

JOICE FELIPES BARBOSA

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE DA CADEIA
LEVE DA FIBROÍNA EM *Bombyx mori* L.**



Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração - Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Doutora em Ciências Biológicas.

Maringá - 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JOICE FELIPES BARBOSA

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE DA CADEIA
LEVE DA FIBROÍNA EM *Bombyx mori L.***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração - Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Doutora em Ciências Biológica.

Maringá - 2007

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

B238a	<p>Barbosa, Joice Felipes Análise do polimorfismo do gene da cadeia leve da fibroína em <i>Bombyx mori L.</i> / Joice Felipes Barbosa. – Maringá, PR : [s.n.], 2007. 21 f. + 26 f. : il. color.</p> <p>Orientador : Prof. Dr. Maria Aparecida Fernandez Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá. Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2007.</p> <p>1. Bicho da seda (<i>Bombyx mori L.</i>) - Polimorfismo. 2. Bicho da seda (<i>Bombyx mori L.</i>) - Variabilidade de matrizes. 3. Bicho da seda (<i>Bombyx mori L.</i>) - Análise genética e molecular. I. Universidade Estadual de Maringá. Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas. II. Título.</p>
CDD 21.ed.638.2	

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

BIOGRAFIA

Joice Felipes Barbosa, filha de Nazir Felipes e Nilda Paulucio Felipes, nasceu em 14 de Dezembro de 1975, na cidade de Nova Esperança, Estado do Paraná. Diplomou-se em janeiro de 2000 em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá, com habilitações em licenciatura e bacharelado. No dia 30 de Abril de 2003 recebeu o grau de Mestre em Ciências Biológicas (área de concentração Genética) pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP no instituto de Biociências na cidade de Botucatu – SP. Em agosto do mesmo ano iniciou o Curso de Doutorado em Ciências Biológicas (área de concentração Biologia Celular e Molecular) pela Universidade Estadual de Maringá, na qual finaliza o curso com a defesa da tese no dia 28 de setembro de 2007.

A Deus, por ser minha rocha e meu escudo.

Aos Meus pais, Nazir e Nilda por estar sempre ao meu lado

Ao Meu grande amor, Amarildo por ser tão especial e me fazer tão feliz.

Agradecimentos

À professora Drª. Maria Aparecida Fernandez pelo exemplo de luta, persistência e amor a pesquisa, a sua amizade, dedicação e apoio.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) pela oportunidade concedida para o aperfeiçoamento científico.

Aos docentes do curso de pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá

Aos colegas do laboratório de Organização Funcional do Núcleo, pela amizade e troca de experiência técnico-científico.

Aos colegas Marli e Valmir pelo apóio técnico, dedicação e companheirismo.

A COCAMAR, e todos os funcionários envolvidos no setor de sericicultura pelo fornecimento do material biológico e ensinamentos propiciando oportunidade para obtenção de novos conhecimentos

Ao Sr. Jorge pela sua atenção e dedicação ao Bicho da seda e contribuição no cultivo do inseto

A minha irmã Sandra e meu cunhado Mario pelo apóio contínuo, palavras encorajadoras e carinho que me fortalece e me dá forças nos momentos difíceis.

As minhas sobrinhas Isabela e Isadora pela alegria e pela leveza de criança que transborda e me contagia

Ao CNPq que me proporcionou apoio financeiro dando condições de uma dedicação exclusiva neste trabalho

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho

Apresentação

Esta tese é composta de dois manuscritos:

Barbosa JF, Bravo JP, Zanatta DB, Silva JLC, Fernandez MA. Variabilidade alélica em linhagens de *Bombyx mori* detectadas através da metodologia CSGE (Conformation-Sensitive Gel Electrophoresis). Será submetido a *Genetics and Molecular Research*.

Barbosa J. F., Bravo J. P., Zanatta D. B., Silva J. L. da C, Balani V. A., Fiorini A. Fernandez M.A. The analysis of the fib-L gene third intron from *Bombyx mori* strains reveals that the sequence involved in the *Nd-s^D* mutation is localized in a conserved segment with intrinsic bent DNA. Será submetido a *Genetica*.

Resumo

Conformation-sensitive gel electrophoresis (CSGE) é uma metodologia utilizada para identificar diferentes alelos e polimorfismo entre os indivíduos. Esse método não só detecta substituições nucleotídicas e pequenas deleções, mas também gera marcadores moleculares co-dominantes. O objetivo deste trabalho foi identificar a variabilidade genética na seqüência do terceiro intron do gene da cadeia leve da fibroína, *fib-L*, entre 16 matrizes de *Bombyx mori L.* do banco de germoplasma UEM/ACESP, sendo 13 matrizes no primeiro artigo e 3 no segundo. Os resultados revelaram que cinco matrizes, quatro chinesas (C21A, C14, C121A e C122B) e uma japonesa (HAB) não apresentam alelos com alterações, mostrando somente moléculas homoduplex. As outras matrizes apresentam alelos diferentes dividindo-se em três perfis de heteroduplex, perfil A, B e C. As matrizes de perfil A mostraram um polimorfismo significativo caracterizado por uma deleção de 12 pares de bases. As matrizes de perfil B caracterizam-se por apresentarem alterações nucleotídicas pontuais e a matriz de perfil C mostra uma mistura dos dois perfis A e B apresentando a deleção de 12 pb e também alterações pontuais no decorrer de sua seqüência. Foram clonados e seqüenciados os dois alelos dos perfis A e B e um dos alelos do perfil C. A identificação desses três perfis de formação de moléculas heteroduplex foi utilizada, conjuntamente com clivagem por enzimas de restrição, na identificação de variabilidade alélica em subfragmentos da matriz M12B. A análise por CSGE, combinada com a clivagem por enzimas de restrição, mostrou potencialidade adicional dessa metodologia na determinação da variabilidade alélica.

Para região analisada em *Bombyx mori* foi descrita a mutação denominada *Nd-S^D*. Esta mutação é devida a uma deleção após o exon III do gene da *fib-L*, e sua recombinação com seqüências localizadas após o gene (exons IV' e V'). Esta recombinação forma um gene quimérico, contendo os três primeiros exons mais os dois novos exons (IV' e V'). A quimera *Nd-S^D* perde a Cys-172, que está no sexto exon da cadeia normal e por consequência não pode formar ponte de dissulfeto com a cadeia pesada do gene da fibroína. Essa alteração prejudica a produção de seda no casulo, uma vez que, menos de 1% do nível da secreção normal de fibroína é produzida pela glândula sericígena do bicho de seda, formando um casulo muito fino constituído principalmente de sericina, podendo, ser visualizada a pupa no seu interior.

A análise do polimorfismo de seqüências de DNA entre indivíduos das matrizes HAB, C121A e C122B, as quais não apresentaram moléculas heteroduplex foi realizada com o objetivo de evidenciar polimorfismo entre os indivíduos e fatores associados à formação da mutação *Nd-S^D* descrita para esse intron. O alinhamento, através de ClustalW, das seqüências de três indivíduos de cada uma dessas matrizes com duas outras seqüências previamente descritas no banco de dados, a da matriz japonesa J129 e uma linhagem híbrida, mostrou que esse intron possui dezesseis regiões conservadas, com 12 a 62 pares de bases, representando 51,60% do total do tamanho do intron. Com o alinhamento foi possível construir uma árvore filogenética onde os indivíduos da japonesa HAB segregaram separadamente dos indivíduos da chinesa C121A. Entretanto, os indivíduos da matriz chinesa C122B segregaram separadamente. O indivíduo 1 ficou associado à japonesa HAB, o indivíduo 2 com a linhagem híbrida e o indivíduo 3 com a chinesa C121A.

Estes resultados demonstraram que a matriz Chinesa C122B apresenta alta variabilidade, uma linhagem mista que pode agrupar com Chinesa, Japonesa ou híbrida. Esse tipo de segregação em *B. mori*, de diferentes localidades geográficas, pode ter diferentes explicações. Por exemplo, esse fato pode ser indicativo de fluxo gênico entre populações distintas geograficamente. Alternativamente, pode ser sugerido que uma população ancestral recente determine a formação de grupos geográficos modernos ou de grupos originados de outras regiões e/ou uma nova população, derivada de cruzamentos não controlados. A combinação desses cenários também é possível.

Em todas as seqüências dos indivíduos das matrizes HAB, C121A e C122B foram detectados, através de análise eletroforética e *in silico*, sítios intrínsecos de DNA curvo (DNA *bent*). O pico principal dessa curvatura foi encontrado dentro do segmento de 16 pares de bases, contido dentro de um segmento conservado do intron, envolvido na quebra e recombinação quando da ocorrência da mutação *Nd-s^D*. Em conjunto, esses resultados sugerem que a curvatura intrínseca desse segmento no intron 3 do gene da cadeia leve da fibroína em *Bombyx mori* pode mediar à clivagem do DNA e intensificar a ocorrência de eventos de recombinação nesse segmento cromossômico.

Summary

Conformation-sensitive gel electrophoresis (CSGE) is a methodology used to identify alleles and individuals polymorphism. The method not only detects nucleotide substitutions and slight deletions but also produces co-dominant molecular markers. The aim of this work was identified the genetic variability in the third intron sequence of the fibroin light chain gene among 16 strains of *Bombyx mori* L. of the germoplasm bank at the State University of Maringá / ACESP. The results show that five strains, four Chinese (C21A, C14, C121A and C122B) and one Japanese (HAB), had no modified alleles and merely exhibited homoduplex molecules. The other strains show different alleles divided into two heteroduplex profiles, A and B. The profile A showed a significant polymorphism, characterized by 12 base pairs deletion. This polymorphism may be present or absent in the two alleles and may produce homoduplex or heteroduplex molecules. Besides the above-mentioned polymorphism, specific nucleotide alterations have also been detected among alleles which produce the other heteroduplex profile, profile B. Were cloned and sequenced the two alleles of heteroduplex profile A acted by strains HAAi2 and B for strains C24-2, and one alleles of heteroduplex profile C for strain M12B . Coupled to cleavage by restriction enzymes, identification of both heteroduplex molecule profiles was employed in the identification of allele variability in strain M12B sub-fragments. CSGE analysis and cleavage by restriction enzymes showed an additional potentiality in the method to determine allele variability.

Nd-S^D mutation has been described for the analyzed region in *Bombyx mori*. This mutation is produced by deletion downstream from exon III, which causes the recombination of sequences with far downstream region sequences. In this case is

formed a chimera gene with the first three exons of the light chain gene and two new exons IV' and V'. Chimera *Nd-S^D* loses Cys-172 on the sixth exon of the normal chain. Consequently, the latter cannot build a disulfate bridge with the fibroin heavy chain gene. Alteration impairs silk production in the cocoon since less than 1% of normal fibroin secretion level is produced by the silk gland of the silkworm. In fact, it produces such a thin cocoon, mainly made up of sericine, and the pupa can be visualized inside the cocoon.

The polymorphism among individuals of strains HAB, C121A and C122B, which not show heteroduplex molecules, was analyzed to detect polymorphism between the individuals and the factors associated to the formation of *Nd-S^D* mutation described for the intron. ClustalW-alignment of sequences of three individuals of each strain with two other sequences previously described in the data bank, Japanese strain J129 and a hybrid strain, showed that intron has sixteen conserved regions with 12 to 62 base pairs, accounting for 51.60% of total intron size. A phylogenetic tree was thus built through alignment in which Japanese HAB individuals group themselves separately from Chinese C121A ones, but Chinese strain C122B individuals group themselves separately. Individual 1 associated itself to Japanese HAB; individual 2 associated itself to the hybrid strain and individual 3 associated itself to Chinese C121A.

These results demonstrated that the Chinese C122B strain represents a high variability, a mixed race that can group together with the Chinese, Japanese and also with the hybrid. The intermixed segregation of *B. mori* strains from different geographic locations may have different explanations. For example, it might be an indication of gene flow among geographic populations. Alternatively, it may suggest that a relatively recent ancestral population gave rise to modern geographic groups

or group originated from another region and/or new population, derived for a non controlled breeding. A combination of these scenarios would be also possible.

Bent DNA intrinsic sites were also detected in all sequences of strains HAB, C121A and C122B by electrophoretic and in silico analyses. Main curve peak was found within the 16-base pair segment in the interior of a conserved intron segment involved in the breaking and recombination during *Nd-s^D* mutation. As a whole, results suggest that the segment's intrinsic curve in intron 3 of the fibroin light chain gene in *Bombyx mori* may mediate DNA cleavage and intensify recombination event occurrence in the chromosome segment.

Variabilidade alélica em linhagens de *Bombyx mori* detectadas através da metodologia CSGE (Conformation-Sensitive Gel Electrophoresis)

Joice Felipes Barbosa, Juliana Pereira Bravo, Daniela Bertolini Zanatta, José Luis da Conceição Silva and Maria Aparecida Fernandez*.

Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá - 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

* Autor para correspondência:

Maria Aparecida Fernandez

Departamento de Biologia Celular e Genética

Universidade Estadual de Maringá

Av. Colombo, 5790

87020-900 – Maringá, Paraná, Brasil

Phone: 55 (44) 3261 4700

Fax: 55 (44) 3261 4893

E-mail address: aparecidafernandez@gmail.com

Título resumido: variabilidade alélica em linhagens de *B. mori*

Resumo Conformation-sensitive gel electrophoresis (CSGE) é uma metodologia informativa na identificação de diferentes alelos e de polimorfismo entre os indivíduos, capaz de detectar substituições nucleotídicas e pequenas deleções, além de ser um método que gera marcadores moleculares co-dominantes. O objetivo deste trabalho foi identificar a variabilidade genética na seqüência do terceiro intron do gene da cadeia leve da fibroína, *fib-L*, entre 13 matrizes de *Bombyx mori* L. do banco de germoplasma UEM/ACESP. Os resultados indicaram que as matrizes C21A e C14 não apresentam alelos com alterações, mostrando somente moléculas homoduplex semelhante às matrizes HAB, C121A e C122B analisados em outros estudos em nosso laboratório. As outras matrizes apresentam alelos diferentes dividindo-se em três perfis de heteroduplex, perfil A, B e C. As matrizes de perfil A mostraram um polimorfismo significativo caracterizado por uma deleção de 12 pares de bases. As matrizes de perfil B caracterizam-se por apresentarem alterações nucleotídicas pontuais e a matriz de perfil C mostra uma mistura dos dois perfis A e B apresentando a deleção de 12 pb e também alterações pontuais no decorrer de sua seqüência. Foram clonados e sequenciados os dois alelos dos perfis A e B e um dos alelos do perfil C. A identificação desses dois perfis de formação de moléculas heteroduplex foi utilizada, conjuntamente com clivagem por enzimas de restrição, na identificação de variabilidade alélica em subfragmentos da matriz M12B. A análise por CSGE, combinada com a clivagem por enzimas de restrição, mostrou potencialidade adicional dessa metodologia na determinação da variabilidade alélica.

Palavras-chave: CSGE, variabilidade alélica, *Bombyx mori*, cadeia leve da fibroína.

INTRODUÇÃO

O bicho da seda, *Bombyx mori* L., pertence à segunda maior ordem de insetos, lepidóptera, a qual apresenta mais de 140.000 espécies. Esse grupo taxonômico é altamente diversificado que inclui algumas das pestes agrícolas mais destrutivas do mundo (Reagan e Flynn, 1986), como também muitos insetos utilizados para a produção econômica, como o *B. mori*. O bicho da seda é importante economicamente devido sua grande participação na indústria de seda em muitos países ao redor do mundo. Ao longo da história da sua domesticação, foram desenvolvidas e mantidas milhares de matrizes de bicho da seda. Mesmo sendo matrizes diferentes adquiridas em diversas partes do mundo, algumas são semelhantes em aspectos morfológicos (por exemplo, formato e cor do corpo da larva e forma do casulo (Li et al., 2005).

Pesquisas em matrizes de bicho da seda e suas aplicações têm uma grande importância para a produção de seda, podendo melhorar significativamente a quantidade e qualidade do fio de seda produzido comercialmente (Li et al., 2005). Além disso, o grande número de matrizes dentro de uma única espécie tem sido o foco de estudos do papel da diversidade genética durante e depois da domesticação deste inseto (Goldsmith et al., 2005).

Até recentemente, a maioria dos conhecimentos genéticos sobre o bicho da seda fundamentava-se principalmente em características morfológicas externas, apesar de haver também estudos nas áreas de fisiologia e bioquímica (Yi, 1990). Essas pesquisas eram restritas a estudos dos caracteres morfológicos que são limitados para estudo genético, utilizados na identificação de matrizes e suas gerações (Fujii, 1998). Desta forma, outros métodos foram desenvolvidos para revelar as inter-relações genéticas das diferentes matrizes do bicho da seda (Li et al., 2005).

Novas técnicas moleculares foram desenvolvidas como RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism; Botstein et al., 1980), RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA; Williams et al., 1990), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; Vos et al., 1995), SSRs (Simple Sequence Repeats; Tautz 1989) e CSGE (Conformation-Sensitive Gel Electrophoresis; Ganguly et al., 1993). Essas metodologias vêm sendo usadas em estudos de diversidade genética, identificação de matrizes, mapas de ligação, identificação de alterações na seqüência de DNA e como poderosas ferramentas molecular para seleção de muitas espécies (Li et al., 2005).

A CSGE é uma análise capaz de detectar substituições nucleotídicas e pequenas deleções tendo a grande vantagem de ser um método que gera marcadores moleculares co-dominantes. Na análise de CSGE o gene alvo é amplificado por PCR e os produtos obtidos são desnaturados e novamente anelados. Neste processo são formadas 4 moléculas diferentes, resultado da combinação das fitas de DNA de alelos distintos (heterozigotos): duas moléculas homoduplex com perfeita complementaridade entre as fitas (mutante com mutante (mt-mt) e selvagem com selvagem (wt-wt)) e duas moléculas heteroduplex que resultam da mistura de uma fita que contém a mudança nucleotídica com a fita selvagem (mt-wt e wt-mt). O re-anelamento destes produtos de PCR pode ser detectado por DHPLC (cromatografia denaturante de alta performance; Underhill et al., 1997), clivagem química (Cotton et al., 1988) ou enzimática (RNase cleavage assay; Goldrick et al., 1996). A análise das moléculas heteroduplex pode ser realizada através de eletroforese em condições denaturantes, (método CSGE), como a utilizada neste trabalho (Ganguly, 1993; 2002), por capilar (Velasco et al., 2007) ou de gradiente denaturante (método DGGE - Fischer e Lerman, 1983). A

detecção das bandas pode ser obtida pela coloração em prata, brometo de etídeo, radioatividade (usando nucleotídeos marcados na PCR) ou através de marcadores fluorescentes (incorporados durante a PCR através de “primers” fluorescentes).

O princípio da técnica CSGE é que há uma diferença de conformação entre as fitas de DNA homoduplex (fitas de DNA semelhantes) e heteroduplex (fitas de DNA diferentes devido às alterações), em solventes levemente desnaturantes que promovem rotações das bases mutadas na dupla hélice (Ganguly et al., 1993). As diferenças conformativas entre as fitas de DNA homoduplex e heteroduplex geram alterações na mobilidade eletroforética, de maneira que o DNA contendo uma das fitas alteradas apresenta migração retardada no gel. A mutação em um único par de nucleotídeo pode ser detectada através do CSGE (Markoff et al., 1998).

O seqüenciamento do DNA é considerado uma ótima estratégia para a descoberta de mutação em genes que possam causar doenças ou alterações significativas no fenótipo e é capaz de descobrir todas as variantes de DNA com exceção de grandes rearranjos. O seqüenciamento de genes com muitas mutações distribuídas ao longo do fragmento analisado é particularmente um trabalho intensivo, caro e demorado, e muitas vezes, não pode ser obtido, pois se a mutação for alélica, os diferentes alelos contribuirão para fragmentos com tamanhos iguais, mas seqüências diferentes. Portanto, é essencial estabelecer estratégias, simples e segura com baixo custo-efetivo e reproduzibilidade, para detectar variações no DNA (Velasco et al., 2007).

Nosso objetivo foi utilizar a metodologia CSGE para estudar a diversidade genética entre matrizes de *B. mori*. A região analisada foi o terceiro intron do gene da cadeia leve da fibroína, fib-L, que apresenta polimorfismos (Yasukochi, 1999) e na qual foi descrita a mutação *Nd-S^D* (Takei, et al., 1987). Esta mutação é devida a

uma deleção de toda a seqüência após o exon III e recombinação com a seqüência à jusante do gene, denominados de exons IV' e V' (Mori et al., 1995). Esta recombinação forma um gene quimérico contendo os três primeiros exons do gene da cadeia leve da fibroína e dois novos exons (IV' e V'). A quimera *Nd-S^D* perde a Cys-172, que está no sexto exon da cadeia normal e por consequência não pode formar ponte de dissulfeto com a cadeia pesada do gene da fibroína (Inoue et al., 2005). Essa alteração prejudica a produção de seda no casulo, uma vez que, menos de 1% do nível da secreção normal de fibroína é produzida pela glândula sericígena do bicho de seda formando um casulo muito fino constituído principalmente de sericina, podendo, ser visualizada a pupa no seu interior (Takei et al., 1987).

Através do método CSGE, o intron 3 da cadeia leve do gene da fibroína, *fib-L*, de 3 matrizes de *B. mori*, HAB, C121A e C122B, foram analisados em estudos anteriores, os resultados mostraram que os indivíduos das 3 matrizes eram homozigotos, o que permitiu definir que as alterações encontradas nas seqüências dos produtos amplificados eram entre indivíduos e as matrizes (Felipes et al., 2006). Neste presente trabalho 13 outras matrizes do banco de germoplasma foram analisadas, sendo que a clonagem e seqüenciamento de alelos distintos foram obtidos para três matrizes. A identificação de três perfis de formação de moléculas heteroduplex foi utilizada, conjuntamente com clivagem por enzimas de restrição, na identificação de variabilidade alélica. A análise por CSGE, combinada com a clivagem por enzimas de restrição, mostrou potencialidade adicional dessa metodologia na determinação da variabilidade alélica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material biológico

As matrizes de *B. mori* foram cedidas pela COCAMAR (Cooperativa Agroindustrial) de Maringá, Estado do Paraná, Brasil, para Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná, Brasil. As matrizes analisadas neste trabalho são HAA, M19-2, M11A, M12B, M102, M18-2, J1, C209, C25B, C24-2, C24A, C21A e C14. Estas matrizes foram mantidas a 25°C e alimentadas com amora fresca colhida na fazenda da COCAMAR.

Extração de DNA

Para a matriz HAA, o DNA genômico de três indivíduos foi extraído de glândulas sericígenas de lagartas na quinta idade. Para as outras matrizes, o DNA foi extraído de um conjunto de indivíduos de lagartas na primeira idade. Para as extrações, em ambos os casos, foi utilizado o protocolo previamente descrito por Mills and Goldsmith (2000), com modificações. Os pares de glândulas foram dissecadas e incubadas em 3 ml de tampão de extração (1.5% sarcosil, 50 mM EDTA, pH 8,0, 10 mM NaCl, e 1 mg/ml de proteinase K) durante 2-3 horas a 50°C. As amostras de lagarta foram maceradas em nitrogênio líquido e em seguida, incubadas com tampão de extração durante 2-3 horas a 50°C. O DNA foi purificado através de extração com clorofórmio e álcool isoamílico 24:1 e três extrações com fenol pH 8,0. O DNA foi precipitado com 0,7 volume de isopropanol e 0,2 M de NaCl. O precipitado foi obtido por centrifugação e dissolvido em tampão de eluição, TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, pH 8,0) e tratado com RNase. A concentração de DNA foi determinada a 260 nm em espectrofotômetro.

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os iniciadores para a amplificação da região do terceiro intron do gene *fib-L*, foram desenhados através do software FAST-PCR (versão 3.5.30 de Ruslan Kalendar). As seqüências dos iniciadores foram 5'-ACGTCGATGGACTACGTCG-3' e 5'-CGGACCTGACGCCGTCTGTG-3', que são complementares ao final do terceiro exon e início do quarto exon respectivamente. A reação de PCR foi realizada num volume final de 15 μ l, contendo 2.5 mM dNTPs, 100 ng of DNA, 25 pmol de cada iniciador , 1 X tampão para PCR (com 1.5 mM de MgCl₂) e 1 unidade

da enzima Taq Polymerase (Invitrogen). As condições de amplificação para as matrizes foram de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 58°C, 1 minuto a 72°C, e uma extensão final de 10 minutos a 72°C. O produto de PCR, de aproximadamente 900 pares de base (pb), foi detectado em eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão 1X TBE (45 mM Tris-borato, 1mM EDTA, pH 8.0), por 3.5 Volts/cm à temperatura ambiente.

Conformation-sensitive gel electrophoresis (CSGE)

Para formação de heteroduplex e homoduplex, os produtos de PCR das 13 matrizes foram desnaturados a 95°C for 10 minutos, e em seguida anelados por 1 hora a 60°C. Antes da eletroforese, 4 µl do produto de PCR foram misturados com 4 µl de etileno glicol 20% (Sigma) 30% formamida contendo 0.025% de xileno cianol e azul de bromofenol. O gel de CSGE foi preparado com uma solução de acrilamida 40% (39.6 g de acrilamida, Gibco BRL, e 0.4 g de 1,4-Bis acryloyl piperazine (Fluka)) em um volume de 100 ml. O tampão de corrida usado foi 0.5X TTE (43.04 g de Tris-HCl, 14.24 g de taurine e 0.28 g de EDTA em 130 mL, pH 9.0). O gel foi submetido a uma pré-corrida de 200 Volts por 1 hora e, em seguida, foram aplicadas as amostras e a eletroforese foi mantida a 250 Volts por 16 horas à temperatura ambiente. O gel foi corado com 0.1 µg/mL de brometo de etídeo (Sigma) em água e foto-documentado pelo sistema UVP (Biolimaging System under UV light).

Enzimas de restrição e CSGE

Para detectar diferentes perfis do heteroduplex associados a fragmentos de restrição, o produto de PCR de 3 matrizes com padrões polimórficos distintos, M12B, HAA.i2 e C24-2 foram submetidos a digestão com a enzima de restrição *KpnI*. Os fragmentos de restrição foram analisados por CSGE. Depois da corrida, o gel foi corado com brometo de etídeo 0.1 µg/mL e foto-documentado pelo sistema UVP (BiolImaging System under UV light).

Clonagem e Seqüenciamento

O produto de PCR das matrizes, M12B, HAAi2 e C24-2 foi purificado através do QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) e clonado pelo PCR Cloning Kit (Qiagen) em plasmídeo pDrive. As reações de seqüenciamento foram feitas utilizando o Kit DYEnamic ET Dye Terminator (Amersham Biosciences) com iniciadores universal e reverso. As reações foram aplicadas no seqüenciador de DNA automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences) e as seqüências obtidas foram analisadas através do ClustalW.

RESULTADOS

Análise por CSGE

A análise de CSGE visou detectar variabilidade alélica no produto de PCR de 903 pb referente ao intron 3 do gene da cadeia leve da fibroína, *fib-L*, de *Bombyx mori*. A análise foi realizada em 12 matrizes, através de amostras de um conjunto de

indivíduos e em 1 matriz (HAA) através de amostras de glândula sericígena de 3 indivíduos separados.

Os resultados obtidos indicaram que as matrizes C21A e C14 são as únicas que não apresentaram alterações entre seus alelos. Resultados similares foram descrito anteriormente por nosso grupo de pesquisa para as matrizes HAB, C121A e C122B (Felipes et al. 2006). As demais mostraram moléculas de DNA heteroduplex no CSGE.

Nas matrizes com moléculas heteroduplex, observamos que havia diferença no padrão de bandas no CSGE, determinando diferentes perfis de heteroduplex. Diferenciamos dois tipos de perfis, Perfil A e Perfil B. O perfil A incluiu as matrizes HAAi2, M19-2, M11A, M12B, M102, M18-2, J1 e C209 e o perfil B, as matrizes C25B, C24-2 e C24-A. Na Figura 2, podemos observar os dois perfis representados por 5 matrizes M12B, M11A, M19-2 no perfil A e C25B e C24-2 no perfil B e 1 matriz (C21A) com moléculas homoduplex. Para a matriz HAA observamos que somente indivíduo de número 2 (HAAi2) apresentava moléculas heteroduplex com perfil A, os dois outros indivíduos (HAAi1 e HAAi3) apresentaram moléculas homoduplex.

Todas as matrizes (C25B, C24-2 e C24-A), inclusa no perfil B, mostravam nos géis de CSGE 3 bandas com padrão bem característico e muito semelhante. Portanto, no perfil A observamos que a matriz M12B mostrava uma pequena diferença entre a migração de suas bandas quando comparadas com as outras matrizes do mesmo perfil. Para verificarmos a variabilidade da M12B, identificar se seus alelos são iguais das matrizes do perfil B, analisamos os produtos de amplificação por endonucleases de restrição e observamos suas respectivas moléculas heteroduplex.

Análise do perfil de variabilidade alélica

O produto de PCR das matrizes C24-2, HAAi2 e M12B foram submetidos à clivagem com a enzima de restrição *KpnI*, com o objetivo de comparar o resultados dos subfragmentos no CSGE e confirmar o perfil já observado. A análise do mapa de restrição da seqüência dos acessos M76430 e AY026058 mostrou a ocorrência de um único sítio para a enzima *KpnI*, no qual, divide a seqüência em dois subfragmentos, 1 (~10.544 a 10.854 pb do gene da *fib-L*) e 2 (~10.854 a 11.456 pb).

Os resultados mostraram que as matrizes analisadas também apresentam apenas um sítio de restrição para a *KpnI* e que as Alterações específicas observadas nas seqüências dos subfragmentos de cada alelo das matrizes refletem em diferentes moléculas heteroduplex no CSGE (Figura 3).

No subfragmento 1 da matriz C24-2, observamos somente moléculas homoduplex, Figura 4, indicando que neste subfragmento não há alterações nucleotídicas que promovam a formação de heteroduplex. Para o subfragmento 2 da C24-2, observamos moléculas heteroduplex, Figura 3, indicando que há alterações nucleotídicas entre os alelos. Estes resultados confirmam que esta matriz pertence ao perfil B, pois apresentou o mesmo padrão de migração no CSGE já visualizada na Figura 2 e que as alterações estão especificamente no final da seqüência.

Para matriz HAAi2 e M12B observamos moléculas heteroduplex nos dois subfragmentos indicando que há alteração no decorrer de toda a seqüência. Podemos observar na figura 3, que o subfragmento 1 das duas matrizes mostrou mesma migração no CSGE indicando que as alterações nucleotídicas são as mesmas ou muito similares. Entretanto, no subfragmento 2 comparando estas duas

matrizes a migração das moléculas heteroduplex é diferente, sendo similar com a matriz C24-2, Figura 3. Estes resultados indicam que os alelos da matriz M12B é diferente dos alelos da matriz, HAAi2 e C24-2. Portanto, a M12B não pode pertencer ao perfil B, e nem ao perfil A, sendo uma mistura dos dois perfis, um dos seus alelos apresentam o inicio da sua seqüência (subfragmento 1) semelhante à seqüência das matrizes do perfil A, e o final da seqüência (subfragmento 2) semelhante às seqüências das matrizes do perfil B. Determinamos um novo perfil para a Matriz M12B, perfil C.

Variabilidade na seqüência do terceiro intron do gene *fib-L*

Para verificar quais alterações poderiam diferenciar os perfis encontrados, foram clonados produtos amplificado da região do intron III da *fib-L* das matrizes HAAi2, C24-2 e M12B e seqüenciado os clones representativos dos dois alelos da HAAi2 (a1 e a2), representado como perfil A e da C24-2 (a1 e a2) como perfil B. Para a matriz M12B perfil C, foi obtida somente a clonagem de um dos alelos.

O alinhamento, através do Clustal W (EMBL-EBI), das seqüências do terceiro intron de *fib-L* das matrizes que apresentaram no gel de CSGE perfis de heteroduplex diferenciados, comparadas com as descritas no banco de dados com número de acesso M76430 (linhagem japonesa) e AY026058 (linhagem chinesa), mostra quais são as alterações entre os alelos que ocasionam a formação de moléculas heteroduplex, Figura 4.

Neste alinhamento, os alelos da matriz C24-2 (C24-2a1 e C24-2a2) estão em azul, os alelos da matriz HAAi2 (HAAi2a1 e HAAi2a2) em verde, e a seqüência de

um dos alelos da matriz M12B em laranja. As alterações entre os alelos que podem proporcionar o heteroduplex estão em vermelho.

Observamos que em um dos alelos da matriz HAAi2 (a1) ocorreu uma deleção de 12 nucleotídeos (posição 10.796 a 10.807) e mais 38 alterações ao decorrer da seqüência, situação na qual, leva à obtenção do perfil A (Figuras 2,4 e 5). Diante da seqüência na figura 4 podemos verificar que o heteroduplex formado no subfragmento 1 (Figura 3) da HAAi2 é devido a deleção de 12 pb mais 9 trocas nucleotídicas e o heteroduplex do subfragmento 2 é resultado de 29 trocas nucleotídicas Figura 3.

Na matriz C24-2 ocorreram 5 trocas nucleotídicas entre os alelos, e a deleção de 12 pb em ambos os alelos o que resultou no perfil B (Figuras 2,4 e 5). Estas alterações ocorreram no final da seqüência, referente ao Subfragmento 2 visualizado na figura 3.

Foi seqüenciado somente um alelo para a matriz M12B (a1) no qual, apresentou a seqüência idêntica com a matriz japonesa M76430 Figura 4. Comparando os resultados das moléculas heteroduplex das matrizes visualizados no gel de CSGE Figuras 2 e 3 e o seqüenciamento Figura 4 podemos deduzir a seqüência do outro alelo da matriz M12B (a2). Podemos verificar que o padrão de heteroduplex formado no subfragmento 1 da M12B é igual ao da matriz HAAi2 (Figura 3) portanto, em sua seqüência referente a este fragmentos deve conter a deleção de 12 pb mais 9 trocas nucleotídicas entre os alelos. O subfragmento 2 da M12B é igual ao da matriz C24-2 (Figura 3) portanto, deve conter na seqüência referente a este subfragmento 5 trocas nucleotídicas entre os alelos. Portanto, a seqüência do alelo 2 da matriz M12B deve conter em sua seqüência a deleção de 12 pb mais 14 trocas nucleotídicas ao decorres de sua seqüências provavelmente

similar as trocas nucleotídicas visualizadas nas matrizes HAAi2 e C24-2 devido a conformatão molecular dos heteroduplex serem as mesmas.

Discussão

A metodologia CSGE utilizada nesse trabalho apresenta reprodutividade, sensibilidade e especificidade, possibilitando a detecção de alterações nucleotídicas em regiões específicas garantindo a visualização de polimorfismo entre indivíduos com fidelidade dos resultados. Este método identifica alelos diferentes, através de moléculas heteroduplex representados como marcador co-dominante, evitando interpretações de falsos positivos. O CSGE vem sendo usado com grande êxito em vários estudos de polimorfismo (Finnilä et al., 2000; Lahti et al., 2004; Krawczyński et al., 2004; Karppinen et al., 2006) e de detecção de mutações específicas (Vianello et al., 2002; Körkkö et al., 2002; Sundaresan et al., 2007). A sua sensibilidade já vem sendo descrita e discutida em outros trabalhos similares a este estudo há mais de 10 anos, garantindo sua aplicação em identificação de polimorfismo entre indivíduos com mais de 90% de fidelidade (Ganguly et al., 1993; Körkkö et al., 1998 e Ganguly, 2002).

Resultados descritos anteriormente (Felipes, et al. 2006), através da metodologia CSGE, não detectaram variabilidade alélica nas matrizes HAB, C121A e C122B de *Bombyx mori*, em análise do terceiro intron do gene da cadeia leve da fibroina, *fib-L*. A comprovação de que os dois alelos das matrizes têm a mesma seqüência permitiu concluir que todas as alterações encontradas no seqüenciamento indicavam polimorfismos entre os indivíduos, tornando possível uma análise de variabilidade entre as matrizes (Felipes et al., 2006).

A análise por seqüenciamento para detecção de polimorfismo, sem esclarecimento de existência de variabilidade alélica, pode acarretar em seqüências não representativas do genoma. Pode dificultar o seqüenciamento do produto de PCR, pois alelos diferentes ocasionam muitas vezes a impossibilidade de obtenção de seqüências com qualidade, e ainda pode proporcionar a clonagem de apenas um dos alelos, obtendo desta forma, uma única seqüência, levando ao risco de discussão erroneamente do polimorfismo em uma população.

Neste trabalho, nós investigamos 13 matrizes do banco de germoplasma UEM/ACESP com o objetivo de identificar variabilidade entre elas e diferenciá-las geneticamente. As matrizes HAA, M19-2, M11A, M12B, M102, M18-2, J1, C209, C25B, C242 e C24A apresentaram moléculas heteroduplex no CSGE, revelando que o gene *fib-L* tem dois alelos diferentes. Neste caso, foi fundamental investigar as seqüências dos alelos, e distinguir as alterações nucleotídicas encontradas entre eles, identificando os possíveis polimorfismos encontrados entre as matrizes. Com mesmo objetivo, Finillä e colaboradores (2000) usaram esta metodologia para a análise de uma região de codificação do DNA mitocondrial de 22 finlandeses, pertencentes ao haplogrupo U com o intuito de identificar todos os polimorfismos e todas as variabilidades nucleotídicas. Após a análise de CSGE foi utilizado o seqüenciamento para verificar as alterações encontradas nos perfis diferenciados de migração de heteroduplex e os resultados provaram que esta metodologia é sensível e específica.

Em nossos resultados também foi possível verificar através do gel de CSGE e seqüenciamento que há polimorfismos entre as matrizes. Observamos que as seqüências na região estudada são diferentes, mostrando três perfis de heteroduplex como exemplificado na Figura 2. O perfil A incluiu as matrizes HAA,

M19-2, M11A, M102, M18-2, J1, C209, o perfil B incluiu C25B, C24-2 e C24-A e o perfil C a matriz M12B.

No perfil A, especificamente na matriz HAAi2 os alelos sofreram 22 deleções incluindo a de 12 pb (posição 10.796 a 10.807) e outras alterações, somando um total de 38 alterações visualizada após o seqüenciamento e análise por ClustalW. Estas alterações proporcionam na hibridação que todas as duplas fitas sejam diferentes mostrando quatro bandas heteroduplex no gel de CSGE.

No perfil B, especificamente na matriz C24-2, ocorreram 5 trocas de bases visualizadas após o seqüenciamento e o alinhamento por ClustalW, no qual resultou em fitas heteroduplex.

No perfil C, representado pela matriz M12B observamos a deleção de 12 pb mais 14 trocas nucleotídicas ao decorre de sua seqüências provavelmente similar as trocas nucleotídicas visualizadas nas matrizes HAAi2 e C24-2 devido a conformação molecular dos heteroduplex serem as mesmas, neste caso, a análise com o corte de enzima de restrição foi fundamental para diferenciar esta matriz neste perfil, e a comparação das matrizes com seu perfis de heteroduplex auxiliou na dedução da seqüência nucleotídica desta região.

Ganguly em sua revisão também observou alterações no perfil do heteroduplex e demonstrou que as bases mutadas definem a diferença na redução das moléculas no gel de CSGE confirmado. Dependendo da troca de nucleotídeos, juntamente com a seqüência de nucleotídeos que estão próximos a esta troca de pares de bases, ou seja, da mutação, diferentes níveis de redução da mobilidade eletroforética da molécula de heteroduplex pode ser visualizada (Ganguly, 2002).

Após ter obtido a seqüência de alelos diferentes pertencentes a perfis de heteroduplex distintos, matrizes HAAi2, C24-2 e M12B, Figuras 2, 3, 4 e 5 a análise

por clivagem com enzima de restrição auxiliou na identificação do perfil de moléculas heteroduplex para a matriz M12B, da qual foi clonado e seqüenciado somente um dos alelos. Os resultados demonstraram que o *B. mori* tem pelo menos, 3 combinações de alelos contendo o lócus do gene da *fib-L* distintos, evidenciados nas matrizes HAA, C24-2 e M12B.

As matrizes C21A e C14 mostraram somente moléculas homoduplex. Assim, nestas matrizes é possível visualizar as alterações nucleotídicas entre os indivíduos a partir do seqüenciamento direto do produto de PCR. Nas análises anteriores da variabilidade genética entre as matrizes de *Bombyx mori*, que apresentavam somente moléculas homoduplex (Felipes et al., 2006), foi observado que além de algumas trocas nucleotídicas, o polimorfismo mais significante nesta região foi a deleção de 12 pb na posição de 10.796 a 10.807 (Figura 4). Essa deleção se torna, portanto, um polimorfismo bastante significativo entre as matrizes, podendo estar presente em um ou nos dois alelos.

Em resumo, podemos afirmar que o CSGE permitiu detectar variabilidade alélica entre os indivíduos analisados. A determinação dos três perfis de formação de moléculas heteroduplex, em associação com a clivagem com enzimas de restrição, é útil na identificação de variabilidade alélica. Estes resultados poderão ser utilizados, como um guia para caracterizar todas as matrizes do banco do germoplasma da UEM. A possibilidade de análise de variabilidade genética é fundamental para diferenciar polimorfismos em um determinado segmento genômico tanto entre os indivíduos quanto entre os alelos deste indivíduo.

AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos a Valmir Perón e Marli Lícero Shuete Silva pela dedicada assistência técnica. Este trabalho teve apoio do CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, FINEP, Fundação Araucária, Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior, SETI, FUNDO PARANA, TWAS – The Academy for the Developing World (Proc. RGA 00-265-RG/BIO/LA).

Referências

- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 32(3):314-31.
- Cotton RG, Rodrigues NR, Campbell RD (1988). Reactivity of cytosine and thymine in single-base-pair mismatches with hydroxylamine and osmium tetroxide and its application to the study of mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85(12): 4397 – 4401.
- Felipes J, Bravo JP, Zanatta DB, Fernandez MA et al. (2006). Sequence Variability in the Third Intron of *Bombyx mori* L-Chain (Fib-L) Gene Amongst Differente Strains. In: XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. Águas de Lindóia. Anais Eletrônico. SBBQ, Águas de Lindóia. CD-ROM.
- Finnilä S, Hassinen IE, Ala-Kokko L, Majama K (2000). Phylogenetic Network of the mtDNA Haplogroup U in Northern Finland Based on Sequence Analysis of the Complete Coding Region by Conformation-Sensitive Gel Electrophoresis. *Am. J. Hum. Genet.* 66:1017–1026.
- Fischer SG, Lerman LS (1983). DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80(6):1579-1583.
- Fujii H. (1998). Genetical Stocks and Mutations of *Bombyx mori*: Important Genetic Resources. Fukuoka, Kyushu Univ, Jpn, 54.
- Ganguly A, Rock MJ, Prockop DJ (1993). Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: Evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes. *Proc Natl Acad Sci* 90: 10325–10329.
- Ganguly A. (2002) An update on conformation sensitive gel electrophoresis. *Hum Mutat.* 19(4), 334-342.
- Goldrick MM, Kimball GR, Liu Q, Martin LA, Sommer SS, Tseng JY (1996). NIRCA: a rapid robust method for screening for unknown point mutations. *Biotechniques.* 21(1): 106-112.
- Goldsmith MR, Shimada T, Abe H (2005). The genetics and genomics of the silkworm, *Bombyx mori*. *Annu. Rev. Entomol.* 50:71-100.
- Inoue S, Kanda T, Imamura M, Quan GX, Kojima K, Tanaka H, Tomita M, Hino R, Yoshizato K, Mizuno S, Tamura T (2005). A fibroin secretion-deficient silkworm mutant, Nd-sD, provides an efficient system for producing recombinant proteins. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 35(1): 51-59.

- Karppinen S M, Erkko H, Reini K, Pospiech H, Heikkinen K, Rapakko K, Syväoja JE, Winqvist R (2006). Identification of a common polymorphism in the TopBP1 gene associated with hereditary susceptibility to breast and ovarian cancer. *Eur J Cancer*. 42(15):2647-2652.
- Körkkö J, Kaitila I, Lönnqvist L, Peltonen L, Ala-Kokko L (2002). Sensitivity of conformation sensitive gel electrophoresis in detecting mutations in Marfan syndrome and related. *Conditions Med Genet*. 39:34–41.
- Krawczyński MR, Czarny-Ratajczak M, Pecold K, Latos-Bieleńska A (2004). Only neutral polymorphisms found in the TIGR/myocilin gene of 45 Polish patients with primary open-angle glaucoma. *J. Appl. Genet.* 45(2): 275-279.
- Lahti M, Marttila R, Hallman M (2004). Surfactant protein C gene variation in the Finnish population – association with perinatal respiratory disease. *European Journal of Human Genetics* 12(4): 312-320.
- Li M, Guo Q, Hou C, Miao X, Xu A, Guo X, Huang Y (2006). Linkage and mapping analyses of the densonucleosis non-susceptible gene nsd-Z in the silkworm *Bombyx mori* using SSR markers. *Genome* 49(4): 397-402.
- Li M, Shen L, Xu A, Miao X, Hou C, Sun P, Zhang Y, Huang Y (2005). Genetic diversity among silkworm (*Bombyx mori* L., Lep., Bombycidae) germplasms revealed by microsatellites. *Genome* 48: 802–810.
- Markoff A, Sombroen H, Bogdanova N, Preisler-Adams S, Ganev V, Dworniczak B, Horst J (1998). Comparison of conformation-sensitive gel electrophoresis and single-strand conformation polymorphism analysis for detection of mutations in the BRCA1 gene using optimized conformation analysis protocols. *European Journal of Human Genetics* 6:145–150.
- Mills DR, Goldsmith MR (2000). Characterization of early follicular cDNA library suggests evidence for genetic polymorphisms in the inbred strain C108 of *Bombyx mori*. *Genes Genet Syst.* 75(2):105-13
- Mori K, Tanaka K, Kikuchi Y, Waga M., Waga S, Mizuno S (1995). Production of a chimeric fibroin light-chain polypeptide in a fibroin secretion-deficient naked pupa mutant of the silkworm *Bombyx mori*. *J. Mol. Biol.* 251(2):217-228.
- Reagan TE, Flynn JL (1986). Insect pest management of sweet sorghum in sugarcane production systems of Louisiana: problems and integration. In Smith WH (ed) *Biomass Energy Development*, Plenum, New York, 237-239.
- Sundaresan S, Eapen CE, Shaji RV, Chandy M, Kurian G, Chandy G (2007). Screening for mutations in ATP7B gene using conformation-sensitive gel electrophoresis in a family with Wilson's disease. *Med. Sci. Monit.* 13(3):38-40.
- Takei F, Kikuchi Y, Kikuchi A, Mizuno S, Shimura K (1987). Further evidence for importance of the subunit combination of silk fibroin in its efficient secretion from the posterior silk gland cells. *J. Cell. Biol.* 105(1):175-180.

- Tautz, D (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17: 6463–6471.
- Underhill PA, Jin L, Lin AA, Mehdi SQ, Jenkins T, Vollrath D, Davis RW, Cavalli-Sforza LL, Oefner PJ. (1997) Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography *Genome Res.* 7(10):996-1005.
- Velasco E, Infante M, Duran M, Perez-Cabornero L, Sanz DJ, Esteban-Cardenosa E, Miner C (2007). Heteroduplex analysis by capillary array electrophoresis for rapid mutation detection in large multiexon genes. *Nat Protoc.* 2(1): 237-246.
- Vianello F, Lombardi AM, Dal Bello F, Zanon E, Cabrio L, Girolami A (2002) . Conformation sensitive gel electrophoresis for detection of factor X gene mutations. *Thromb. Res.* 107(1-2): 51-54.
- Vos, P, Hogers, R, Bleeker, M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, et al. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23(21): 4407–4414.
- Williams JGK, Hanafey MK, Rafalski JA, and Tingey SV (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531–6535.
- Yasukochi, Y (1998). A dense genetic linkage map of the silkworm, *Bombyx mori*, covering all chromosomes based on 1018 molecular markers. *Genetics*, 150: 1513–1525.
- Yi, WZ (1990). Silkworm germplasm. *In* The sericultural science in China. Edited by H.S. Lu. Shanghai Science and Technology Press, Shanghai, China. pp. 291–298.

Legendas

Figura 1. Representação gráfica do gene da *fib-L* com 14478 pb (Kikuchi et al. 1992, número de acesso M76430). Os exons estão apresentados por retângulo cinza escuros. A região de amplificação de ~900 pb está demonstrada pela barra preta, as setas indicam os primers de 5'-3' e 3'- 5'. As posições dos sete exons no gene estão descritas no lado esquerdo da figura.

Figura 2. Análise por CSGE do intron 3 do gene da cadeia leve da fibroína de *Bombyx mori*. Os produtos de amplificação do gene da cadeia leve da fibroína (*fib-L*) de DNA extraído de conjunto de lagartas de 1^a idade das matrizes C24-2, M12B, C25B, C21A e M19-2, foram desnaturados a 95°C por 5 minutos e renaturados a 68°C por 1 hora. Podemos observar dois perfis de heteroduplex. O primeiro perfil está presente nas matrizes M12B e M19-2 e o segundo na matriz C25B e C24-2. A matriz C21A possui apenas moléculas homoduplex. M, marcador de tamanho molecular, 1 kb Ladder Plus (Invitrogen).

Figura 3. Análise CSGE do fragmento de PCR do gene *Fib-L* das matrizes M12B, C24-2 e HAAi1 clivados com *KpnI*. Observamos as moléculas homoduplex, identificados como subfragmentos A e B e as moléculas heteroduplex específicas. M, marcador de tamanho molecular, 1Kb ladder plus (Invitrogen).

Figura 4. Alinhamento das seqüências do intron 3 da *fib-L* de alelos de matrizes que apresentaram no gel de CSGE diferentes padrões de heteroduplex. A matriz C24-2

com seus dois alelos (C24-2a1 e C24-2a2) estão apresentados em azul, os dois alelos da matriz HAAi2 (HAAi2a1 e HAAi2a2) em verde, um do alelos M12B em laranja e em vermelho as modificações observadas no alinhamento que formam as moléculas heteroduplex. As regiões dos exons 3 e 4, que são amplificados nas extremidades estão em cinza. O local de clivagem pela enzima de restrição *KpnI* está em amarelo e a seta indica o local de clivagem da enzima. As regiões conservadas de 12-81 pb estão grifadas na cor turquesa. AY026058 é o número de acesso no NCBI da seqüência de uma matriz Chinesa e M76430 da seqüência de uma matriz Japonesa

Figura 5. Esquema representativo da metodologia CSGE com os dois perfis descritos neste trabalho. No perfil A, a mutação e a deleção em um dos alelos homólogos resultam em moléculas homoduplex e heteroduplex como ocorrido com a matriz M19-2, Figura 2. No perfil B, a mutação em um dos alelos induz a formação de moléculas homoduplex e heteroduplex, como observado para a matriz C24-2, Figura 2.

FIGURA 1

Figura 1. Representação gráfica do gene da *fib-L* com 14478 pb (Kikuchi et al. 1992, número de acesso M76430). Os exons estão apresentados por retângulo cinza escuros. A região de amplificação de ~900 pb está demonstrada pela barra preta, as setas indicam os primers de 5'-3' e 3'- 5'. As posições dos sete exons no gene estão descritas no lado esquerdo da figura.

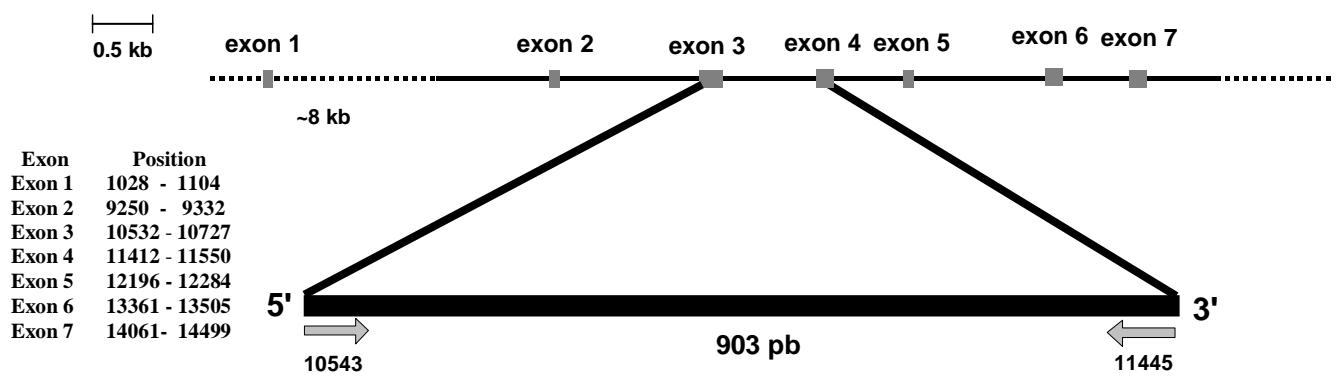


FIGURA 2

Figura 2. Análise por CSGE do intron 3 do gene da cadeia leve da fibroína de *Bombyx mori*. Os produtos de amplificação do gene da cadeia leve da fibroína (*fib-L*) de DNA extraído de um conjunto de lagartas de 1^a idade das matrizes C24-2, M12B, C25B, C21A e M19-2, foram desnaturados a 95°C por 5 minutos e renaturados a 68°C por 1 hora. Podemos observar dois perfis de heteroduplex. O primeiro perfil está presente nas matrizes M12B e M19-2 e o segundo na matriz C25B e C24-2. A matriz C21A demonstra apenas moléculas homoduplex. M, marcador de tamanho molecular, 1 kb Ladder Plus (Invitrogen).

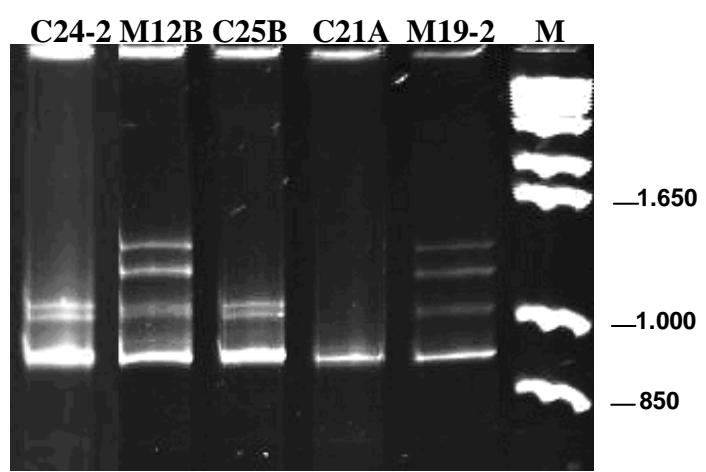


FIGURA 3

Figura 3. Análise CSGE do fragmento de PCR do gene *Fib-L* das matrizes M12B, C24-2 e HAAi1 clivados com *KpnI*. Observamos as moléculas homoduplex, identificados como subfragmentos 1 e 2 e as moléculas heteroduplex específicas. M, marcador de tamanho molecular, 1Kb ladder plus (Invitrogen).

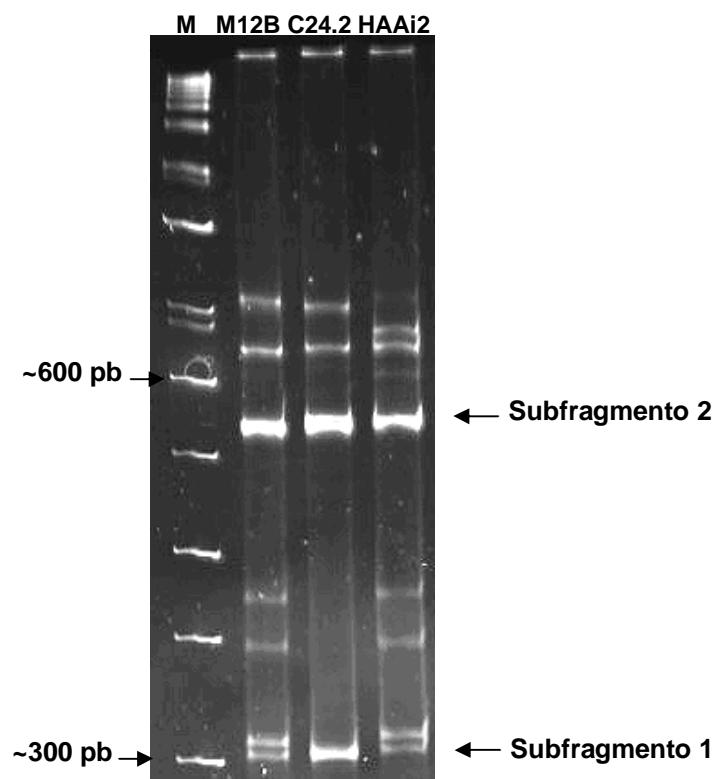


FIGURA 4

Figura 4. Alinhamento das seqüências do intron 3 da *fib-L* de alelos de matrizes que apresentaram no gel de CSGE diferentes padrões de heteroduplex. A matriz C24-2 com seus dois alelos (C24-2a1 e C24-2a2) estão apresentados em azul, os dois alelos da matriz HAAi2 (HAAi2a1 e HAAi2a2) em verde, um do alelos M12B em laranja e em vermelho estamos representando as modificações observadas no alinhamento que formam as moléculas heteroduplex. As regiões dos exons 3 e 4, que são amplificados nas extremidades estão em cinza. O local de clivagem pela enzima de restrição *KpnI* está grifado em amarelo e a seta indica o local de clivagem da enzima. As regiões conservadas de 12-81 pb estão grifadas na cor turquesa. AY026058 é o número de acesso no NCBI da seqüência de uma matriz Chinesa e M76430 da seqüência de uma matriz Japonesa

10553 10563 10573 10583 10593 10603 10613 10623 10633 10643
 M76430
 AY026058 **ACGTCGATGGGACTACGTGAGACACTG-ACAAAAGCATC-GCCATCC-TCAACG-TTCAGAGATCTT-GAAGGCATGGCCAGGGGATTATG**
 C24.2a1
 C24.2a2
 HAAi2a1
 HAAi2a2
 M12B

 10653 10663 10673 10683 10693 10703 10713 10723 10733 10743
 M76430
 AY026058 **CAAGTCAGCATCAGCGTGGCCCAAACCGCCGGAAATTATGCCCATCTATCIGCCGTATCCCCGGTATGCCGTGAGCTGAGCTAACGTAAGTAGATG**
 C24.2a1
 C24.2a2
 HAAi2a1
 HAAi2a2
 M12B

 10753 10763 10773 10683 10793 10803 10813 10823 10833 10843
 M76430
 AY026058 **CCGCTGTTAGAACATAAAACAGTACGTCTAAATTTATTACCCGAAACTGATAAGACTGATAAGAAGAAGCAGTGTCACTTTGGAGACTTTAGAA**
 C24.2a1
 C24.2a2
 HAAi2a1
 HAAi2a2
 M12B

 10853 10863 10873 10883 10893 10903 10913 10923 10933 10943
 M76430
 AY026058 **AGAAAAAACTCGTACCGTACGGAGAAATCGGACCCCTCTAAATCGACACAAATTTCATGGTTAGGTAATTACCAATAAAATAGAGGTTAA**
 C24.2a1
 C24.2a2
 HAAi2a1
 HAAi2a2
 M12B

 10953 10963 10973 10983 10993 11003 11013 11023 11033 11043
 M76430
 AY026058 **ACGGTTCCGGAGGGTTAAATTAAATACGGTGCCTTATACATATTTCATTACAAATCTACACAAAAACTGAAAAAACTAGCTTGACCGGATTC**
 C24.2a1
 C24.2a2
 HAAi2a1
 HAAi2a2
 M12B

 11053 11063 11073 11083 11093 11103 11113 11123 11133 11143
 M76430
 AY026058 **CCTTGGTTTGTGGTTAACCGGTTTCGTATGGGACAATAGAGTTTCGATAAGGCTGGTACTATATTAGTAGTTAGGTAGGCACGTAACCTTATGAT**
 C24.2a1
 C24.2a2
 HAAi2a1
 HAAi2a2
 M12B

 11153 11163 11173 11183 11193 11203 11213 11223 11233 11243
 M76430
 AY026058 **AATTAATTTAAATACCCCAA-TGATTACAAACCTCTGATGACTGAATTAGACTATTAAACT-AACACTAAATAAAGTCATTTCAGTTCA**
 C24.2a1
 C24.2a2
 HAAi2a1
 HAAi2a2
 M12B

 11253 11263 11273 11283 11293 11303 11313 11323 11333 11343
 M76430
 AY026058 **ACAAAGTTAAATTAAACACTCAACAAAGTATTATGACATCACAGATATACCTATACTAACTCTTAGTCTTATTCCCCAATCTACTGTATCCAA**
 C24.2a1
 C24.2a2
 HAAi2a1
 HAAi2c2
 M12B

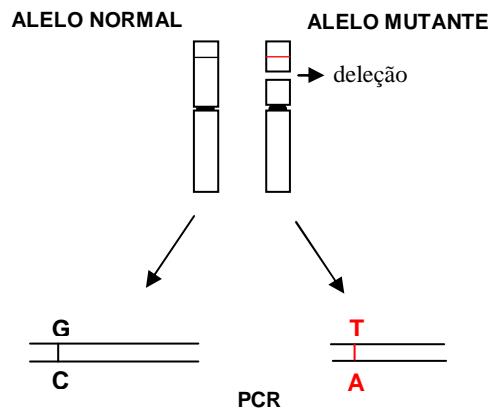
 11353 11363 11373 11383 11393 11403 11413 11423 11433 11443
 M76430
 AY026058 **AATTATCCTTAAACATCCAATATTACCTGTTTCAGTAAAGGAAATGAAATCTAATTAAATCTCTTGCAGGTCTTAACCTTACACAGAC**
 C24.2a1
 C24.2a2
 HAAi2a1
 HAAi2a2
 M12B

 11453
 M76430
 AY026058 **GGGGTCAGGTCCG**
 C24.2a1
 C24.2a2
 HAAi2a1
 HAAi2a2
 M12B

FIGURA 5

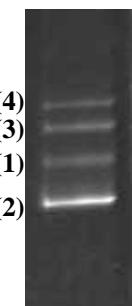
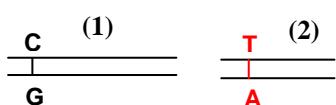
Figura 5. Esquema representativo da metodologia CSGE com os dois perfis descritos neste trabalho. No perfil A, a mutação e a deleção em um dos alelos homólogos resultam em moléculas homoduplex e heteroduplex como ocorrido com a matriz M19-2, Figura 2. No perfil B, a mutação em um dos alelos induz a formação de moléculas homoduplex e heteroduplex, como observado para a matriz C24-2, Figura 2.

PERFIL A

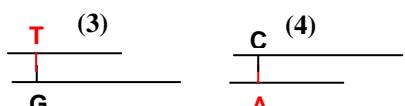


DENATURAÇÃO E HIBRIDAÇÃO

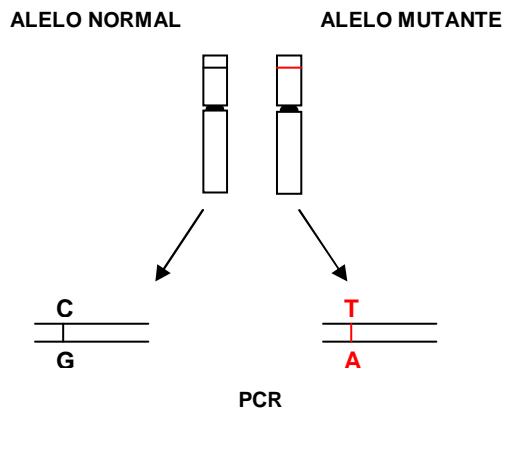
HOMODUPLEX



HETERODUPLEX

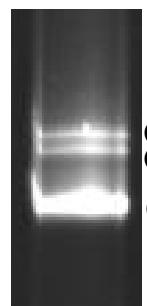
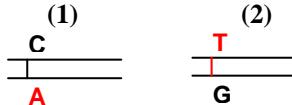


PERFIL B

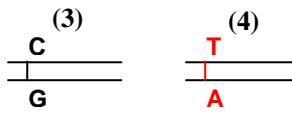


DENATURAÇÃO E HIBRIDAÇÃO

HETERODUPLEX



HOMODUPLEX



**The analysis of the *fib-L* gene third intron from *Bombyx mori* strains reveals
that the sequence involved in the Nd-s^D mutation is localized in a conserved
segment with intrinsic bent DNA**

Joice Felipes¹, Juliana Pereira Bravo¹, Daniela Bertolini Zanatta¹, José Luis da Conceição Silva¹, Valério Américo Balani¹, Adriana Fiorini² and Maria Aparecida Fernandez^{1*}.

¹Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá - 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

²Centro Universitário de Maringá, CESUMAR - 87050-390, Maringá, Paraná, Brasil.

* Corresponding author:

Maria Aparecida Fernandez

Departamento de Biologia Celular e Genética

Universidade Estadual de Maringá

Av. Colombo, 5790

87020-900 – Maringá, Paraná, Brasil

Phone: 55 (44) 3261 4700

Fax: 55 (44) 3261 4893

E-mail address: aparecidafernandez@gmail.com

Abstract Multiple analyses were carried out in the third intron of the Fibroin light chain gene (*fib-L*) from three *Bombyx mori* strains. The conformational sensitive gel electrophoresis (CSGE) has not shown important deletion/insertion on the Japanese HAB, Chinese C121A and C122B silkworm allele sequences. Alignments with two previously described sequences, the Japanese J129 and one hybrid line have shown sixteen conserved regions, 12 to 62 base pairs long that represent 51.60% of the intron sequence. The nucleotide variability traces a phylogenetic tree topology where the Japanese HAB and the Chinese C121A grouped separately in relation to their origin. In contrast, individuals of the Chinese C122B are grouped into the Chinese C121A strain, the Japanese HAB strain or the hybrid strain, respectively. This intermix could be indicative of independent origins of the domesticated C122B strain. In all of the analyzed sequences analyzed, there intrinsic bent DNA were observed. The main peak of intrinsic curvature was found within the segment in which occurs the breakage in the previously described *Nd-s^D* mutation. Take together these results suggest that this intrinsically curved region may mediate DNA cleavage and enhance the recombination events in the third intron of the Fibroin light chain gene of *Bombyx mori*.

Keywords bent DNA sites; *Bombyx mori*; Fibroin light chain gene; *fib-L* third intron variability; *Nd-s^D* mutation

Introduction

Bombyx mori is a model organism for Lepidoptera, the second most numerous order of insects, including many important species for agriculture and forestry. The mulberry silkworm *B. mori* has been domesticated for silk production for 5,000 years (Xiang 1995) and currently, it is the major economic source for 30 million families in countries such as China, India, Vietnam, Thailand, and Brazil. Advances in silkworm research not only have a great impact in improving sericulture, but also may facilitate the development of new strategies for pest control. In addition, with the development of biotechnology, *B. mori* has been used as an important bioreactor for the production of recombinant proteins (Tamura et al. 2000, Tomita et al. 2003, Royer et al. 2005)

The silk moth domestication process led to the establishment of more than 3,000 strains of *B. mori*, including different geographical and ancestral races as well as inbred and mutant lines that carry numerous genetic variants; some of them directly related to the quality and yield of silk (Nagaraju 2000). Generally speaking, *B. mori* strains of temperate geographic origin are good producers of silk, while the tropical ones produce lower silk quantities but are more resistant organisms and more capable of withstanding adverse climatic conditions. Differences in silk production among *B. mori* strains have led to research on the genetic factors involved in the yield and quality of silk (Nagaraju 2000).

Silk fibroin is secreted into the lumen of the posterior silk gland (PSG) of the *B. mori* silkworm and is composed mainly of three polypeptides: a 350 kDa heavy chain (H-chain, Ohmachi et al. 1982), a 26 kDa light chain (L-chain, Yamaguchi et al. 1989)

and fibrohexamerin (fhx, Inoue et al. 2000). The *fib-L* gene maps in chromosome 14 (GenBank accession no. M76430), and is constituted by 14,626 base pairs, containing seven exons with large size introns (Kikuchi et al. 1992). The first intron occupies about 60% of this gene and the other introns together occupy approximately 31% (Kikuchi et al. 1992). In this way, 91% of the gene is composed of non-coding DNA.

The *Nd-s* and *Nd-s^D* mutation were detected in the third intron, caused by a deletion located downstream exon III, which causes the recombination of sequences with further downstream sequences (Mori et al. 1995). The *Nd-s* mutant was initially identified in one specific strain of *B. mori* in 1960 and the *Nd-s^D* mutant obtained after the injection of diethyl sulphate into a male pupa from a normal *B. mori* unknown strain and subsequently identified in the progeny of the fourth generation (Gamo and Sato, 1985). These mutants are characterized by an immature PSG and less than 1% of the normal secretion level of fibroin, which leads to the production of a very thin, naked-pupa cocoon that consists mostly of sericin (Mori et al. 1995).

Mutations, breakpoints and recombination events can be DNA associated to bent DNA and may preferentially occur at DNA loop anchorage sites, which might lead to deletion or repositioning of individual DNA loops (Razin 1999). Detailed analysis of several known recombination hot spots has demonstrated that they are located at the bottom regions of DNA loops (Bode et al. 2000; Svetlova et al. 2001; Iarovaia et al. 2004).

Here we describe the structure verifying the presence de DNA bent and the nucleotide variability of the third intron of the *fib-L* gene in *Bombyx mori* intra-species strains (Japanese HAB, and the Chinese C121A and C122B). Our results were compared with the two available sequences of the *B. mori* (GenBank accession nos.

M76430 and [AF541967](#)). Amongst the analysed sequences the Japanese HAB strain has shown the lowest number of substitutions in the third intron sequence, and observed through the 2D structure of the 3D projection that all individuals presents the main peak of intrinsic curvature within the segment in which the previously described *Nd-s^D* mutation for *fib-L* gene takes place. Therefore, we also discuss, whether it is possible that this observed mutation in the *fib-L* third intron could be related to bent DNA in this chromosomal segment.

Materials and methods

Bombyx mori strains

B. mori strains were provided by COCAMAR (Cooperativa Agroindustrial) from Maringá, Paraná State, Brazil to the Universidade Estadual de Maringá, Paraná State, Brazil. Three individuals of each strain, Japanese HAB, Chinese C121A, and C122B were analyzed in this work. The silkworms used in this work were raised at 25°C with fresh mulberry leaves at COCAMAR farm.

DNA extraction

The genomic DNA was extracted from the silk glands of five day old fifth instar larvae using the protocol previously described by Mills and Goldsmith (2000), with modifications. Briefly, pairs of silk glands were dissected and incubated in 3 ml of extraction buffer (1.5% sarkosil, 50 mM EDTA, pH 8, 10 mM NaCl, and 1 mg/ml

proteinase K) for 2-3 hours at 50°C. The extract was then subjected to one round of chloroform (chloroform isoamylacohol 24:1) and 3 rounds of phenol pH 8.0 extractions, ethanol precipitated with 0.2 M NaCl and 0.7 volume of isopropanol, precipitate by centrifugation and resuspended in TE buffer (10 mM Tris-HCL pH8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0). DNA concentration was determined by spectrophotometer measurements.

PCR and cloning

PCR primers for the amplification of the third intron of *fib-L* were constructed employing the FAST-PCR software (version 3.5.30 by Ruslan Kalendar). The forward primer sequence 5'-ACGTCGATGGGACTACGTCG-3' and reverse primer sequence 5'-CGGACCTGACGCCGTCTGTG-3' are complementary to the third and fourth exons, respectively (Figure 1). PCR reactions were routinely performed in a final volume of 15 μ l, containing 2.5 mM dNTPs, 100 ng of DNA, 25 pmol of each primer, 1X PCR buffer (with 1.5 mM of MgCl₂) and 1 unit of Taq Polymerase (Invitrogen). The amplification conditions were 1 min at 94°C, 1 min at 58°C, and 1 min at 72°C, for a total of 35 cycles, followed by a final extension of 10 min at 72°C. The PCR product, approximately 900 (bp) long, was cloned for one individual of the strain C121A and one individual of the strain C122B. The analyses were carried out with PCR products.

PCR products were purified using a PCR purification Kit (Qiagen). The PCR products from one individual from each strain (C121A and C122B) were cloned using TOPO TA PCR Cloning Kit (Invitrogen).

Figure 1

Conformation-sensitive gel electrophoresis (CSGE)

Screening for polymorphisms using heteroduplex formation from all strains was performed by denaturation of PCR products at 95°C for 10 min, followed by hybridization for 1 hour at 60°C. Prior to electrophoresis, 4 µl of each PCR product was mixed with 4 µl of 20% ethylene glycol (Sigma) 30% formamide containing 0.025% (wt/vol) each of xylene cyanol FF and bromphenol blue. A standard DNA gel apparatus (14 by 16 cm) was used. The CSGE gel was prepared with 40% acrylamide/bis solution: 39.6 g of acrylamide (Gibco BRL) and 0.4 g of 1,4-Bis acryloyl piperazine (Fluka) in 100 ml in 0.5X TTE (43.04 g Tris-HCl, 14.24 g taurine and 0.28 g EDTA in 130 mL pH 9.0). The gel was pre-run at 200 Volts for 1 hr and electrophoresis was carried out at 250 Volts for 16 hr at room temperature. Gels were stained with ethidium bromide (0.1 ng/mL) in water and photographed with a UVP Biolimaging System.

Sequencing

Sequencing reactions were performed with the DYEnamic ET Dye Terminator Kit (Amersham Biosciences) and the reaction products were run in a MegaBACE 1000 automated DNA sequencer equipment (Amersham Biosciences).

Phylogenetic analysis

The analyses and alignment of the *fib-L* third intron sequences were performed using the following programs: PHRED (Version: 0.020425.c, 1993-2002 by Phil Green and

Brent Ewing; <http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html>), PHRAP AND CROSS_MATCH (version 0.990319, 1994-999 by Phil Green; <http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html>), CONSED (version 14.0, Gordon 2004, package from <http://bozeman.mbt.washington>) with the purpose of multiple sequence alignment for DNA, and PAUP (version 4.0b10 David L. Swofford <http://lms.sci.edu/PAUP>) for the Phylogenetic-tree analysis using the maximum likelihood program ML (version 3.5, 1986-1993 by Felsenstein) with bootstrap analysis of 1000 replicas. The phylogenetic tree was visualized in the program treeview Win32 (version 1.6.6; <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>), BioEdit software, (version 7.0.0 <ftp://iubio.bio.indiana.edu/molbio/seqpup/>) (Thompson et al. 1994).

Electrophoresis and computational analysis

Fragments from recombinant pC121A.i3 and pC122B.i3 clones were obtained by digestion with *Eco*RI restriction enzyme. The mobility of the fragments was compared after electrophoresis in 1% agarose gels (control gels) at 3.5 Volts/cm at room temperature versus electrophoresis in 6% polyacrylamide gels (acrylamide/bisacrylamide ratio 30:0.8) at 7 Volts/cm at 4°C, for 12 hours. To confirm the presence of bent DNA, the samples were maintained overnight in 1µg/ml ethidium bromide (EthBr) and electrophoresed in 6% polyacrylamide gels previously run with 1µg/ml ethidium bromide in the running buffer. The ethidium bromide acts locally between base pairs, abolishing the intrinsic DNA curvature and straightening the fragments (Fiorini et al. 2006a). All gels were run in 1X TBE buffer (45 mM Tris-borate, 1mM EDTA, pH 8.0), stained after running with 0.1µg/ml of EthBr and

documented by a UVP Biolmaging System under UV light. In all three gel systems, an *R*-value, corresponding to the ratio of the observed length to the expected length, was calculated for each DNA fragment to determine the mobility alteration in the gels.

All nucleotide sequences were analyzed by computational modelling using the dinucleotide wedge model of Trifonov for curvature study. The projection of the three dimensional path and helical parameters were obtained by the Map15a and 3D15m1 software using the algorithm of Eckdahl and Anderson (1987) and the helical parameters of Bolshoy et al. (1991), as described by Pasero et al. (1993) and Marilley and Pasero (1996).

Putative intrinsic bent DNA sites identified by the ENDS ratio (ratio of the contour length of the segments' helical axis to the shortest distance between the fragments ends) were computed at a window of 120 bp width and a 10 bp step.

Results

CSGE analysis

The CSGE (Conformation-sensitive gel electrophoresis) analyses of the 903 bp PCR products of the third intron of the *fib-L* gene from the three individuals of the strains HAB, C121A and C122B is shown in Figure 2. No heteroduplex molecules were observed, which indicates that the two alleles in each individual of each strain have similar sequences. These 9 PCR products were sequenced in order to verify the occurrence of polymorphism amongst both the specimens and the strains

Figure 2

Sequence variability within the *fib-L* third intron

Table 1 summarizes the identity and geographical origins of all *B. mori* strains used in this study, as well as the references and accession numbers of the sequences employed in this study. The multiple alignments of *fib-L* third intron sequences are presented in Figure 3. These results demonstrated that intronic sequence presents several nucleotide variations, which include deletions, insertions, transitions and transversions. The transversions are represented in dark blue and the transitions in red colour. These variations differentiate and divide the strains into three groups. The first group includes the sequences of all three individuals from the Japanese HAB strain analyzed and the Japanese strain (GenBank accession no. M76430). The second group includes sequences of all the individuals from the Chinese C122B strain and the hybrid (GenBank accession no. AF541967) and the third group includes all the individuals from the Chinese C121A strain.

Figure 3

In the first group, the sequences are very similar except for thirteen nucleotides alterations. One transition and five deletions in the HAB.i1 strain; two deletions, one transversion, and one transition in the HAB.i2 strain and three deletions in the HAB.i3 strain (Figure 3).

The second can be considered an intermediate groups. We observed that the sequence of the C122B.i1 is very similar to the first group, while the individuals i2 and i3 and the hybrid present sequences more similar to the third group. The C122B.i2 strain presents all specific nucleotides alterations observed in the third group with additional nucleotides variations. The Chinese C122B.i1 is very similar to the sequence of the Japanese strain and it does not have a 12 bp deletion at positions 10791-10802, which is characteristic of the Chinese group. However some alterations, such as four transversions, one transition, two insertions, and one deletion with two bp (see Figure 3) indicate that this strain is not related to the Japanese group and therefore is part of a distinct group.

The sequence of the C122B.i3 presents alterations that are specifically found in the third group (eight alterations) (Figure 3). However, it also presents some additional and unique alterations: two deletions; eight transversions; seven transitions, and two insertions.

In the third group, the sequences of all three individuals from the Chinese C121A strain are very similar to each other, differentiating from the Japanese strain by 38 alterations that consist of three deletions, one insertion of 4 nucleotides, eighteen transversions, and seventeen transitions. In this group additional alterations that are particular to each individual were also identified (Figure 3). The C121A.i3 showed two additional alterations that consist of two deletions. The C121A.i2 presented seven additional alterations that consist of one deletion, one transition, one insertion,

and four transversions. The C121A.i1 presented an increment of six alterations, being one insertion, one deletion, and four transversions (Figure 3).

In the multiple alignments of all sequences, it was possible to observe sixteen conserved regions from 12 to 62 bp long that represent 51.60% of the L- *fib-L* third intron sequence. One of these conserved segments, position 10973-10988, is 41 bp and contains the sequence CGTTATTATACATATT, which is duplicated in the *Nd-s^D* mutant.

Phylogenetic relationships according to intronic sequence

A maximum likelihood (ML) phylogenetic analysis was performed to further analyze the genetic divergence among the intronic sequences (Figure 3). The tree topology display three clusters (Figure 4). The first cluster is well supported by bootstrap value of 96%, and reveals that the sequences HAB.i2 and C122B.i1 group together in a single clade with low statistical support by bootstrap of 71%. The sequence of the HAB strain, represented by the individual 1 and 3, and the sequence of the Japanese strain (GenBank accession no. M76430) make another clade. The C122B.i3 and the hybrid GenBank accession no. AF541967 formed a new cluster. These strains group separately from the first cluster and are supported by bootstrap value of 96%, and from the third cluster also supported by high bootstrap value of 100%. The third clusters is composed by all of the individuals from the C121A strain segregating together, and appear as a sister group of the C122B.i2, supported by a relatively high bootstrap value of 94%.

Figure 4

Fib-L third intron DNA bent sites and 2D modelling

Since DNA fragments containing unusual structures show an anomalous mobility in polyacrylamide gels electrophoresis (review in Fiorini et al. 2006a), this technique is a powerful tool to investigate the curvature of DNA segments. The 903 bp amplified product from C121A.i3 and C122B.i3 was cloned into TOPO 10 plasmid (Invitrogen) and analyzed in agarose (AGA), polyacrylamide (PA), and polyacrylamide with ethidium bromide (PA+EthBr) gels. In PA, the migration is dependent on both fragment size and structure, and the probable curvature is confirmed by the PA + EtBr gels, because the ethidium bromide intercalates the DNA molecule and opens up its structure. In contrast, the migration of fragments in agarose gels, which forms an irregular mesh depend only on the fragment size. The 903 bp fragments from the C121A.i3 and C122B.i3 clones have shown a normal migration in AG and PA + EthBr gels and a strong reduction migration in PA gel electrophoresis (Figure 5). The fragment mobility reduction, or R-value, can be determined by the ratio of the observed size in each gel system and the fragment real size. R-values ≥ 1.11 mean a reduced mobility, indicative of bent DNA (de Souza and Ornstein 1998, Fiorini et al. 2001, 2006a, b). These calculations revealed a strong reduction mobility in the 903 bp fragments with an R-value of 1.64 for C121A and 1.59 for C122B, indicating that the *fib-L* third intron has a curved structure.

The sequences of the 9 individuals analyzed in this work were submitted to theoretical 2D modelling (data not show). The Figure 6 shows the result of the 2D projection of the 3D path of two representative individuals, C121A.i3 (A) and C122B.i3 (B) *fib-L* third intron DNA fragments. Interestingly the region in which the previously described *Nd-s^D* mutation for the *fib-L* gene is localized corresponds to the

Figure 5

Figure 6

center of the mostly curved point in the structure (Figure 6, small circle) in all analysed sequences, regardless of variations in then secondary structure.

Discussion

Variability sequence analyses

Conformation-sensitive gel electrophoresis-CSGE (Ganguly et al. 1993; Ganguly and Prockop 1995) was described as a method that requires no special equipment or preparation of the DNA. It detects conformational differences between heteroduplexes and homoduplexes, which are reflected in differences in electrophoretic migration that are accentuated by the use of a mild denaturing agent. The CSGE analyses did not show heteroduplex molecules. This result confirms that in each strain and in each individual both alleles have the same sequence. The multiple alignments of *fib-L* third intron sequences revealed polymorphisms between the Japanese and Chinese strains, dividing them into three groups (Figure 3). We observed that the nucleotide substitutions were specific substitutions in the Chinese strains that were not randomly distributed.

We suggest that variations are bona-fide intra-population polymorphisms and do not constitute amplification artefacts, nor bi-allelic polymorphisms because there are no differences in either one of the alleles.

In the multiple alignments of all sequences, reveal that 51.6% of the intronic sequence are conserved and that the 48.40% of the intronic sequence contain polymorphism characterizing the different strains origins.

Overall, one of the most prominent variations in the alignment of Fig. 3 is a 12 bp fragment insertion in the Japanese strain (position 10791-10803) and a 13 pb deletion in the hybrid strain (position 10791-10804). There are few studies on the polymorphism of the *fib-L* gene among the strains of *Bombyx mori*. A considerable

restriction-fragment length polymorphism in regions containing the first intron and the 3' - flanking sequence of the *fib-L* gene was observed when the restriction pattern of the J-139 L-Fib was compared amongst eight *B. mori* breeds that produce normal level fibroin. However, the sizes of the *fib-L* mRNA and of the *fib-L* polypeptide were very similar among the breeds tested (Kikuchi et al. 1992). The polymorphism may not influence the protein production, but it can alter yield potential as well as the structure and stability of the DNA.

Our results indicate that the strains sequences differentiated according to their origins. The first group comprises mostly Japanese sequences, the second group contains the hybrid and one Chinese, and third group only comprises Chinese sequences. In the first and third groups, we observed that the individuals present a standard pattern of alterations, which characterizes specific groups. Other studies which investigated the relationships among *B. mori* L. strains, also observed that the groups were clusterized according to their origins (Li et al. 2005). The sequence of the first group was similar to the one previously deposited in GenBank (GenBank accession no. M76430). This intra-strain homogeneity is expected considering that the process of domestication and artificial selection during strain development involves severe inbreeding. Subsequently, crossbreeding is practiced to rescue, improve and/or introduce new characteristics into emerging strains. For this reason, extensive crossing of strains from formerly isolated geographic populations has been performed since 1900 (Kim et al. 2000). Such exhaustive admixture with the disposal of unwanted progeny has created an unnatural level of diminished diversity in *B. mori* strains (Kim et al. 2000). In contrast, in the second group, all the individuals from the Chinese C122B strain present sequences more variable among the individuals, which characterize them as an intermediate group among the Chinese and Japanese

strains. The hybrid (GenBank accession no. AF541967), which has a mixture of the Japanese and the Chinese strains sequences, was also classified as a member of the second group. This polymorphism is a result of the crossing-over in the L-Fib gene third intron region, as previously suggested (Manning and Gage 1980).

Phylogenetic analysis

The results of phylogenetic analysis with a maximum likelihood (ML) show a tree topology with *B. mori* strains distributed into three clusters. The first cluster is separated from the second well supported by bootstrap value of 96%; it is grouped by Japanese HAB, M76430 and the Chinese C122B.i1 (Figure 4). These results indicate that there is low divergence among these strains. However, within this cluster, it was observed formation of a clade include the Japanese and C122B.i1 with a low statistic supported by bootstrap value of 71%. The second cluster is formed by all of the C121A individuals and the C122B.i2. The clade formed by C121A.i1, i2 and i3 is well supported by a bootstrap value of 100% and appears as a sister of the C122B.i2 with relatively high bootstrap value of 94%. In this cluster, it was observed only Chinese strains.

The segregation of wild silk *B. mori* sequences in clusters related to the origin was previously observed by Li and collaborators (Li et al. 2005). The C122B.i3 and the hybrid (GenBank accession no. AF541967) made up new cluster (Figure 4). These strains group separately and present the largest divergence to the first cluster with a higher bootstrap value (96%), and also a great divergence to the third cluster with 100% of bootstrap value.

These results demonstrated that the Chinese C122B strain presents a high variability, a mixed race that can group together with the Chinese, Japanese and also with the hybrid. The intermixed segregation of *B. mori* strains from different geographic locations may have different explanations. For example, it might be an indication of gene flow among geographic populations. Alternatively, it may suggest that a relatively recent ancestral population gave rise to modern geographic groups or group originated from another region and/or new population, derived for a non controlled breeding. A combination of these scenarios would be also possible (Martinez et al. 2004, Li et al. 2005).

DNA bent sites and 2D modelling

Computational analyzes of all introns from *fib-L* gene showed that only the first (data not shown) and third intron presented intrinsic DNA curvature. The *fib-L* third intron is an important region, which presents breakpoints when the *Nd-s^D* mutation is inserted. Our results show intrinsic curvature in all of the individual's sequences and the strong peak is located in the position where the *Nd-s^D* breakpoint occurs. We suggest that the intrinsic curvature constitutes a potential region for recombination (Milot et al. 1992).

It has been reported that intrinsic DNA curvature facilitates the binding of proteins such as DNA topoisomerase I and II (review in Fiorini et al. 2006a). In principle, bent DNA could also facilitate the binding of diethyl sulphate or other compounds such as insecticides which are used in the agriculture which would provide breaks and recombination events and induce the *Nd-s^D* mutation.

Ours results brings new questions about the variability and the structure of the *fib-L* third intron. Can this bent structure improve the recombination in this chromosomal segment? Is it possible that the described 16 bp sequence nucleotide has duplicated before the segment break? If so, is this duplication the reason for the breakage? Although it is reported that the *Nd-s* mutant was achieved through population breeding and the *Nd-s^D* was obtained from diethyl sulphate treatment, no additional 16 bp sequence was found in the downstream region of the chromosome, where the breakage and joint point for the new mutated sequence occurs. The diethyl sulphate and related compounds are carcinogenic chemical compounds that might be able to duplicated segments and break the DNA molecule; the intrinsic bent curvature can improve that ability, as related elsewhere (Milot et al. 1992). To answer these questions, experiments with strains in heterozygosis for the *fib-L* gene and/or breads treated with alkylating agents must be performed and analyzed for the presence of the 16 bp sequence duplication before the third intron breakage. Functional experiments with transgenic silkworms, in which the intrinsic bent structure of this intron was abolished by point mutation, can also be helpful in answering such questions. The mechanisms involved in chromosomal recombination are a powerful tool in providing knowledge in this area for the further understanding regarding the mutation processes in eukaryotes cells.

Acknowledgements

We thank Valmir Peron and Marli Licero Schuete Silva for their dedicated technical assistance. JF receive a graduate fellowship from CNPq, and JPB and DBZ receive fellowships from CAPES. This work was supported by grants from CNPq, FINEP,

Fundação Araucária, Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior, SETI, FUNDO PARANA, The Academy of Sciences for Developing World – TWAS and Science and Innovation Santander Banespa 2006 Prize.

REFERENCES

- Bode J, Benham C, Ernst E, Knopp A, Marschalek R, Strick R, Strissel P, 2000. Fatal connections: when DNA ends meet on the nuclear matrix. *J Cell Biochem* 35:3-22.
- Bolshoy A, McNamara P, Harrington RE, Trifonov EN (1991) Curved DNA without A-A: experimental estimation of all 16 DNA wedge angles. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(6):2312-2316.
- de Souza ON, Ornstein RL (1998) Inherent DNA curvature and flexibility correlate with TATA box functionality. *Biopolymers* 46(6):403-415.
- Eckdahl TT, Anderson JN (1987) Computer modelling of DNA structures involved in chromosome maintenance. *Nucleic Acids Res* 15(20):8531-8545.
- Fiorini A, Basso LR, Paçó-Larson ML, Fernandez MA (2001) Mapping of intrinsic bent DNA sites in the upstream region of DNA puff *BhC4-1* amplified gene. *J Cell Biochem* 83(1):1-13.
- Fiorini A, Gouveia F de S, Fernandez MA (2006a) Scaffold/Matrix Attachment Regions and intrinsic DNA curvature. *Biochemistry (Mosc)* 71(5):481-488.
- Fiorini A, Gouveia F de S, Soares MA de M, Stocke AJ, Ciferri RR, Fernandez MA (2006b). DNA Bending in the Replication Zone of the C3 DNA Puff Amplicon of *Rhynchosciara americana* (Diptera: Sciaridae). *Mol Biol Rep* 33(1): 71-82.

Gamo T, Sato S (1985) Ultrastructural study of the posterior silk gland in the *Nd*, *Nd-s^D* mutants with a defect of fibroin synthesis. J Seric Sci Jpn 54:412-419.

Ganguly A, Prockop DJ, (1995) Detection of mismatched bases in double-stranded DNA by gel electrophoresis. Electrophoresis. 16:1830-1835.

Ganguly A, Rock MJ, Prockop DJ (1993) Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes. Proc Natl Acad Sci USA 90:10325-10329.

Iarovaia OV, Bystritskiy A, Ravcheev D, Hancock R, Razin SV (2004) Visualization of individual DNA loops and a map of loop domains in the human dystrophin gene. Nucleic Acids Res 32(7):2079–2086.

Inoue S, Tanaka K, Arisaka F, Kimura S, Ohtomo K, Mizuno S, 2000. Silk fibroin of *Bombyx mori* is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6:6:1 molar ratio. J Biol Chem 275(51):40517-40528.

Kikuchi Y, Mori K, Suzuki S, Yamaguchi K, Mizuno S (1992) Structure of the *Bombyx mori* fibroin light-chain-encoding gene: upstream sequence elements common to the light and heavy chain. Gene 110 (2):151-158.

Kim I, Bae JS, Sohn HD, Kang PD, Ryu KS, Sohn BH, Jeong WB, Jin BR (2000) Genetic homogeneity in the domestic silkworm, *Bombyx mori*, and phylogenetic relationship between *B. mori* and the wild silkworm, *B. mandarina* using mitochondrial COI gene sequences. *Int J Indust Entomol* 1:9–17.

Li M., Shen L, Xu A, Miao X, Hou C, Sun P, Zhang Y, Huang Y (2005) Genetic diversity among silkworm (*Bombyx mori* L., Lep., Bombycidae) germplasms revealed by microsatellites. *Genome* 48(5):802-810.

Manning RF, Gage LP (1980) Internal structure of the silk fibroin gene of *Bombyx mori*. II. Remarkable polymorphism of the organization of crystalline and amorphous coding sequences. *J Biol Chem* 255(19):9451-9457.

Marilley M, Pasero P (1996) Common DNA structural features exhibited by eukaryotic ribosomal gene promoters. *Nucleic Acids Res* 24(12):2204-2211.

Martinez L, Almagro JC, Coll JL, Herrera RJ (2004). Sequence variability in the fibroin-H intron of domesticated and wild silk moths. *Insect Biochem Mol Biol* 34(4):343-52. Erratum in: *Insect Biochem Mol Biol*. 34(6):595.

Mills DR, Goldsmith MR (2000) Characterization of early follicular cDNA library suggests evidence for genetic polymorphisms in the inbred strain C108 of *Bombyx mori*. *Genes Genet Syst* 75(2):105-113.

Milot E, Belmaaza A, Wallenburg JC, Gusew N, Bradley WE, Chartrand P (1992) Chromosomal illegitimate recombination in mammalian cells is associated with intrinsically bent DNA elements. EMBO J 13:5063-5070.

Mohandas TP, Sethuraman BN, Saratchandra B, Chatterjee SN (2004) Molecular genetic approach for identifying markers associated with yield traits in the silkworm, *Bombyx mori* using RFLP-STS primers. Genetica 122(2):185-97.

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

Nagaraju J (2000) Recent advances in molecular genetics of the silk moth, *Bombyx mori*. Current Sci 2:151–161.

Ohmachi T, Nagayama H, Shimura K, 1982. The isolation of a messenger RNA coding for the small subunit of fibroin from the posterior silkgland of the silkworm, *Bombyx mori* FEBS Lett 146(2):385-388.

Pasero P, Sjakste N, Blettry C, Got C, Marilley M (1993) Long-range organization and sequence-directed curvature of *Xenopus laevis* satellite 1 DNA. Nucleic Acids Res 21(20):4703-4710.

Razin SV (1999) Chromosomal DNA loops may constitute basic units of the eukaryotic genome organization and evolution. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 9(3-4):279-283.

Royer C, Jalabert A, da Rocha M., Grenier AM, Mauchamp B, Couble P, Chavancy G (2005) Biosynthesis and cocoon-export of a recombinant globular protein in transgenic silkworms Transgenic Res 14(4):463-472.

Sierra-Montes JM, Pereira-Simon S, Freund AV, Ruiz LM, Szmulewicz MN, Herrera RJ (2003) A diversity of U1 small nuclear RNAs in the silk moth *Bombyx mori*. Insect Biochem Mol Biol 33(1):29-39.

Svetlova EY, Razin SV, Debatisse M (2001) Mammalian recombination hot spot in a DNA loop anchorage region: A model for the study of common fragile sites. J Cell Biochem 81(S36):170-178.

Tamura T, Thibert C, Royer C, Kanda T, Abraham E, Kamba M, Komoto N., Thomas JL, Mauchamp B, Chavancy G, et al., 2000. Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector Nat Biotechnol 18:81–84.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22(22):4673-4680.

Tomita M, Munetsuna H, Sato T, Adachi T, Hino R, Hayashi M, Shimizu K, Nakamura N, Tamura T, Yoshizato K (2003) Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. *Nat Biotechnol* 21(1):52–56.

Wu HM, Crothers DM (1984) The locus of sequence-directed and protein-induced DNA bending. *Nature* 308(5959):509-513.

Xiang ZH (1995) In Genetics and Breeding of the Silkworm. Chinese Agriculture Press, Beijing. 273–289.

Yamaguchi K, Kikuchi Y, Takagi T, Kikuchi A, Oyama F, Shimura K, Mizuno S, (1989). Primary structure of the silk fibroin light chain determined by cDNA sequencing and peptide analysis. *J Mol Biol* 210(1):127-139.

LEGENDS

Figure 1 Graphic representation of the *fib-L* chain gene with 14478 pb (Kikuchi et al. 1992, accession number M76430). Dark gray box represents exons, black bars represent the ~900 bp amplified region, stippled lines represent a 685 bp sequenced region and grey arrows indicate forward and reverse primer. The position of the seven exons is shown on the left side.

Figure 2 CSGE electrophoresis analyses of the 900 bp PCR product (white arrow) in the *fib-L* third intron gene. Three individuals, i1, i2, and i3 for each strain (HAB, C121A and C122B) are shown. M - Molecular weight marker 1kb Ladder (Invitrogen).

Figure 3 Alignment sequences of the *fib-L* third intron gene (including exon-intron junctions) from different *B. mori* strains. The sources of DNA sequence and geographical origins are provided in Table 1. In this alignment, the Japanese strain M76430 was used as reference. The Japanese strains HAB.i1; i2; i3, and M76430 showed similarity in their sequences forming a group. All individuals from the Chinese strains C122B and C121A, and the hybrid AF541967 showed larger variability in their sequences when compared and were divided into two groups. The dots represent homology to the M76430 sequence. Dashes indicate insertion/deletion events. The nucleotide transitions are shown in red and transversions in blue. The green regions delimit the conserved regions. The violet box indicates the sequence that is duplicated in *Nd-s^D* mutation. Orange box, in both sequence extremities, demarcate the exon-intron junctions.

Figure 4 ML phylogenetic analysis in *Bombyx mori* strains *fib-L* third intron gene. There are presented the amplified DNA sequence of the three individuals of the *Bombyx mori* from HAB, C121A, C122B strains, the previously described sequence from the Japanese M76430 strain, and the hybrid AF541967. Labels on internal nodes correspond to bootstrap values out of 1000 replicates.

Figure 5 Electrophoresis behaviour analysis of the *fib-L* third intron gene restriction fragment with ~900 bp from C121A.i3 and C122B.i3 clones (lanes 1 and 2 respectively). AGA, 1.0% agarose gel; PA, 6% polyacrylamide gel without bromide ethidium and PA+EthBr, 6% polyacrylamide gel with bromide ethidium. Both fragments show reduced mobility; an R-value of 1.64 for C121A.i3 and 1.59 for C122B.i3. M - Molecular weight marker 1kb Ladder (Invitrogen).

Figure 6 2D projection of 3D DNA path and ENDS ratio graphic of the C121A. i3 (**A**) and C122B. i3 (**B**) *fib-L* third intron gene sequence. The rotation of these fragments in 30 and 60 degrees confirms that the bend regions (small circles), localized at 10965 bp position, are important for the fragment shape maintenance.

Tabela 1

Tabela 1
Geographic origins of the *B. mori* strains, accession number in GeneBank and references.

Strains	Geographic Origin	Individual	Acession Number	Reference
HAB	Japanese	.i1	<u>EF050749</u>	Present study
		.i2	<u>EF050750</u>	
		.i3	<u>EF050751</u>	
C121A	Chinese	.i1	<u>EF050752</u>	Present study
		.i2	<u>EF050753</u>	
		.i3	<u>EF050754</u>	
C122B	Chinese	.i1	<u>EF050755</u>	Present study
		.i2	<u>EF050756</u>	
		.i3	<u>EF050757</u>	
J-139	Japanese	-----	<u>M76430</u>	<u>Kikuchi et al.,1992</u>
Jam 123 X 124	Hybrid	-----	<u>AF541967</u>	Choi, 2002

FIGURA 1

Figure 1 Graphic representation of the *fib-L* chain gene with 14478 pb (Kikuchi et al. 1992, accession number M76430). Dark gray box represents exons, black bars represent the ~900 bp amplified region, stippled lines represent a 685 bp sequenced region and grey arrows indicate forward and reverse primer. The position of the seven exons is shown on the left side.

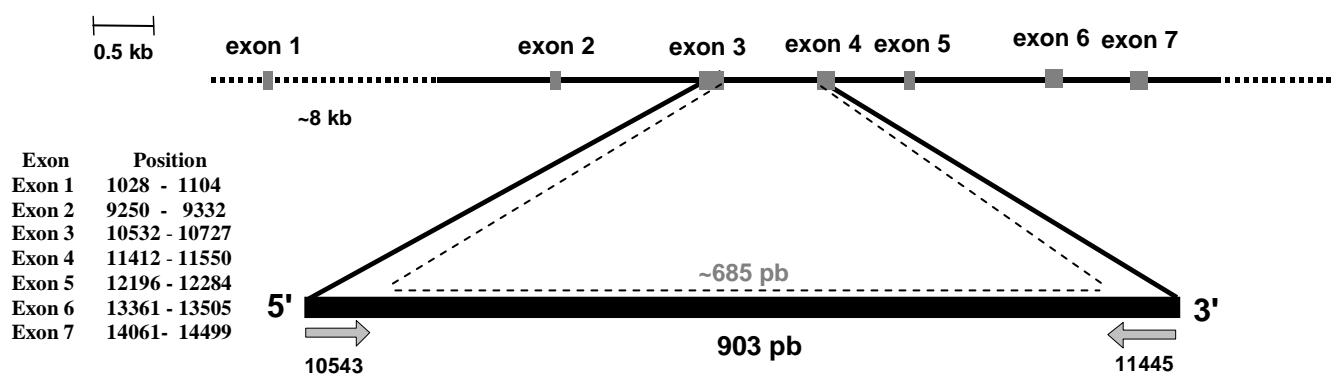


FIGURA 2

Figure 2 CSGE electrophoresis analyses of the 900 bp PCR product (white arrow) in the *fib-L* third intron gene. Three individuals, i1, i2, and i3 for each strain (HAB, C121A and C122B) are shown. M - Molecular weight marker 1kb Ladder (Invitrogen).

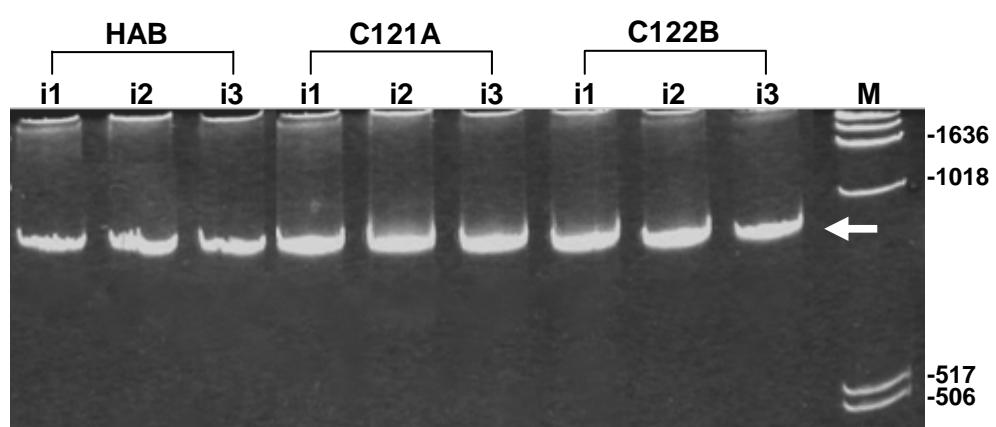
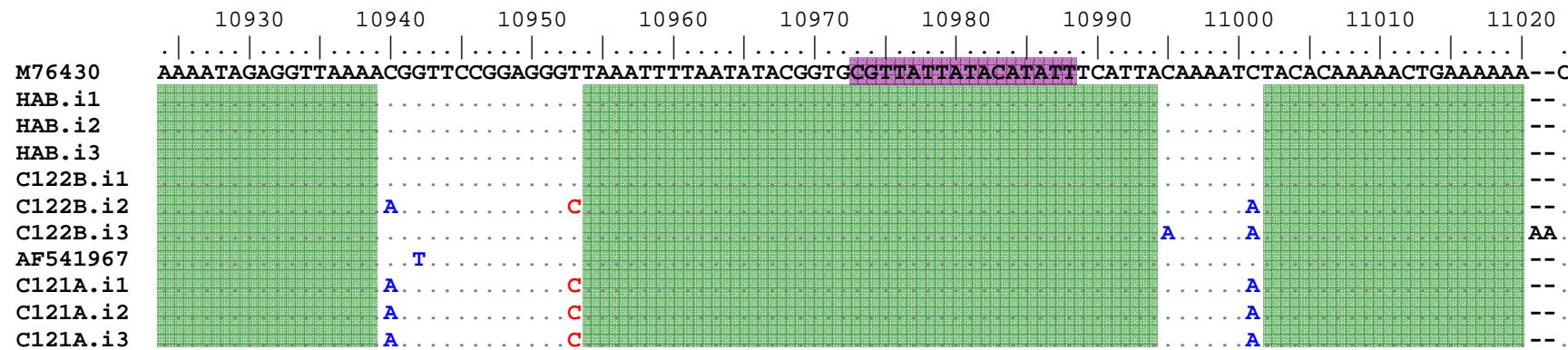
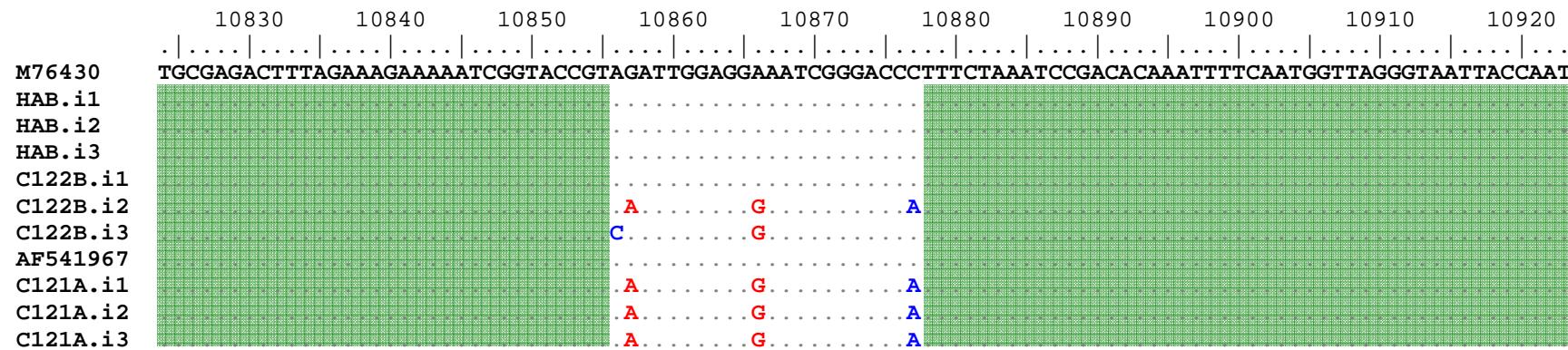
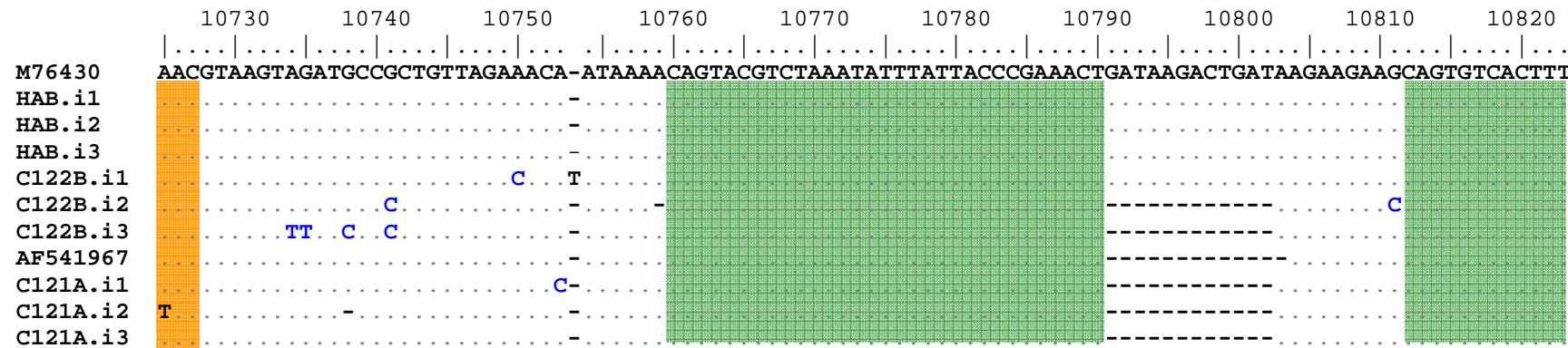


FIGURA 3

Figure 3 Alignment sequences of the *fib-L* third intron gene (including exon-intron junctions) from different *B. mori* strains. The sources of DNA sequence and geographical origins are provided in Table 1. In this alignment, the Japanese strain M76430 was used as reference. The Japanese strains HAB.i1; i2; i3, and M76430 showed similarity in their sequences forming a group. All individuals from the Chinese strains C122B and C121A, and the hybrid AF541967 showed larger variability in their sequences when compared and were divided into two groups. The dots represent homology to the M76430 sequence. Dashes indicate insertion/deletion events. The nucleotide transitions are shown in red and transversions in blue. The green regions delimit the conserved regions. The violet box indicates the sequence that is duplicated in *Nd-s^D* mutation. Orange box, in both sequence extremities, demarcate the exon-intron junctions.



	11320	11330	11340	11350	11360	11370	11380	11390	11400	11410
M76430	C--AATCTACTGTATCCAAAATTATTCCCTTAAACATCCAATATTACCTGTTG	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HAB.i1	--- G	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HAB.i2	--- T	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HAB.i3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
C122B.i1	--- T	---	---	---	G	---	---	---	---	---
C122B.i2	---	---	---	C	T	G	---	---	---	---
C122B.i3	T --	---	---	T	---	---	---	T	A	---
AF541967	---	---	---	T	---	---	---	---	---	---
C121A.i1	CC.	---	C	T	T	AG	---	G	TTG	---
C121A.i2	CCT	---	---	T	T	AG	---	GGT	--G	C
C121A.i3	---	---	---	T	T	- G	---	G	---	---

11414

M76430	GGTC
HAB.i1	---
HAB.i2	---
HAB.i3	---
C122B.i1	---
C122B.i2	---
C122B.i3	---
AF541967	---
C121A.i1	---
C121A.i2	---
C121A.i3	---

FIGURA 4

Figure 4 ML phylogenetic analysis in *Bombyx mori* strains *fib-L* third intron gene. There are presented the amplified DNA sequence of the three individuals of the *Bombyx mori* from HAB, C121A, C122B strains, the previously described sequence from the Japanese M76430 strain, and the hybrid AF541967. Labels on internal nodes correspond to bootstrap values out of 1000 replicates.

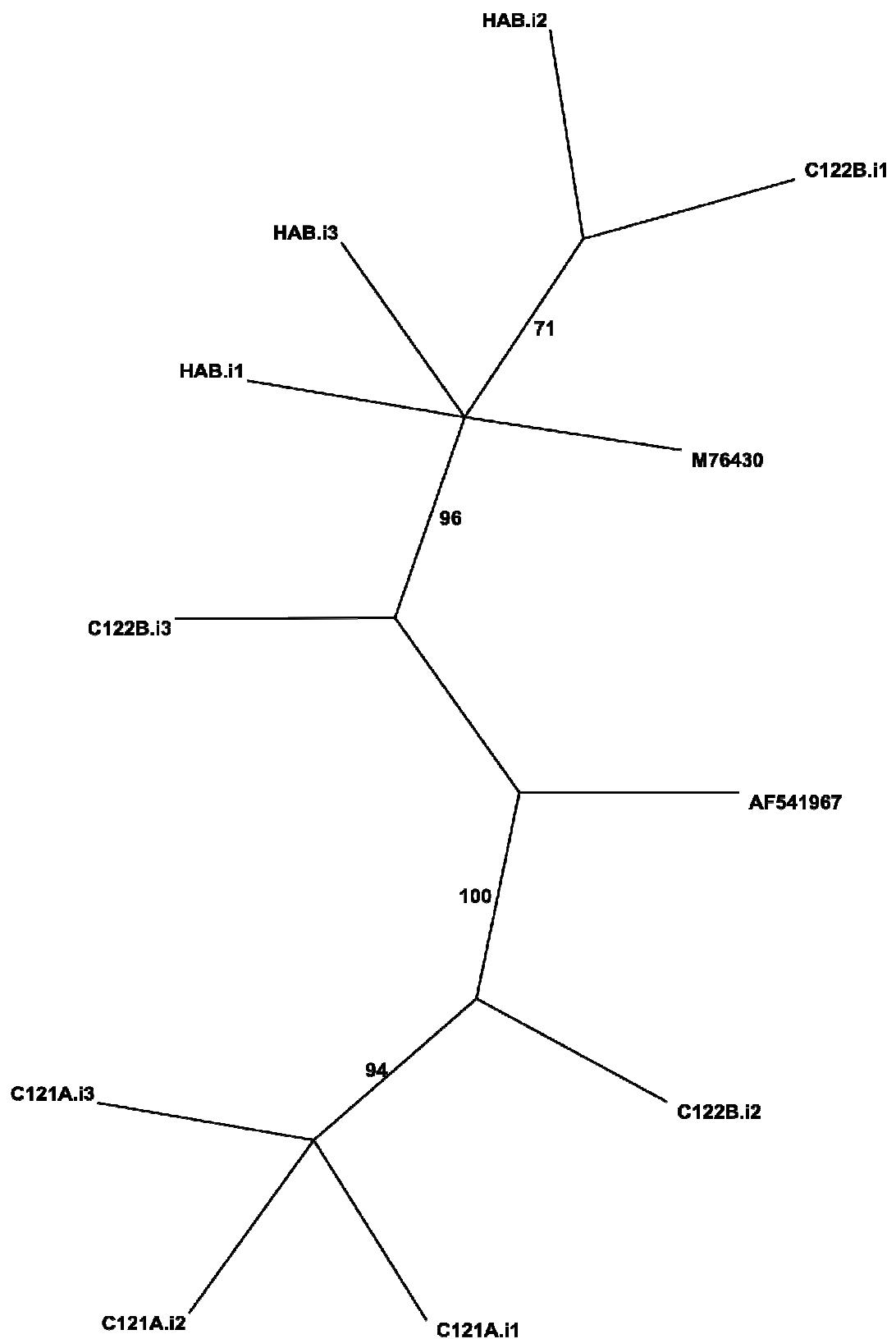


FIGURA 5

Figure 5 Electrophoresis behaviour analysis of the *fib-L* third intron gene restriction fragment with ~900 bp from C121A.i3 and C122B.i3 clones (lanes 1 and 2 respectively). AGA, 1.0% agarose gel; PA, 6% polyacrylamide gel without bromide ethidium and PA+EthBr, 6% polyacrylamide gel with bromide ethidium. Both fragments show reduced mobility; an R-value of 1.64 for C121A.i3 and 1.59 for C122B.i3. M - Molecular weight marker 1kb Ladder (Invitrogen).

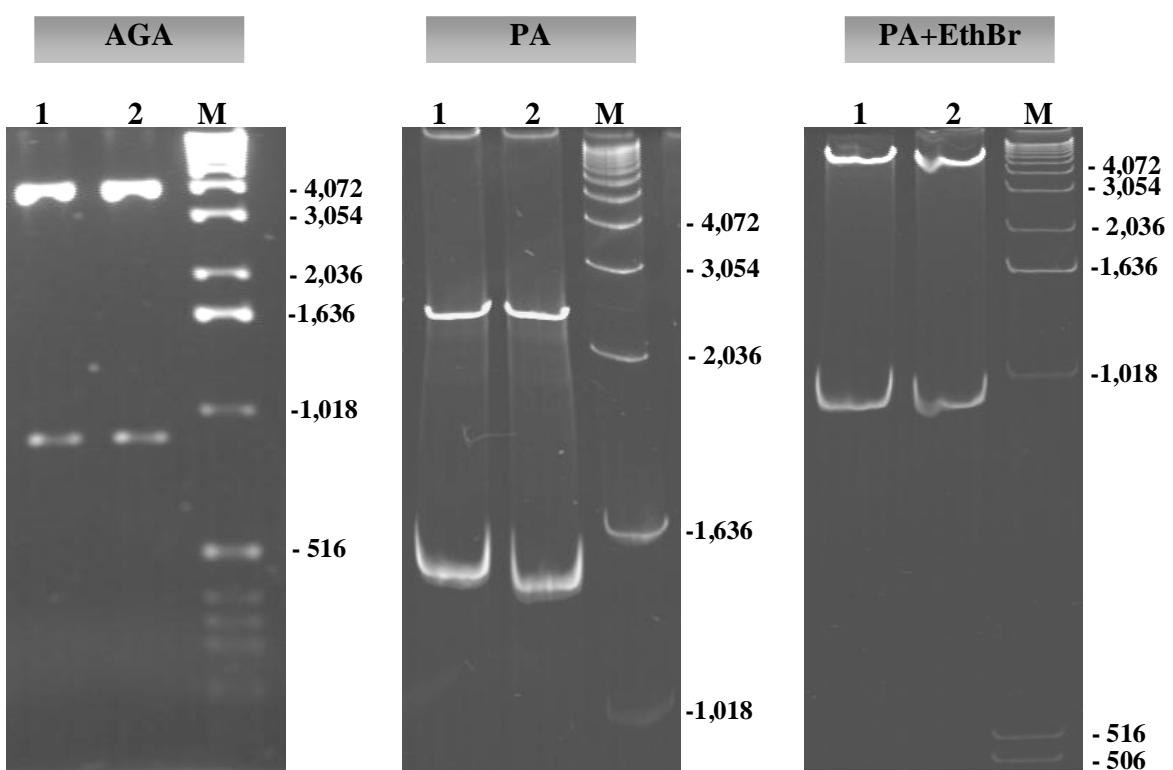
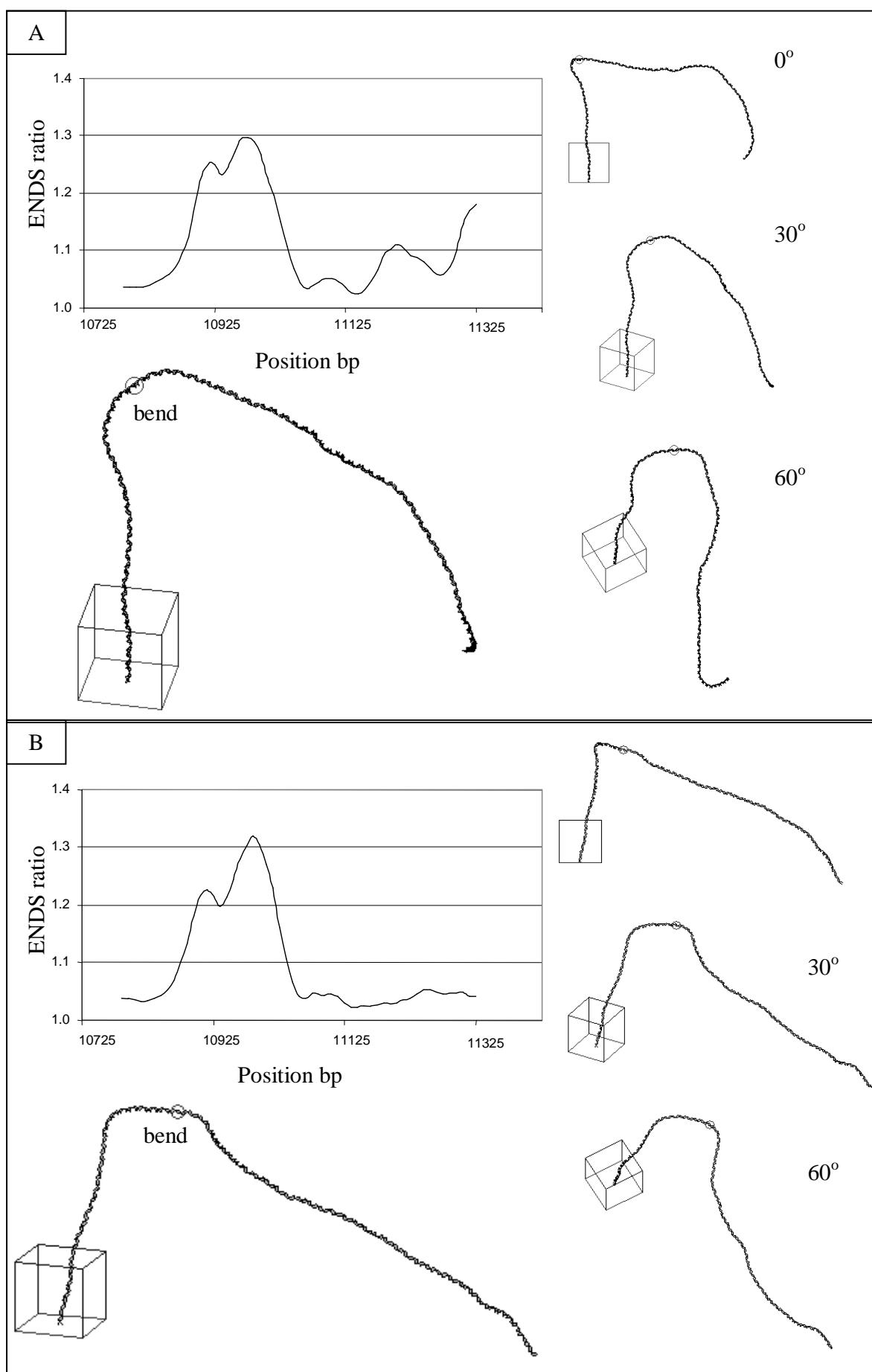


FIGURA 6

Figure 6 2D projection of 3D DNA path and ENDS ratio graphic of the C121A. i3 (**A**) and C122B i3 (**B**) *fib-L* third intron gene sequence. The rotation of these fragments in 30 and 60 degrees confirms that the bend regions (small circles), localized at 10965 bp position, are important for the fragment shape maintenance.



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)

[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)

[Baixar livros de Literatura Infantil](#)

[Baixar livros de Matemática](#)

[Baixar livros de Medicina](#)

[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)

[Baixar livros de Meio Ambiente](#)

[Baixar livros de Meteorologia](#)

[Baixar Monografias e TCC](#)

[Baixar livros Multidisciplinar](#)

[Baixar livros de Música](#)

[Baixar livros de Psicologia](#)

[Baixar livros de Química](#)

[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)

[Baixar livros de Serviço Social](#)

[Baixar livros de Sociologia](#)

[Baixar livros de Teologia](#)

[Baixar livros de Trabalho](#)

[Baixar livros de Turismo](#)