad de esfuerzo se ha dedicado a la obtención de híbridos, en países como Japón, China, India y otros, contribuyendo significativamente al dramático incremento en la producción de seda en el mundo (Nagaraju et al., 2001). Un gran número de marcadores morfoquímicos han sido ligados con marcadores moleculares (*fingerprinting*) (Nagaraja, 2000; Shi et al., 1995; Yasukuchi, 1998). Sin embargo, excepto para el análisis de heredabilidad y habilidad combinatorial, pocos estudios se han llevado a cabo tratando de comprender la genética de los caracteres de productividad (Chatterjee et al., 1993; Rao et al., 1991; Shibukawa et al., 1986; Tazima, 1978). Los marcadores moleculares de ADN que se encuentren estrechamente ligados a los caracteres de interés podrían usarse para seleccionar dichos caracteres utilizando técnicas tales como una población segregante de cruces de  $F_2$ , un análisis de segregantes agrupados (Michelmore et al., 1991), líneas endogámicas recombinantes (Reiter et al., 1992), o líneas isogénicas cercanas producidas (Martin, 1991) en programas de mejoramiento. Por supuesto, la efectividad de tales procesos de selección asistida por marcadores dependerá de la exactitud de la medición fenotípica del carácter de interés y de su grado de ligamiento con el marcador molecular (Nagaraju et al., 2002).

El objetivo del presente trabajo es llevar a cabo la identificación de marcadores moleculares (AFLPs) asociados con los caracteres de producción, peso del capullo y peso de la corteza, mediante el uso de análisis de varianza múltiple y regresión lineal.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización del análisis se tomaron 160 individuos de gusano de seda distribuidos de la siguiente manera: cuatro líneas de origen japonés de alta productividad, cuatro líneas de origen

japonés de baja productividad, cuatro líneas de origen chino de alta productividad y cuatro líneas de origen chino de baja productividad pertenecientes al banco de germoplasma del Centro para el Desarrollo Tecnológico de la Sericultura de Pereira (Risaralda), Colombia (tabla 1). Cada una de las líneas fué dividida en organismos de ambo sexos y para cada una de ellas se hicieron cinco réplicas con el fin de homogeneizar la varianza de los datos tomados. De esta manera para cada una de las líneas se tomaron un total de diez individuos.

**Tabla 1.** Datos de productividad para las líneas evaluadas [\* peso promedio corteza (g) de 5 machos y 5 hembras para cada una de las líneas]

| Nombre | Origen geográfico | Nivel de producción | Peso promedio capullo machos/hembras (g)* | Peso promedio corteza machos/hembras (g)* |
|--------|-------------------|---------------------|---|---|
| K 01   | japonés           | baja                | 1,53 ± 0,04/1,97 ± 0,14                   | 0,33 ± 0,019/0,37 ± 0,032                 |
| K 02   | japonés           | alta                | 1,62 ± 0,11/1,88 ± 0,12                   | 0,37 ± 0,05/0,37 ± 0,03                   |
| K 03   | japonés           | baja                | 1,50 ± 0,08/1,95 ± 0,06                   | 0,32 ± 0,05/0,36 ± 0,03                   |
| K 05   | japonés           | baja                | 1,48 ± 0,14/1,84 ± 0,08                   | 0,32 ± 0,04/0,33 ± 0,03                   |
| K 10   | japonés           | baja                | 1,53 ± 0,09/2,01 ± 0,14                   | 0,34 ± 0,02/0,38 ± 0,03                   |
| K 20   | japonés           | alta                | 1,66 ± 0,07/1,90 ± 0,30                   | 0,40 ± 0,03/0,38 ± 0,04                   |
| K 30   | japonés           | alta                | 1,66 ± 0,15/2,10 ± 0,14                   | 0,40 ± 0,03/0,42 ± 0,02                   |
| SG 2   | japonés           | alta                | 1,64 ± 0,07/2,01 ± 0,13                   | 0,41 ± 0,019/0,45 ± 0,039                 |
| CBS    | chino             | baja                | 1,37 ± 0,10/1,85 ± 0,13                   | 0,33 ± 0,03/0,38 ± 0,02                   |
| SC 1   | chino             | alta                | 1,77 ± 0,05/2,14 ± 0,17                   | 0,42 ± 0,06/0,46 ± 0,04                   |
| SC 2   | chino             | alta                | 1,66 ± 0,19/2,16 ± 0,16                   | 0,38 ± 0,05/0,45 ± 0,04                   |
| SC 3   | chino             | alta                | 1,80 ± 0,10/2,35 ± 0,26                   | 0,44 ± 0,03/0,48 ± 0,07                   |
| CC     | chino             | baja                | 1,43 ± 0,08/1,96 ± 0,06                   | 0,33 ± 0,02/0,37 ± 0,01                   |
| CA     | chino             | baja                | 1,61 ± 0,03/2,11 ± 0,004                  | 0,37 ± 0,0006/0,34 ± 0,0009               |
| CLS    | chino             | alta                | 1,77 ± 0,15 2,21 ± 0,18                   | 0,42 ± 0,04/0,45 ± 0,05                   |
| CGS    | chino             | baja                | 1,56 ± 0,13/1,98 ± 0,10                   | 0,36 ± 0,03/0,41 ± 0,04                   |

**Datos cuantitativos.** Para cada una de las muestras se tomaron datos de peso del capullo y del peso de la corteza en gramos. Este último se determinó sacando la pupa de cada uno de los capullos. El proceso fue realizado usando una balanza electrónica y los datos registrados tomando dos cifras significativas (tabla 1).

**Extracción de ADN.** El ADN genómico fue extraído a partir de la región torácica de las pupas, usando el método reportado por Chatterjee (2003). Se tomaron 0,05 gramos de tejido de pupa de cada una de las líneas a analizar, manteniéndolos refrigerados (-20 °C) mientras se procesaban. El tejido fue macerado en un tubo de microcentrifuga con 1 ml

amortiguador de extracción (glucosa 200 mM, EDTA 50 mM, Tris HCl 100 mM, SDS 0,5%, pH 9,0) a 55 °C. A cada una de las muestras se agregó 2 µl de proteinasa K (100 µg/ml) y luego se maceró la muestra periódicamente hasta no observar fragmentos. A las muestras se les añadió 100 µl de acetato de potasio 8 M, se incubaron durante 15 min a -20 °C y se centrifugaron durante 15 min a 14.000 rpm, se recuperó la fase acuosa y posteriormente, se llevó a cabo una extracción con un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) durante 5 min. Luego, se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 min y se recuperó la fase acuosa en otro tubo al que se le adicionó un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), extrayéndose durante 5 min. Después de los 5 min de centrifugación a 14.000 rpm se tomó la fase acuosa y se le agregaron dos volúmenes de etanol absoluto y 1/10 de acetato de sodio 3M para precipitar los ácidos nucleicos, se centrifugó y se descartó el sobrenadante, dejando que el precipitado se secase al aire. Posteriormente, se resuspendió en amortiguador TE (10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 8,0) y se incubó a 37 °C durante una hora después de la adición de ARNasa (100 µg/ml). El ADN fue reextraído con fenol-cloroformo y precipitado con etanol como se describió anteriormente. El ADN genómico fue resuspendido y cuantificado por espectrofotometría y su calidad observada por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% teñido con bromuro de etidio.

**AFLPs y selección de iniciadores.** Se eligieron este tipo de marcadores por ser de una alta reproducibilidad, facilidad en la implementación, determinación de alto número de polimorfismos en una sola electroforesis y por haber sido usados en trabajos previos en nuestro laboratorio. Las reacciones de AFLP (Vos et al., 1995) se llevaron a cabo usando el estuche comercial *AFLP® Analysis System I* (INVITROGEN), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La amplificación selectiva mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó usando una extensión de tres nucleótidos para ambos iniciadores. Las cinco combinaciones de iniciadores usadas fueron escogidas al azar (tabla 2). Los productos de PCR fueron mezclados con 10 µl de solución de carga para secuenciación, calentados 3 min a 90 °C y rápidamente enfriados en hielo. Se adicionaron 5 µl de la mezcla a un gel de secuencia de poliacrilamida al 6% y se sometieron a 90 W durante 1,5 h. Después de terminada la corrida el resultado fue revelado usando tinción con plata usando el estuche comercial “*Silver sequence™ DNA sequencing system*” (Promega), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El registro permanente de estos resultados se realizó mediante fotografía digital transfiriendo las imágenes a formato TIFF usando una cámara Nikon D'100.

**Tabla 2.** Marcadores identificados para cada una de las características evaluadas

| Combinación  | N.º de bandas | Bandas peso capullo  | Bandas peso corteza          | Total bandas seleccionadas |
|--------------|---------------|----------------------|------------------------------|----------------------------|
| E-ACG/M-CAA  | 68            | 6, 16, 18, 48, 49    | 2, 38, 48, 49, 64            | 10                         |
| E-ACC/M-CAC  | 69            | 2, 9, 41, 63, 65, 66 | 2, 5, 10, 17, 18, 19, 20, 55 | 14                         |
| E-ACA/M-CAG  | 71            | 33, 36, 38, 65       | 4, 65                        | 6                          |
| E-AAG/M-CAT  | 49            | 19, 26, 29, 35       | 29, 48                       | 6                          |
| E-AAC/M-CTA  | 45            | 21, 26, 27, 29, 37   | 20, 21, 37, 40, 41           | 10                         |
| <b>Total</b> | <b>302</b>    | <b>24</b>            | <b>22</b>                    | <b>46</b>                  |

**Análisis estadístico.** Para determinar cuales de los marcadores tienen una influencia significativa en la productividad se hizo un análisis de varianza múltiple

para todas las muestras, considerando como variable dependiente el peso de la corteza en primera instancia, y el peso del capullo después, y como

variables explicativas la línea, el sexo y los marcadores. La acción del marcador sobre el carácter fue determinada mediante un análisis de correlación lineal. Todos estos análisis fueron realizados empleando el programa *Statgraphics Plus* (versión 5,1) (Statgraphics, 1993). La razón para escoger como variables de estudio el peso de la corteza y el peso del capullo es que éstas son las principales variables tenidas en cuenta para medir la productividad. Cada análisis de varianza se repitió eliminando cada vez la variable explicativa con contribución menos significativa hasta llegar al punto en que todas las variables que quedaron tuvieran contribución significativa a la variable de producción. Esta sucesión de modelos permite detectar aquellos factores que tienen importancia global, es decir que no sólo son significativos comparados con la variable dependiente, sino que también contribuyen aún en presencia de los otros factores determinantes. Estos análisis se hicieron para los marcadores agrupados de acuerdo con las combinaciones de iniciadores utilizados. La significancia se fijó en el 95%.

El método propuesto no sólo permite identificar los grupos de factores de importancia, sino que es teóricamente más satisfactorio que el análisis de regresión múltiple, ya que el análisis de varianza funciona para variables discretas sin violar suposiciones ni asumir normalidad, lo que en este caso sería equivocado.

Entre los marcadores obtenidos, se estudió el problema de la uniformidad de varianza, ya que el modelo no cumple estrictamente este supuesto. A este respecto, se eliminaron los marcadores que tenían una presencia o ausencia menor al 5% (para

evitar falsos positivos) y para los restantes se dio una cota de la varianza en base a la cual se determinó la significancia del marcador en el análisis.

Se determinó cuáles marcadores tienen una influencia positiva en la variable de producción y cuáles negativa usando una regresión e identificando cuáles tienen pendiente positiva. Esta regresión sólo involucra determinar por mínimos cuadrados si la pendiente es positiva o negativa, sin hacer inferencias estadísticas que requieran suposiciones adicionales sobre las variables.

## RESULTADOS

El número de marcadores generado a partir del análisis de 16 líneas de gusano de seda con 5 combinaciones de iniciadores para AFLPs se distribuyó entre 45 y 71, con un número promedio de 60 marcadores AFLPs distribuidos en tamaños entre 30-500 pb.

**Asociación de los marcadores AFLPs con los componentes de productividad.** Para identificar las relaciones (asociación, no ligamiento) de los marcadores de ADN con los componentes de productividad se llevaron a cabo análisis de varianza para dos caracteres evaluados contra los 302 marcadores moleculares. El modelo de análisis llevado a cabo es presentado en las tablas 2 y 3. Los análisis demostraron el alto grado de significancia de los componentes línea y sexo en la explicación de la varianza para los caracteres de productividad estudiados.

**Tabla 3.** Análisis de varianza para capullo/suma de cuadrados tipo III. Ejemplo para una combinación

| Fuente          | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Cuadrados medios | Valor F | Valor p |
|-----------------|--------------------|-------------------|------------------|---------|---------|
| <b>banda 33</b> | 1                  | 0,098317          | 0,098317         | 5,51    | 0,0203  |
| <b>banda 36</b> | 1                  | 0,117545          | 0,117545         | 6,59    | 0,0113  |
| <b>banda 38</b> | 1                  | 0,124846          | 0,124846         | 7,00    | 0,0091  |
| <b>banda 65</b> | 1                  | 0,152419          | 0,152419         | 8,55    | 0,004   |
| <b>línea</b>    | 15                 | 2,097120          | 0,139808         | 7,84    | 0       |
| <b>sexo</b>     | 1                  | 6,687310          | 6,687310         | 374,96  | 0       |



**Tabla 4.** Análisis de varianza para corteza /suma de cuadrados tipo III. Ejemplo para una combinación

| Fuente de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Cuadrados medios | Valor F | Valor p |
|---------------------|--------------------|-------------------|------------------|---------|---------|
| <b>banda 4</b>      | 1                  | 0,0066868         | 0,0066868        | 4,89    | 0,0286  |
| <b>banda 65</b>     | 1                  | 0,0072661         | 0,0072661        | 5,31    | 0,0226  |
| <b>línea</b>        | 1                  | 0,0449282         | 0,0449282        | 32,85   | 0       |
| <b>sexo</b>         | 15                 | 0,225096          | 0,0150064        | 10,97   | 0       |

Los marcadores seleccionados en cada una de las combinaciones de iniciadores mediante el análisis de varianza múltiple para cada uno de los parámetros de productividad aparecen listados en la tabla 2.

La identificación de los marcadores fue hecha mediante un proceso de eliminación sucesiva de uno a uno de aquellos marcadores que daban resultados no significativos en los análisis de varianza. El número de marcadores para llevar a cabo la selección varió en peso de capullo de 4 a 6 para cada una de las combinaciones y de 2 a 8 para cada una de las combinaciones evaluadas en el carácter peso de corteza. Como se puede determinar a partir de los datos de las tablas 2 y 3, se pueden identificar bandas

comunes por ejemplo las bandas 48 y 49 de la combinación 5, mientras que otras son específicas para cada uno de los caracteres evaluados por aparte por ejemplo las bandas 6 y 38 de la combinación 5. El tipo de aporte de cada uno de los marcadores para los caracteres evaluados se determinó mediante un análisis de correlación entre cada una de las bandas y el carácter particular (tabla 5). El número de marcadores seleccionados a partir de las combinaciones individuales de iniciadores se muestran también en la tabla 2. Como se puede observar su número es variable y no parecen tener una relación directa con el número total de bandas para cada una de las combinaciones. El número total de bandas identificadas para cada uno de los caracteres evaluados fue bastante parecido.

**Tabla 5.** Correlación de las bandas más significativas con los caracteres evaluados

| Combinación        | Banda | Correlación |          |
|--------------------|-------|-------------|----------|
|                    |       | Capullo     | Corteza  |
| <b>E-ACG/M-CAA</b> | 48    | negativa    | negativa |
|                    | 49    | negativa    | negativa |
| <b>E-ACC/M-CAC</b> | 2     | positiva    | positiva |
| <b>E-ACA/M-CAG</b> | 65    | positiva    | positiva |
| <b>E-AAG/M-CAT</b> | 28    | positiva    | positiva |
| <b>E-AAC/M-CTA</b> | 21    | positiva    | negativa |
|                    | 37    | positiva    | positiva |
|                    | 40    | positiva    | positiva |

## DISCUSIÓN

La aplicación de marcadores moleculares es una herramienta nueva en el estudio para el mejoramiento en gusano de seda. Esta es una estrategia orientada

directamente a la búsqueda de las características genómicas que rigen las características cuantitativas de los organismos. Se han reportado varios trabajos utilizando esta estrategia (Dekkers, 2004). El genoma de gusano de seda demostró ser un

excelente modelo de análisis en programas de “*fingerprinting*” de ADN para la identificación de marcadores asociados a caracteres de productividad. El peso de capullo y de corteza son dos caracteres importantes económicamente y por más de medio siglo los investigadores han tratado de identificarlos físicamente en el genoma. El presente análisis intentó identificar marcadores presentes en un grupo de individuos con características contrastantes de productividad sin que éstas llegasen a tener una distribución extrema.

**Asociación entre marcadores y componentes de productividad.** Se han aplicado diferentes estrategias estadísticas para lograr una aproximación a la asociación entre marcadores moleculares y atributos de productividad. El hecho de que la información de cada marcador sea sólo de presencia o ausencia, hace que las inferencias de una regresión no se puedan usar plenamente de acuerdo con el supuesto de normalidad. A cambio, el análisis de varianza múltiple no hace esta exigencia a sus variables y permite obtener conclusiones sobre la significancia de la contribución de estas variables. El único punto a discutir es la suposición de uniformidad de las varianzas; al respecto se puede argumentar que se evitaron los casos extremos en los que la proporción de presencia es menor al 5% o mayor al 95%, y se usó el método sin evaluar las varianzas individuales. Los análisis de varianza múltiples permitieron la identificación de 46 bandas o marcadores mediante el uso de un pequeño número de combinaciones de iniciadores AFLPs, que mostraron una asociación significativa con los dos componentes de productividad estudiados. Los resultados obtenidos abren la posibilidad de aislar bandas específicas, la posible identificación y caracterización de su secuencia y la determinación de la función de ésta en el genoma. Adicionalmente, tales huellas pueden ayudar en programas de selección asistida por marcadores (**MAS**) en germoplasmas promisorios y su uso puede aprovecharse en programas de mejoramiento molecular (Chatterjee y Pradeep, 2003; Sethuraman et al., 2002). El éxito de tales programas de

selección dependerá exclusivamente del grado de ligamiento entre los marcadores y loci relevantes tales como loci de caracteres cuantitativos (**QTLs**). Esto requerirá de estudios adicionales de marcadores específicos seleccionados a partir de tales análisis. Sin embargo, los marcadores identificados en el presente trabajo son un importante punto de partida para evaluación en futuros trabajos.

Los análisis demuestran la gran importancia del componente sexo en este tipo de aproximaciones a la identificación de marcadores asociados a caracteres de productividad. Este se convierte en un carácter que debe ser siempre evaluado, con el fin de evitar la identificación de caracteres asociados con sexo y que estén siendo falsamente asociados con altos o bajos niveles de productividad, ya que como se sabe las hembras presentan tamaños mayores y se alimentan en mayor cantidad que el de los machos. Sin embargo, esto no se traduce en una mayor productividad ya que esta energía es utilizada en el desarrollo de huevos y no en la producción de seda.

Los análisis de correlación entre la banda y el carácter para determinar el efecto de tener el marcador presentaron resultados con asociación positiva y negativa para la presencia del marcador. En otros casos, se presentaron marcadores comunes a peso de capullo y de corteza. El aporte de estos marcadores comunes resultó en algunos casos positivo para ambos, mientras que en otros este aporte resultó ser positivo para un carácter y negativo para el otro. Este resultado muestra que no necesariamente un mayor peso de capullo se ve reflejado en un mayor porcentaje de corteza y parece ser que los caracteres son controlados por genes diferentes, lo cual confirma las evidencias reportadas por los trabajos de He et al. (1998).

Los análisis que deberán proseguir deben basarse en el análisis de la segregación de los marcadores identificados en progenies y la determinación de su efecto en los individuos. Se espera poder llevar a cabo análisis posteriores con marcadores

codominantes que permitan identificar los alelos para cada locus identificado y el efecto de éste sobre el carácter. El presente trabajo representa un aporte a la identificación de marcadores moleculares asociados con caracteres de importancia agronómica en poblaciones de gusano de seda.

## REFERENCIAS

- Chatterjee SN, Mohandas TP.** 2003. Identification of ISSR markers associated with productivity traits in silkworm, *Bombyx mori* L. *Genome*, 46(3):439-447.
- Chatterjee SN, Pradeep AR.** 2003. Molecular markers (RAPD) associated with growth, yield, and origin of the silkworm, *Bombyx mori* L. in India. *Genetika*, 39(12):1612-1624.
- Chatterjee SN, Rao CGP, Chatterjee GK, Aswath SK, Patnaik AK.** 1993. Correlation between yield and biochemical parameters in the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 87(3):385-391.
- Dekkers J.** 2004. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. *Journal of Animal Science*, 82 (E. Suppl.):E313-E328.
- Doira H.** 1992. *Genetical stocks and mutations of Bombyx mori: important genetic resources. Linkage maps and list of genetical stocks maintained in Kyushu University.* Institute of Genetic Resources, Kyushu University. Kyushu, Japan.
- Goldsmith MR.** 1995. Genetics of the silkworm: revisiting an ancient model system. Pp. 21-76. *En: Goldsmith MR, Wilkins AS (eds.). Molecular model systems in the Lepidoptera.* Cambridge University Press. New York (NY), E. U. A.
- He KR, Huang JH, Zhu XR.** 1998. The loci of genes located on sex-chromosome of silkworm (*Bombyx mori*) responsible for the cocoon weight and cocoon shell weight and their effect analysis. *Sericologia*, 38(1):43-54.
- Martin GB, Williams JGK, Tankley SD.** 1991. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near isogenic lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (U. S. A.), 88:2336-2340.
- Michelmore RW, ParanI, Kesseli RV.** 1991. Identification of markers linked to disease resistance gene bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic region using segregation population. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (U. S. A.), 88:9828-9832.
- Montaldo HH, Herrera CA.** 1998. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(2):83-89.
- Nagaraja GM.** 2000. Genetic analysis of *Bombyx mori* L. using random amplified polymorphism DNA (RAPD) markers. Ph.D. Thesis. University of Mysore. Mysore, India.
- Nagaraju J, Goldsmith MR.** 2002. Silkworm genomics - progress and prospects. *Current Science*, 83(4):415-425.
- Nagaraju J, Klimenko V, Couble P.** 2001. The silkworm, *Bombyx mori*: A model genetic system. Pp. 219-239. *En: Reeve ECR (ed.). Encyclopedia of genetics.* Ffitzroy Dearborn Publisher. Londres, Inglaterra.
- Rao GS, Das SK, Das NK.** 1991. Genetic divergence among fifteen multivoltine genetic stocks of silkworm (*Bombyx mori* L.). *Indian Journal of Sericulture*, 30:72-74.
- Reiter RS, Williams JGK, Feldeman KA, Rafalski JA, Tingey SV.** 1992. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (U. S. A.), 89:1477-1481.
- Sethuraman BN, Mohandas TP, Chatterjee SN.** 2002. DNA fingerprinting with homologous multilocus probes and search for DNA markers associated with yield attributes in silkworm, *Bombyx mori*. *European Journal of Entomology*, 99(3):267-276.

## AGRADECIMIENTOS

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



- Shi J, Heckel DG, Goldsmith MR.** 1995. A genetic linkage map for the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, based on restriction fragment length polymorphism. *Genetical Research*, 66(2):109-126.
- Shibukawa A, Eguchi R, Shimajaki A, Ichida M.** 1986. Studies on the cocoon quality of the silkworm stock culture of the sericulture experiment station. *Technical Bulletin of Sericultural Experiment*, 129:1-34.
- Statgraphics.** 1993. Statgraphics Plus (version 5,1). Statistical graphics systems. Magnugisties Inc. Rockville (MD), E. U. A.
- Tazima Y.** 1978. *The genetics of silkworm*. Logos Press. New York (NY), U. S. A.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Friters A, Pot J, Paleman J, Kuiper M, Zabeau M.** 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23:4407-4414.

