



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DE CRITÉRIOS DE COMPATIBILIDADE  
ENTRE PARES DE *PRIMERS* PARA OTIMIZAÇÃO DE  
SISTEMAS *MULTIPLEX* DE GENOTIPAGEM**

**ANA CLARA DE OLIVEIRA FERRAZ BARBOSA**

Goiânia, GO – Brasil  
Janeiro – 2010



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DE CRITÉRIOS DE COMPATIBILIDADE  
ENTRE PARES DE *PRIMERS* PARA OTIMIZAÇÃO DE  
SISTEMAS *MULTIPLEX* DE GENOTIPAGEM**

**ANA CLARA DE OLIVEIRA FERRAZ BARBOSA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia, área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador:

**Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho**

Goiânia, GO – Brasil  
Janeiro – 2010

Aos meus queridos pais, Coraci e Eurípedes,  
irmãos, Juliano, André e Clara Juliene,  
sobrinhos, tios, tias, primos e primas,

aos meus queridos sogro e sogra, Luiz Antônio e Alci,  
cunhados e cunhadas  
e ao meu eterno amado, José Luiz,

**DEDICO**

Aos meus inesquecíveis avós  
Irongina (*in memoriam*) e Domingos, Ana (*in memoriam*) e Abel (*in memoriam*)

**OFEREÇO**

*Mas também nos gloriamos nas tribulações,  
sabendo que a tribulação produz  
perseverança; e a perseverança, experiência;  
e a experiência, esperança.*

*(Romanos, 5.3,4)*

## AGRADECIMENTOS

- Primeiramente eu agradeço a Deus pela minha vida;
- Aos meus pais, pelo estímulo e apoio que sempre me deram para aprofundar meus estudos e buscar construir uma carreira;
- A todos os professores que contribuíram para minha formação até aqui;
- Ao Professor Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho, pela orientação, sem a qual seria impossível a realização desse trabalho;
- Ao Projeto *Genolyptus* pela concessão dos *primers* e dos recursos financeiros necessários para a execução deste trabalho;
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida durante o período de realização do curso;
- Aos colegas do Laboratório de Genética e Genômica de Plantas da Universidade Federal de Goiás, em especial ao Luciano (Medina), Angel e à Ana Carolina (Carol), pelos ensinamentos, ajuda e paciência na bancada;
- Aos colegas do Setor de Melhoramento de Plantas da Escola de Agronomia da UFG, em especial à minha amiga Giselle, pelos jejuns e orações;
- A todos os meus amigos e familiares, os quais compreenderam a minha ausência;
- Ao meu marido, meu “porto seguro”, José Luiz, pelo amor, pela confiança, pelo incentivo e pelo companheirismo em todos os momentos...

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS.

## BIOGRAFIA

Ana Clara de Oliveira Ferraz Barbosa, filha de Eurípedes Luiz de Oliveira e Coraci Marcelina de Queiroz, nasceu em 13 de março de 1981 na cidade de Palmeiras de Goiás (GO). Entre 1999 e 2003 cursou Biologia na Universidade de Brasília (UnB), habilitando-se como Bacharel e Licenciada. Na UnB veio a conhecer José Luiz Ferraz Barbosa, com o qual se casou no ano de 2005. Em 2006 teve contato com o Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho, da Universidade Federal de Goiás (UFG), o qual lhe concedeu um estágio no Laboratório de Genética e Genômica de Plantas. Em março do ano seguinte iniciou o Mestrado sob orientação do mesmo, sendo este trabalho fruto desta Pós-Graduação.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética e Genômica de Plantas da Universidade Federal de Goiás, sob a orientação do Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho, com recursos do Projeto *Genolyptus* e Bolsa de Pós-Graduação (Mestrado) concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>11</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>17</b>
3.1 Marcadores moleculares .....	17
3.1.1 Marcadores microssatélites.....	19
3.2 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).....	23
3.2.1 A origem da PCR.....	23
3.2.2 Como ocorre uma PCR.....	24
3.2.3 Desenvolvimento de sistemas <i>multiplex</i> de genotipagem.....	27
3.2.4 Aspectos termodinâmicos da PCR.....	32
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
4.1 Material vegetal .....	35
4.2 <i>Screening</i> dos <i>primers</i> .....	35
4.3 Teste dos pares de <i>primers</i> .....	38
4.4 Avaliação de critérios de compatibilidade entre pares de <i>primers</i> .....	39
4.4.1 Análise com o <i>software</i> Multiplexer.....	39
4.4.2 Análise com o <i>software</i> AutoDimer .....	43
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
5.1 <i>Screening</i> dos <i>primers</i> .....	46
5.2 Teste dos pares de <i>primers</i> .....	47

5.3	Avaliação de critérios de compatibilidade entre pares de <i>primers</i> .....	51
5.3.1	Análise com o <i>software</i> Multiplexer .....	51
5.3.2	Análise com o <i>software</i> AutoDimer .....	60
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>74</b>
	Anexo 1. Lista dos 94 locos selecionados no <i>screening</i> com suas respectivas informações. ....	74
	Anexo 2. Lista dos 74 pares de <i>primers</i> testados, com seus respectivos resultados de bancada e dos <i>softwares</i> . ....	76



## RESUMO

BARBOSA, A. C. O. F. **Avaliação de critérios de compatibilidade entre pares de primers para otimização de sistemas multiplex de genotipagem.** 2010. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biologia: Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.<sup>1</sup>

*Palavras-chave:* marcadores moleculares, microssatélites, genotipagem, multiplex, multiplexer.

Os avanços da Biologia Molecular e da Genética proporcionaram o surgimento de diversos marcadores moleculares que detectam o polimorfismo genético diretamente no DNA. Entre estes marcadores se encontram os microssatélites (SSR), que se destacam pelo seu elevado grau de polimorfismo. O uso desses marcadores para fins de genotipagem individual tem evoluído para sistemas multiplex, os quais permitem que vários fragmentos SSR sejam detectados e analisados simultaneamente. Atualmente são abundantes na literatura artigos que discutem os critérios a serem utilizados no desenho de pares de *primers* para aplicação em PCR, bem como estão disponíveis diversos *softwares* para este fim. No entanto, ainda são escassos os estudos e ferramentas destinados à análise de compatibilidade entre pares de *primers* para aplicação em sistemas multiplex, onde vários fragmentos são amplificados simultaneamente por PCR. Neste trabalho são avaliados diferentes critérios de compatibilidade entre pares de *primers*. Um conjunto de 74 combinações de pares de *primers*, envolvendo a amplificação de 94 locos SSR foram avaliados em sistemas *duplex*. As mesmas combinações foram avaliadas segundo diferentes critérios, incluindo o grau de complementariedade entre *primers*, magnitude das diferenças de temperaturas de desnaturação ( $T_m$ ) e a tendência ao anelamento entre pares de *primers* com base na energia livre de Gibbs resultante da

---

<sup>1</sup> Orientador: Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho, EA/UFG.

associação entre eles. A comparação entre os diferentes critérios permitiu a identificação de um conjunto de critérios com valor preditivo positivo igual a 94%. Estes critérios foram implementados para utilização em um *software* denominado Multiplexer, que a partir da análise de sequências de pares de *primers*, sugere combinações compatíveis para a utilização em sistemas de genotipagem *multiplex*. O uso dessa ferramenta pode reduzir consideravelmente os custos laboratoriais relativos às atividades de genotipagem utilizando PCR.

## ABSTRACT

BARBOSA, A. C. O. F. **Evaluation of compatibility criteria among primers pairs for optimizing multiplex genotyping systems.** 2010. 75 f. Dissertation (Master in Biology: Cellular and Molecular Biology) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.<sup>2</sup>

*Keywords:* molecular markers, microsatellites, genotyping, multiplex, multiplexer.

The progress of Molecular Biology and Genetics provided the appearance of several molecular markers that detect the genetic polymorphism directly at DNA. Among these markers are the microsatellites (SSR), which are distinguished by their high degree of polymorphism. The use of these markers for individual genotyping has evolved into multiplex systems, which allow many SSR fragments to be detected and analyzed simultaneously. Currently there are several articles in literature discussing the criteria to be used in the primer design for use in PCR, as well as various softwares are available for this end. However, there are few studies and tools for the analysis of compatibility between pairs of primers for use in multiplex systems, where multiple fragments are simultaneously amplified using PCR. This paper evaluated different criteria for compatibility between pairs of primers. A set of 74 combinations of pairs of primers, involving the amplification of 94 SSR loci were evaluated in duplex systems. The same combinations were evaluated according to different criteria, including the degree of complementarity between primers, the magnitude of differences of denaturation temperatures ( $T_m$ ) and the tendency to annealing between pairs of primers based on the Gibbs free energy resulting from the association between them. The comparison between the different criteria allowed the identification of a set of criteria with positive predictive value equal to 94%. These criteria were implemented for use in a software called Multiplexer, which from the

---

<sup>2</sup> Adviser: Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho, EA/UFG.

analysis in sequence of pairs of primers, suggests compatible combinations for use in multiplex genotyping systems. Using this tool can significantly reduce the costs related to laboratory activities for genotyping using PCR.

# 1 INTRODUÇÃO

Os avanços das técnicas modernas de Genética e Biologia Molecular proporcionaram o surgimento de diversos tipos de marcadores moleculares que detectam o polimorfismo genético diretamente no DNA (FALEIRO, 2007). Entre os diferentes tipos de marcadores existentes, uma classe conhecida como microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*), ou ainda STR (*Short Tandem Repeats*), se destaca por ser altamente polimórfica. Estes locos são caracterizados geralmente por uma sequência de um a seis nucleotídeos de comprimento que se repete em *tandem*, ou seja, ocorrem consecutivamente uma após a outra.

As regiões denominadas de microssatélites apresentam o maior conteúdo informativo por loco gênico entre todas as classes de marcadores moleculares atualmente utilizadas (GOLDSTEIN & SCHLOTTERER, 1999; citados por PEREIRA, 2008). Essas sequências apresentam uma elevada taxa de mutação, resultando em uma ampla variação no número de unidades repetidas, o que faz com que os marcadores baseados em microssatélites sejam altamente informativos e apresentem elevado potencial de utilização em programas de melhoramento de plantas, na construção de mapas genéticos e na identificação individual (BYRNE et al., 1996; GOLDSTEIN & SCHLOTTERER, 1999; citados por LOURENÇO, 2004).

Os marcadores microssatélites são muito atrativos para os geneticistas de plantas por apresentarem as seguintes características: são tipicamente codominantes e multialélicos, com uma heterozigosidade esperada frequentemente acima de 0,7; são altamente polimórficos, permitindo uma discriminação precisa de indivíduos próximos; são abundantes e uniformemente dispersos no genoma de plantas; podem ser analisados por ensaios de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e suas informações podem ser facilmente compartilhadas entre laboratórios (BRONDANI et al., 1998).

Segundo FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1998), a limitação básica que existia para a aplicação mais ampla da tecnologia de SSR na análise genética e melhoramento de plantas referia-se à grande quantidade de trabalho envolvida, exigindo pessoal especializado e equipamento sofisticado para o sequenciamento de

DNA, aliado ao alto custo de um empreendimento desta natureza. Atualmente, essas limitações foram em grande parte superadas, embora algumas etapas relacionadas ao isolamento de microssatélites ainda sejam trabalhosas. Uma revisão feita por ZANE et al. (2002) descreve vários métodos de isolamento de microssatélites comumente encontrados na literatura.

Existem muitas formas de se realizar a genotipagem de locos microssatélites. Atualmente, um dos métodos mais elaborados de genotipagem se baseia no uso de sistemas automatizados que permitem a análise de fragmentos produzidos por PCR utilizando *primers* marcados com fluorescência. Neste contexto, a utilização de marcadores microssatélites para fins de genotipagem em larga escala tem evoluído para o desenvolvimento de sistemas de genotipagem multiloco semi-automatizados, os denominados sistemas *multiplex*. Estes sistemas permitem que vários fragmentos microssatélites sejam detectados e analisados simultaneamente em analisadores automáticos de DNA, resultando em maior precisão na detecção alélica, redução de custos e tempo de análise, além da minimização dos erros inerentes à análise manual e meramente visual (RANGEL et al., 2005).

No entanto, o alto custo de *primers* marcados com fluorescência tem sido um fator limitante em muitos laboratórios, uma vez que a síntese de *primers* marcados custa de cinco a dez vezes mais que a de *primers* não marcados. Além disso, na análise genética de plantas, que envolve usualmente a análise de dezenas a milhares de indivíduos, estes *primers* precisam ser estocados por algum tempo, podendo perder a qualidade da fluorescência (MISSIAGGIA & GRATTAPAGLIA, 2006). Assim, é desejável o desenvolvimento de novas estratégias que possibilitem o uso desses marcadores como uma metodologia mais eficiente e com menor custo em qualquer uma das várias etapas que compõem o processo de genotipagem. Isto tornaria o uso dessa tecnologia mais acessível, permitindo que a mesma esteja envolvida no estudo de um número cada vez maior de espécies.

Na literatura existem alguns artigos que discorrem acerca do processo de otimização de sistemas de PCR *multiplex* (HENEGARIU et al., 1997; BUTLER et al., 2001; ELNIFRO et al., 2000; QIAGEN, 1999). Existem também diversos

*softwares* que auxiliam o planejamento de reações de PCR com pares de *primers* isolados, como aqueles usados para desenho de *primers* (*Primer Design*) (UNTERGASSER et al., 2007). No entanto, ainda existem poucas ferramentas computacionais disponíveis destinadas à análise de compatibilidade entre os pares de *primers* em reações de PCR que utilizem estas informações para a efetiva montagem de sistemas *multiplex* (KAPLINSKI et al., 2005; VALLONE & BUTLER, 2004).

O presente trabalho foi realizado com o intuito de contribuir para o desenvolvimento de ferramentas destinadas à otimização de sistemas *multiplex* de PCR. Procurou-se identificar, dentre os diferentes critérios mencionados na literatura, aqueles capazes de maximizar a eficiência de sistemas *multiplex* pela análise *in silico* das sequências de pares de *primers* disponíveis. Essa análise *in silico*, uma vez validada, reduziria drasticamente os custos laboratoriais envolvidos na otimização *in vitro* de sistemas *multiplex* de PCR, já que, normalmente, um grande número de reações é necessário para se avaliar a compatibilidade entre pares de *primers*. Neste contexto, o uso de ferramentas de Bioinformática poderia diminuir consideravelmente o custo e o tempo de desenvolvimento de sistemas *multiplex* de genotipagem.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de um conjunto de ferramentas de bioinformática destinadas à análise de seqüências de pares de *primers* associados a marcadores microssatélites, para fins de desenvolvimento de sistemas *multiplex* automatizados via marcação com fluorescência.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aprimoramento de um *software* (Multiplexer) de análise de seqüências de pares de *primers* para fins de obtenção de sistemas *multiplex* automatizados via marcação com fluorescência;
- Avaliação de critérios de análise de seqüências de pares de *primers* para fins de desenvolvimento de sistemas *multiplex*;
- Desenvolvimento de sistemas *multiplex* de marcadores microssatélites em *Eucalyptus*.

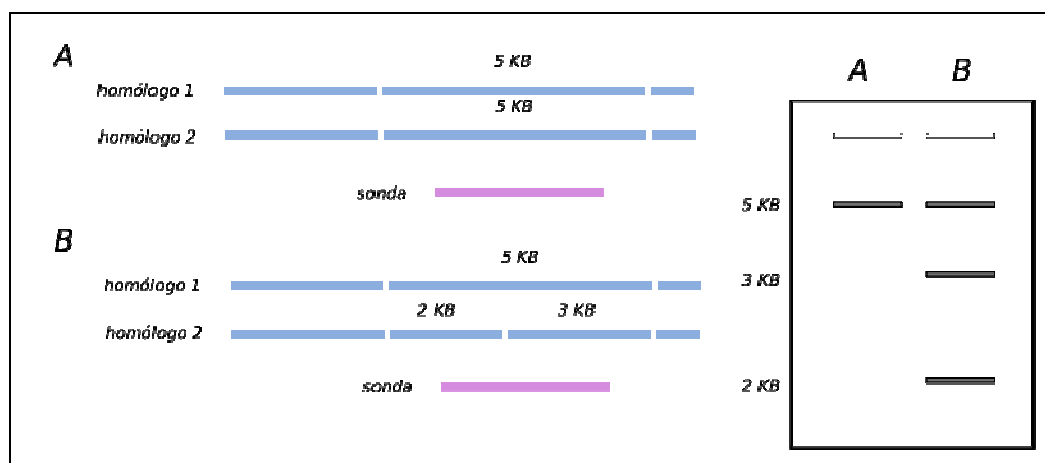


### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 MARCADORES MOLECULARES

Como resultado dos esforços de se estudar a variabilidade genética nas mais variadas formas de organismos vivos foram desenvolvidas técnicas que permitem determinar pontos de referência nos cromossomos que diferenciam indivíduos, denominados marcadores moleculares (ou marcadores de DNA). Assim, marcadores moleculares podem ser definidos como características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente (MILACH, 1998).

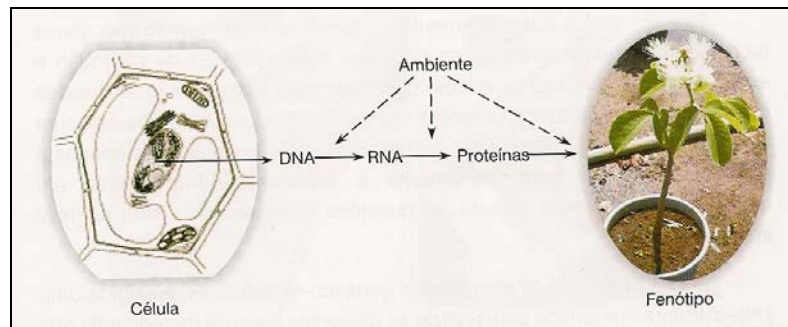
Primeiramente, o uso de enzimas de restrição permitiu a análise de polimorfismo de fragmentos de restrição de DNA (RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*) (GRODZICKER, 1974 citado por FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998) (**Figura 1**). Posteriormente, o desenvolvimento da técnica de reação em cadeia usando uma DNA polimerase – PCR (SAIKI et al., 1985; MULLIS et al., 1986; MULLIS & FALOONA, 1987) possibilitou a descrição de outras classes de marcadores moleculares (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).



**Figura 1.** Esquema de um polimorfismo de fragmentos de DNA (RFLP). O quadro à direita representa a visualização das bandas na revelação em gel. ([http://commons.wikimedia.org/wiki/File:RFLP\\_mapping.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:RFLP_mapping.svg)).

O uso de marcadores moleculares aliado ao uso de outras técnicas da Biologia Molecular, tais como a clonagem e o sequenciamento de DNA, tem possibilitado um rápido acúmulo de informações acerca da estrutura de genomas de organismos eucariotos. Um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares altamente polimórficos pode ser obtido em qualquer organismo vivo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998), sendo que esses marcadores têm sido usados com as mais diversas finalidades, entre as quais se pode citar: a identificação de indivíduos (de linhagens, de híbridos, de clones e de cultivares), a realização de testes de paternidade, a obtenção de estimativas de índices de diversidade, de taxas de fecundação cruzada, de fluxo gênico e a construção de mapas genéticos (BUSO et al., 2003), além da análise de caracterização genética objetivando a conservação e o manejo de bancos de germoplasma (FALEIRO, 2007). Os marcadores moleculares são usados em diversas áreas entre as quais se pode destacar a Biologia da Conservação, a Genética Forense e os programas de melhoramento genético de plantas e animais.

No campo do melhoramento de plantas, por exemplo, como a maioria dos caracteres de interesse é de natureza quantitativa, a seleção de indivíduos com base no fenótipo nem sempre é adequada, uma vez que o fenótipo é a expressão do genótipo sob condições ambientais específicas. Assim, quando se muda de ambiente pode-se mudar o fenótipo de um indivíduo. Uma seleção com base no genótipo dos indivíduos (seleção de variabilidade ao nível de DNA) solucionaria esse problema (MILACH, 1998). Com o avanço da Biologia Molecular, muitas técnicas que permitem a análise de polimorfismos genéticos foram desenvolvidas, sendo os marcadores moleculares uma das mais significantes descobertas no campo da Genética Molecular. O princípio da utilização desse tipo de marcadores se baseia no Dogma Central da Biologia Molecular e na pressuposição de que as diferenças no DNA (genéticas) implicam, na maior parte das vezes, em diferenças no fenótipo (**Figura 2**) (FALEIRO, 2007).



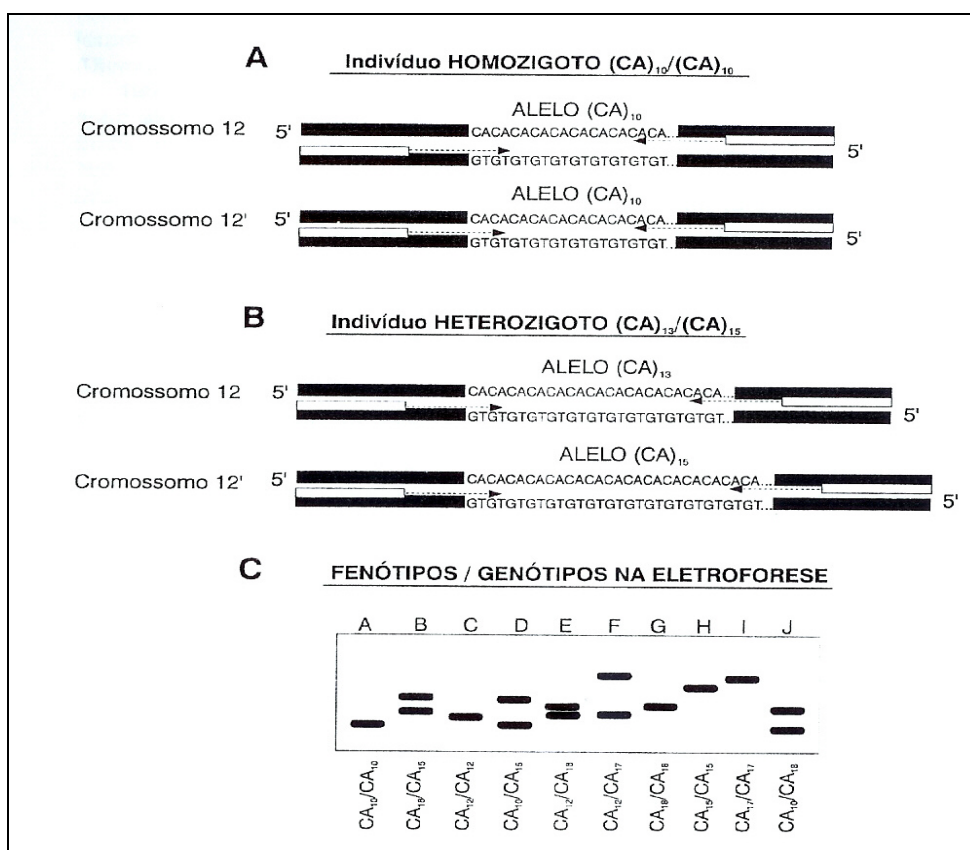
**Figura 2.** Dogma Central da Biologia Molecular mostrando a influência direta do DNA no fenótipo (FALEIRO, 2007).

Os diferentes tipos de marcadores moleculares disponíveis atualmente variam quanto à abundância no genoma, nível de polimorfismo (habilidade de detectar diferenças entre indivíduos), facilidade de uso, consistência, reprodutibilidade e quanto ao custo. Esses marcadores podem ser classificados conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e minissatélites ou locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*), STS (*Sequence Tagged Sites*), microsatélite e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (MILACH, 1998). Os marcadores revelados por amplificação foram desenvolvidos após a descoberta da PCR, a qual permitiu a amplificação de DNA *in vitro*.

### 3.1.1 Marcadores microsatélites

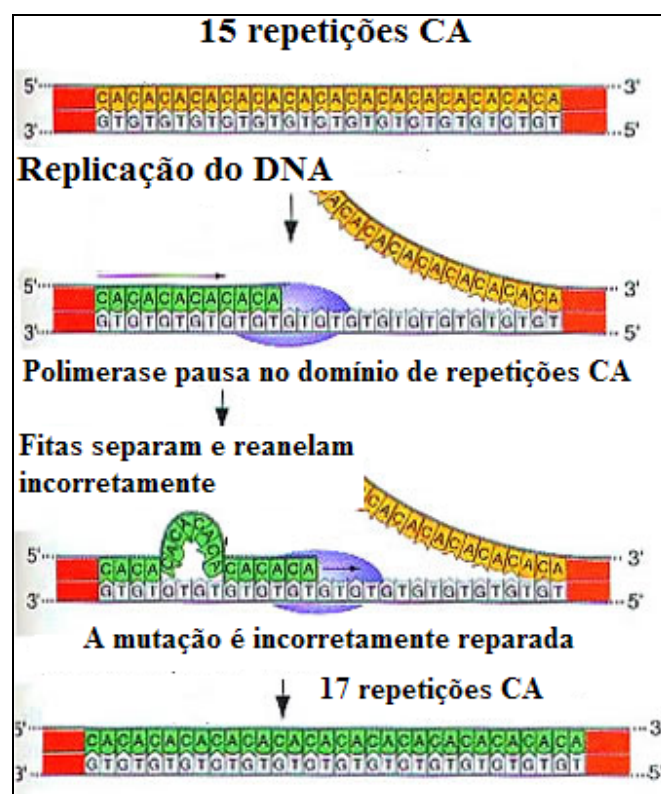
Marcadores microsatélites são repetições em *tandem* de pequenos motivos de sequência com um a seis nucleotídeos, sendo encontrados amplamente distribuídos pelo genoma da maior parte dos eucariotos, embora também estejam presentes em procariotos (LITT & LUTY, 1989). São marcadores de segregação codominante, permitindo diferenciar indivíduos homocigotos e heterocigotos, multialélicos e de grande conteúdo informativo.

O polimorfismo encontrado nesses marcadores diz respeito ao número de vezes que o núcleo de bases (*motif* ou motivo) se repete. Tendo em vista a segregação codominante e o multialelismo, os marcadores SSR são os que possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo na terminologia de marcadores moleculares (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Estas e outras características fazem com que estes marcadores sejam ideais para mapeamento genético, para a identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). A **Figura 3** ilustra a base genética e a detecção de polimorfismo em marcadores microssatélites.



**Figura 3.** Base genética e detecção de polimorfismos de microssatélite. Painéis A e B ilustram os genótipos homocigoto e heterocigoto para uma região genômica que compreende um microssatélite de elementos (CA)/(GT). Painel C ilustra um gel de eletroforese com diferentes genótipos homocigotos (banda única) e heterocigotos (duas bandas) em indivíduos diplóides (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Acredita-se que o principal mecanismo por trás do surgimento e amplificação destas sequências nos genomas seja o deslizamento (*slippage*) ou o mau pareamento da enzima DNA polimerase durante a etapa de replicação do DNA. Durante a replicação de uma região repetitiva, as fitas de DNA separam-se e se reassociam de forma incorreta, o que geraria cópias de trechos de DNA (alelos) com diferentes tamanhos ou números de repetições de um determinado motivo no próximo ciclo de replicação, por meio da inserção ou deleção de uma unidade de repetição (**Figura 4**) (SCHLOTTERER & TAUTZ, 1992; citado por LOURENÇO, 2004).



**Figura 4.** Mecanismo de *slippage*. (adaptado de <http://www.virtuallaboratory.net/Biofundamentals/lectureNotes/AllGraphics/slippage.jpg>).

Existem vários protocolos disponíveis para a obtenção de marcadores SSR. RAFALSKI et al., 1996 (citado por BRONDANI et al., 1998), descreveram a

obtenção de microssatélites a partir de bibliotecas genômicas enriquecidas. FALCÃO et al. (2004) obtiveram microssatélites derivados de EST (*Expressed Sequence Tag*), ou seja, etiquetas de sequências expressas. Esses marcadores também podem ser obtidos por transferibilidade (ZUCCHI et al., 2002). ZANE et al. (2002) apresentam alguns métodos de isolamento de SSR disponíveis com a descrição de seus respectivos protocolos.

Uma vez obtidos os microssatélites, esses fragmentos são amplificados via PCR com iniciadores (*primers*) específicos de 20 a 30 bases, complementares às sequências que flanqueiam os microssatélites em questão (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). A produção de *primers* específicos para a amplificação de microssatélites é uma etapa bastante trabalhosa e onerosa. Considerando que não existem *primers* desenhados comercialmente disponíveis para todas as espécies vegetais, existe a possibilidade de se usar *primers* desenhados para plantas de táxons relacionados, tornando a análise de microssatélites de uma nova espécie mais rápida e menos onerosa. Trabalhos realizados por ZUCCHI et al. (2002) e VARSHNEY et al. (2005) revelaram a capacidade de transferibilidade desses *primers*. Essa ferramenta é conhecida por transferibilidade, que é a capacidade que os *primers* desenvolvidos para uma espécie têm em amplificar também fragmentos de DNA de outras espécies.

Desde o final da década de 80 até os dias atuais diversos trabalhos foram desenvolvidos através do uso de marcadores microssatélites. Dentre esses trabalhos desenvolvidos na Universidade Federal de Goiás (UFG) podem ser citados trabalhos realizados com microssatélites de baru (NASCIMENTO, 2006), de araticum (PEREIRA, 2007) e de mangaba (RODRIGUES, 2009). Além desses podem ser citados outros trabalhos desenvolvidos em outras instituições como o estudo realizado com microssatélites de soja (OKKAYA et al., 1992), de tomate (BREDEMEJER et al., 1998), de pequi (COLLEVATTI et al., 1999) e de cagaita (ZUCCHI et al., 2004).

## 3.2 PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE)

A quantidade de DNA de uma amostra pode ser aumentada por clonagem em células de bactéria, por exemplo, sendo que à medida que a bactéria se multiplica, o DNA alvo multiplica-se também. A quantidade de DNA de uma amostra também pode ser aumentada através de uma técnica conhecida como PCR ou Reação em Cadeia da Polimerase, que ocorre fora de um ser vivo. A amplificação de DNA *in vivo* já era uma prática conhecida através da clonagem de DNA em células quando a PCR foi inventada (GRUNSTEIN & HOGNESS, 1975).

Assim, a PCR é uma técnica usada na biologia molecular para aumentar pequenas quantidades de DNA (gene, parte de um gene, *Junk* DNA, regiões supervariáveis, etc.) ou cDNA *in vitro* através de amplificação exponencial empregando elementos do processo natural de replicação do DNA. Essa técnica é bem mais simples que a clonagem de DNA *in vivo* e solucionou um dos maiores problemas na análise de ácidos nucléicos, que é a sua baixa quantidade na maioria dos tecidos vivos. Além disso, essa técnica permitiu a detecção de uma nova classe de marcadores moleculares, entre os quais se encontram os marcadores microsatélites (LITT & LUTY, 1989).

### 3.2.1 A origem da PCR

A origem da PCR como é conhecida atualmente ocorreu na década de 80 por um grupo de pesquisadores. Kary Mullis teve a idéia original para a PCR em 1983 enquanto dirigia seu carro em uma rodovia que liga São Francisco a Mendocino nos Estados Unidos e desenvolveu a técnica quando ele trabalhava na *Cetus Corporation* (Emeryville, CA), juntamente com seu assistente Fred Faloona (BARTLETT & STIRLING, 2003).

O primeiro trabalho usando a PCR foi publicado na *Science* por SAIKI et al. (1985), incluindo Mullis e Faloona, os quais combinaram as técnicas de PCR (para amplificar o gene da  $\beta$ -globina humana) e digestão com enzima de restrição e, assim,

conseguiram detectar uma mutação responsável pela anemia falciforme. No entanto, os detalhes da técnica de PCR foram descritos mais detalhadamente nos dois anos seguintes por MULLIS et al. (1986) e MULLIS & FALOONA (1987). Ainda no ano de 1987 tal técnica foi patenteada por Mullis (MULLIS, 1987).

Nos primeiros trabalhos envolvendo PCR, a DNA polimerase usada era isolada da bactéria *Escherichia coli* e era necessária a adição de uma nova enzima a cada ciclo da PCR, pois a DNA polimerase de *E. coli*, que polimeriza a 37°C, se desnatura irreversivelmente em altas temperaturas. Em 1988, SAIKI et al. relataram o uso de uma DNA polimerase termoestável (Taq DNA polimerase), com temperatura ótima de 72°C e estável em temperaturas superiores a 94°C, na PCR. Essa DNA polimerase termoestável recebeu esse nome porque foi identificada pela primeira vez na bactéria termófila *Thermus aquaticus* (CHIEN et al., 1976). Desde então, as reações de PCR foram facilitadas pelo uso de enzimas DNA polimerase termoestáveis. Em 1989, a revista *Science* elegeu a PCR como "o maior desenvolvimento científico" e a Taq polimerase a molécula do ano. Em 1993, Kary Mullis foi agraciado com o prêmio Nobel de Química por essa descoberta que revolucionou a genética molecular.

### 3.2.2 Como ocorre uma PCR

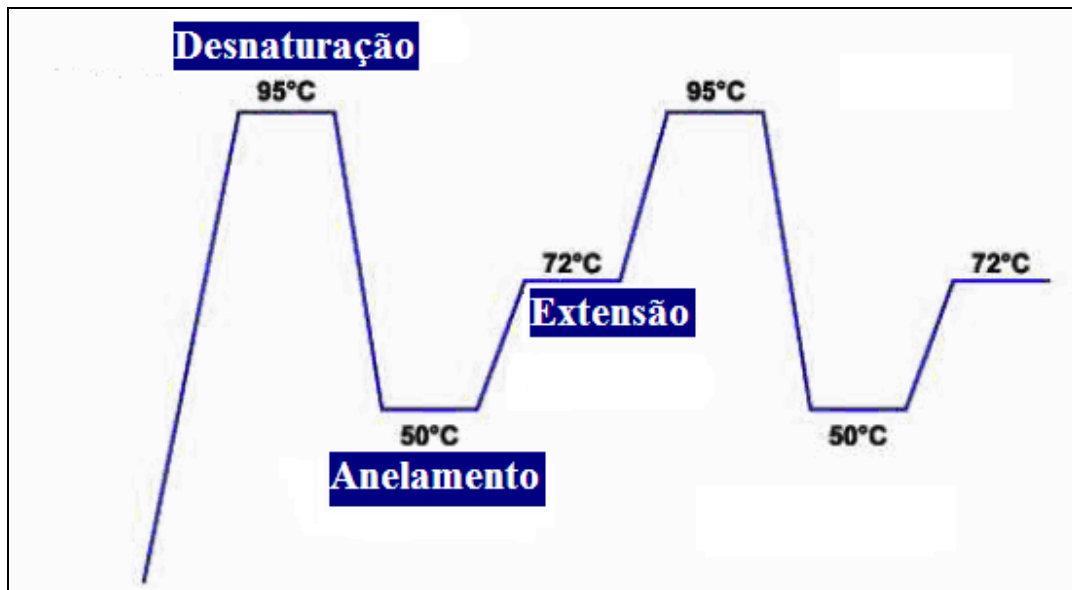
Para que uma reação de PCR ocorra são necessários reagentes semelhantes aos elementos usados no processo natural de replicação do DNA que ocorre dentro da célula. Assim, os reagentes típicos para uma reação de PCR são:

- DNA molde;
- *Primers*;
- DNA polimerase (geralmente a Taq DNA polimerase);
- MgCl<sub>2</sub>;
- Solução tampão;
- dNTPs.



O DNA molde, extraído anteriormente, pode ser DNA genômico ou cDNA (DNA complementar). O cDNA é uma sequência obtida a partir do mRNA via transcriptase reversa (O'CONNELL, 2002). Os *primers* são iniciadores que flanqueiam a região alvo que se deseja amplificar e são usados para delimitar tal região. Os *primers* possuem hidroxila livre (OH-) na extremidade 3', onde serão adicionados novos dNTPs pela enzima DNA polimerase. A DNA polimerase termoestável mais usada é a Taq DNA polimerase, mas existem outras como a enzima Tth, isolada da eubactéria termofílica *Thermus thermophilus* e geralmente usada na PCR via transcriptase reversa ou RT-PCR (PERALES et al., 2003). O reagente  $MgCl_2$  é doador de íons  $Mg^{2+}$ , que são cofatores indispensáveis para a atividade da Taq DNA polimerase. A solução tampão é usada para manter o pH e as condições iônicas ideais para a reação. É muito comum o uso de *kits* comerciais que incluem a solução-tampão (varia de acordo com o fabricante) juntamente com a DNA polimerase. Os dNTPs são desoxinucleosídeos trifosfatados referentes aos quatro tipos de desoxinucleosídeos trifosfatados do DNA, (2'-desoxiadenosina trifosfato: dATP, 2'-desoxicitidina 5'-trifosfato: dCTP, 2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato: dGTP e 2'-desoxitimidina 5'-trifosfato: dTTP), monômeros usados na síntese das fitas complementares às fitas-molde da molécula de DNA inicial.

A PCR ocorre num equipamento denominado termociclador, o qual permite ao usuário alterar alguns parâmetros, como o tempo e a temperatura de cada etapa. Envolve geralmente 30-40 ciclos constituídos de três etapas subsequentes cada, denominadas desnaturação, anelamento e extensão, respectivamente (**Figura 5**).

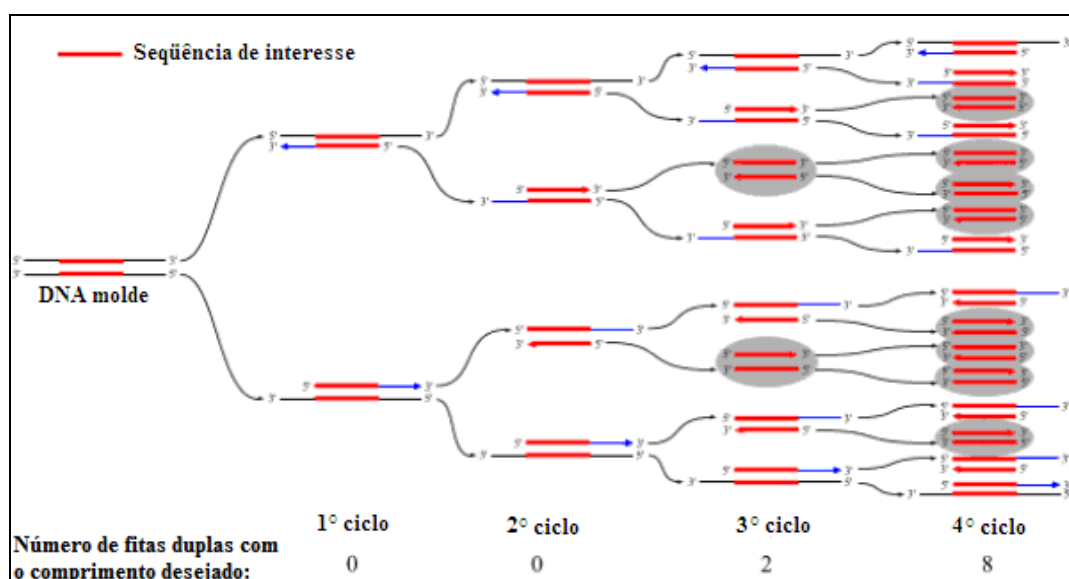


**Figura 5.** Esquema mostrando as diferenças de temperatura das três etapas subsequentes (desnaturação, anelamento e extensão) nos dois primeiros ciclos de uma reação de PCR.

Cada uma dessas três etapas ocorre basicamente da seguinte forma:

- **Desnaturação:** as fitas de DNA são separadas (ou seja, se desnaturam) através do aquecimento (aproximadamente 94°C). Na replicação dentro de uma célula a desnaturação das fitas de DNA é realizada por enzimas (não pelo aquecimento);
- **Anelamento:** a temperatura é diminuída até cerca de 50°C (dependendo da temperatura de anelamento dos *primers* envolvidos na reação) para que os *primers* se anelem ao DNA através da complementariedade de bases;
- **Extensão:** a temperatura é elevada novamente até a temperatura ótima específica da enzima DNA polimerase termoestável usada (72°C para a Taq polimerase), em presença de dNTPs e de outros fatores, para replicar a sequência alvo do DNA.

Assim, ao final de 35 ciclos, por exemplo, existirão bilhões de cópias da sequência de interesse do DNA usado como molde, o que possibilita a sua identificação. Ou seja, amplificou-se o material genético de interesse, o qual poderá ser utilizado para diversos propósitos. Portanto, pode-se dizer que o principal objetivo da PCR é amplificar regiões específicas de DNA (ou cDNA) (**Figura 6**) para que se tenha um grande número de cópias, pois apenas uma cópia de uma sequência não é suficiente para ser estudada.

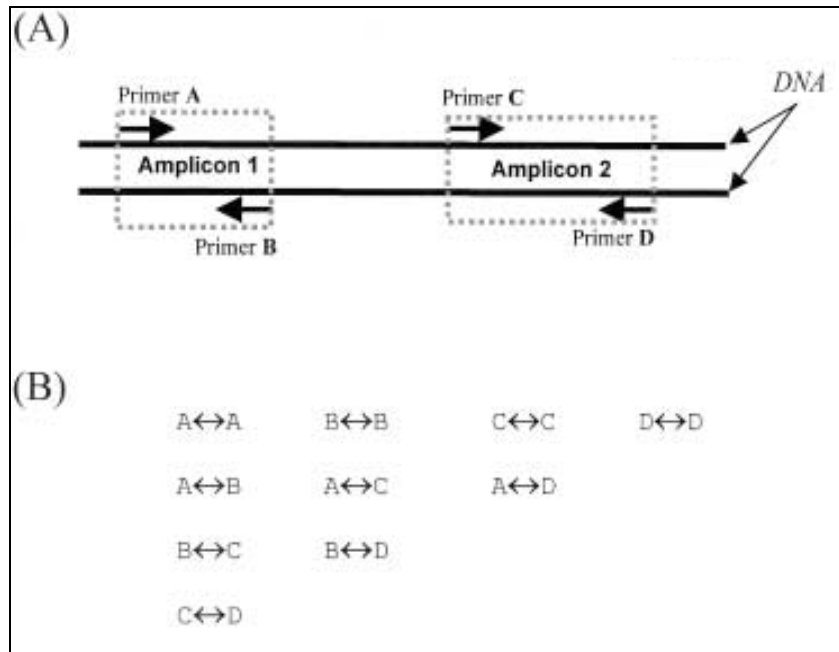


**Figura 6.** Esquema dos quatro primeiros ciclos de uma reação de PCR. (adaptado de [http://www.geocities.com/avinash\\_abhyankar/molecular/pcr\\_basics\\_files/image003.gif](http://www.geocities.com/avinash_abhyankar/molecular/pcr_basics_files/image003.gif)).

### 3.2.3 Desenvolvimento de sistemas *multiplex* de genotipagem

*Multiplex* PCR (m-PCR) é um tipo de PCR na qual dois ou mais locos são amplificados em uma mesma reação (HENEGARIU et al., 1997), sendo que para cada loco deve existir um par de *primers* específico (**Figura 7**). A *multiplex* PCR foi descrita pela primeira vez por CHAMBERLAIN et al. (1988) e permite a amplificação simultânea de locos diferentes em um mesmo organismo (GAUFRE et al., 2007) ou de determinados locos em diferentes organismos (LUO & MITCHELL, 2002). Essa técnica já foi usada com várias finalidades, como no diagnóstico de doença (CHAMBERLAIN et al., 1988), na genética forense (LINDQVIST et al.,

1996), no estudo de polimorfismo de marcadores microssatélites (GAUFRE et al., 2007).

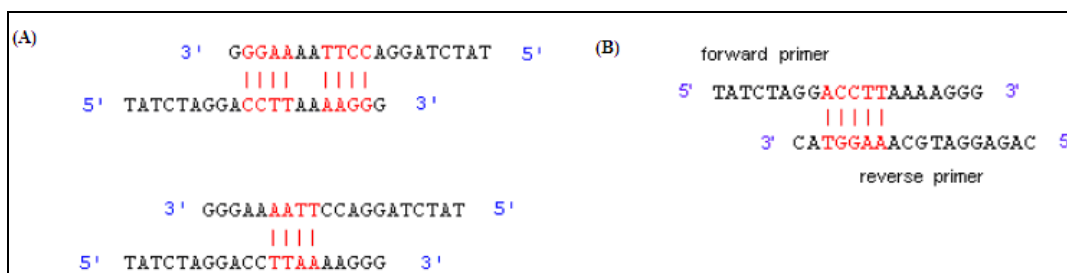


**Figura 7.** (A) Esquema de *multiplex* PCR mostrando dois pares de *primers* que amplificam simultaneamente duas regiões distintas do DNA molde. (B) Todos os *primers* envolvidos numa mesma reação de *multiplex* PCR devem ter suas sequências comparadas entre si para que não haja complementaridade significativa entre eles. No exemplo, foi requerido um total de 10 comparações (adaptado de BUTLER et al., 2001).

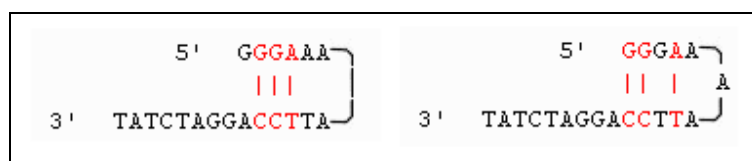
A *multiplex* PCR tem um grande impacto na economia dos reagentes usados nas reações e na identificação de seus produtos, do tempo empregado na realização das mesmas além de diminuir consideravelmente o trabalho envolvido em todas essas etapas (ELNIFRO et al., 2000). Além disso, a *multiplex* PCR possui outras vantagens como a redução de amostra de DNA requerida e o aumento de informação obtida por unidade de tempo.

Protocolos para *multiplex* PCR foram descritos por alguns pesquisadores, entre os quais HENEGARIU et al. (1997). No entanto, alguns critérios devem ser considerados nessa técnica devido ao fato de se usar mais de um par de *primers* na

mesma reação. Entre os fatores que podem influenciar os resultados de análises de *multiplexes* pode-se citar a concentração dos *primers* e o perfil dos ciclos da PCR (HENEGARIU et al., 1997). Esta técnica frequentemente requer otimização devido ao excesso de *primers* induzir a formação de dímeros (intra ou inter *primers*) (**Figura 8**), *hairpins* (grampos) (**Figura 9**) e o aparecimento de produtos inespecíficos, os quais interferem na amplificação dos produtos desejados. Assim, a etapa de desenho dos *primers* (*primer design*) é provavelmente a mais importante para um boa reação de PCR (BEASLEY et al., 1999 citado por BUTLER, 2001), principalmente se for considerada a *multiplex* PCR.



**Figura 8.** Exemplo de dímeros: intra *primers* (A) e inter *primers* (B) (adaptado de [http://dwb4.unl.edu/Chem/CHEM869N/CHEM869NLinks/bioweb.uwlax.edu/GenWeb/Molecular/Seq\\_Anal/Primer\\_Design/primer\\_design.htm](http://dwb4.unl.edu/Chem/CHEM869N/CHEM869NLinks/bioweb.uwlax.edu/GenWeb/Molecular/Seq_Anal/Primer_Design/primer_design.htm)).



**Figura 9.** Exemplo de um grampo (adaptado de [http://dwb4.unl.edu/Chem/CHEM869N/CHEM869NLinks/bioweb.uwlax.edu/GenWeb/Molecular/Seq\\_Anal/Primer\\_Design/primer\\_design.htm](http://dwb4.unl.edu/Chem/CHEM869N/CHEM869NLinks/bioweb.uwlax.edu/GenWeb/Molecular/Seq_Anal/Primer_Design/primer_design.htm)).

O uso de *primers* compatíveis é fundamental para o sucesso da técnica de *multiplex* PCR, e para que a reação ocorra da forma desejada não pode ocorrer anelamento entre os *primers*. Para selecionar pares de *primers* para serem usados na

mesma reação, os mesmos não devem possuir complementariedade entre suas bases, devem possuir temperatura de anelamento ( $T_a$ ) iguais ou próximas e, quando usados com fluorescência, devem possuir cores diferentes ou ainda, se forem da mesma cor, devem amplificar em *ranges* (faixa na qual os alelos segregam) diferentes para que não haja sobreposição dos locos. Além disso, a formação desses dímeros pode ser evitada através do uso de *kits* comerciais que possuem a HotStarTaq DNA polimerase, uma forma modificada da DNA polimerase recombinante, originalmente isolada de *Thermus aquaticus* e clonada em *Escherichia coli* (QIAGEN, 1999; 2008b).

Os primeiros sistemas *multiplex* de genotipagem foram realizados com o auxílio da eletroforese em gel, onde mais de um loco pode ser analisado simultaneamente quando os alelos de cada loco têm tamanhos suficientemente diferentes para migrarem em zonas separadas no gel (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Nesse contexto, dois tipos de abordagens de sistemas *multiplex* PCR foram desenvolvidos para aumentar o conteúdo de informações em cada ensaio de SSR. Um deles aborda a reação de amplificação de cada loco separadamente (reações de PCR individuais) para que sejam carregadas no mesmo gel. O outro tipo de abordagem refere-se àquele no qual mais de um loco é amplificado na mesma reação de PCR (*multiplex* PCR) e depois estes são carregados no mesmo gel (FERREIRA et al., 2006).

O uso do gel para genotipagem ainda é bastante frequente em diversos laboratórios devido a vários fatores, entre os quais estão o baixo custo e o domínio da técnica. O desenvolvimento de *multiplex* aumenta o conteúdo de informação por gel, diminuindo o tempo gasto com a manipulação de amostras, além de ter um grande potencial de redução de custos financeiros. Em estudos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), a genotipagem de 30 locos de SSR, usando somente cinco pistas de gel e 14 corridas de PCR, reduziu o custo da reação de PCR em mais de 50% e os custos do gel em aproximadamente 85%, comparados com os procedimentos de SSR convencionais (MASI et al., 2003). Em um outro estudo, também com feijão, a genotipagem de 87 locos de SSR usando apenas 43 géis reduziu os custos com géis

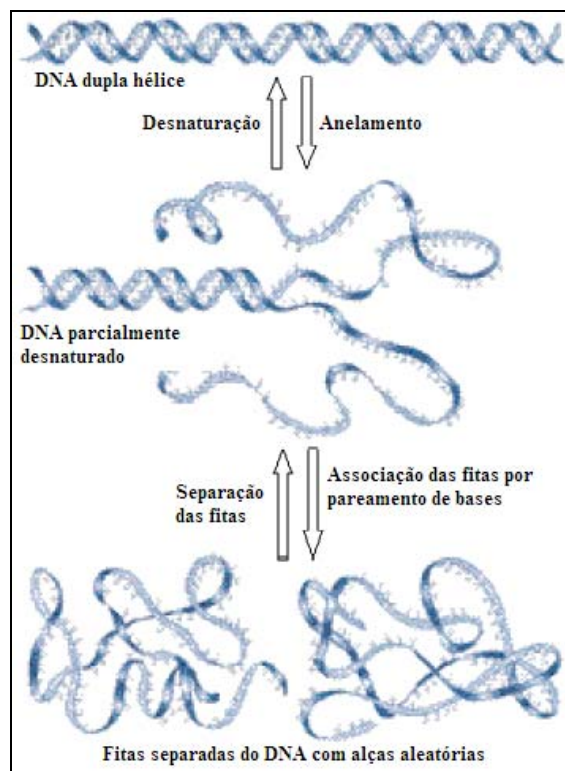
de poliacrilamida e coloração com nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) em aproximadamente 50% (FERREIRA et al., 2006).

O uso de análise semiautomatizada baseada em fluorescência de fragmentos de restrição foi primeiro relatado por CARRARO et al. (1989), citado por COBURN (2002). Tal método foi então adaptado e aperfeiçoado para análise de microssatélites (EDWARDS et al., 1991) permitindo que o mesmo fosse difundido e usado em diversas áreas e espécies. O uso de *primers* marcados com fluorescência possibilitou o desenvolvimento de novos tipos de sistemas de genotipagem *multiplex*, como aqueles que usam um equipamento conhecido como analisador automático de fragmentos, através de eletroforese capilar. O uso da eletroforese capilar para a análise de produtos de PCR (*amplicons*) possui diversas vantagens se comparada às tradicionais técnicas de eletroforese em gel de agarose e poliacrilamida. Possui a habilidade de separar rapidamente produtos de amplificação de DNA de forma automática com resultados quantitativos, com alto grau de resolução, o que torna possível a separação de *amplicons* similares (BUTLER, 2001).

BRONDANI et al. (1998) fizeram uso de técnicas aliadas a sistemas *multiplex* em um estudo com *Eucalyptus grandis* e *E. urophila* para relatar o desenvolvimento, a caracterização genética e um mapa de ligação de locos microssatélites. Posteriormente, KIRST & GRATTAPAGLIA (1999) apresentaram na *Plant & Animal Genome VII Conference* uma palestra sobre o desenvolvimento de sistemas de genotipagem para espécies de *Eucalyptus* baseada em *multiplex* de SSR, os quais permitiriam a genotipagem em larga escala de populações naturais e melhoradas de *Eucalyptus* para discriminação de indivíduos em estudos de parentesco e proteção de clones. Já em 2005, OTTEWELL et al. relataram o desenvolvimento e caracterização de oito locos microssatélites com *E. leucoxylon* através de sistemas *multiplex*. Vários outros trabalhos foram desenvolvidos através de sistemas *multiplex* com diversas outras espécies como tomate (BREDEMEIJER et al., 1998), soja (NARVEL et al., 2000), mogno (LEMES et al., 2002), arroz (BLAIR et al., 2002; PESSOA-FILHO et al., 2007), canola (TOMMASINI et al., 2003) e feijão (FERREIRA et al., 2006).

### 3.2.4 Aspectos termodinâmicos da PCR

As fitas que compõem a dupla hélice do DNA podem ser separadas em condições de aquecimento ou pH extremos. Este processo é conhecido na literatura como desnaturação ou fusão e é um processo reversível, sendo o processo inverso o anelamento das fitas do DNA. A desnaturação do DNA envolve a quebra das ligações de hidrogênio entre as bases pareadas e a quebra das interações hidrofóbicas entre bases empilhadas, sendo que nenhuma ligação covalente no DNA é quebrada. Assim, a dupla hélice do DNA se desenrola e se separa parcialmente ou completamente formando duas fitas simples. Quando se diminui a temperatura ou o pH a valores semelhantes ao nível biológico ocorre a renaturação ou anelamento do DNA e as duas fitas se unem formando novamente a dupla hélice (**Figura 10**) (LEHNINGER et al., 2000).



**Figura 10.** Etapas na desnaturação reversível e no anelamento (renaturação) do DNA (adaptado de NELSON & COX, 2005).



A temperatura de *melting* ( $T_m$ ), também designada temperatura de fusão, é a temperatura na qual metade das fitas de DNA está na forma de fita simples e a outra metade está na forma de dupla hélice (AHSEN et al., 2001; SANTALUCIA, 1998). A  $T_m$  depende de alguns fatores entre os quais a composição nucleotídica do DNA, sendo maior à medida que aumenta a composição de bases nitrogenadas guanina (G) e citosina (C) devido ao maior número de ligações tipo hidrogênio. Isto ocorre porque os pares de bases GC, os quais possuem três ligações tipo hidrogênio, são mais estáveis e necessitam de mais energia calorífica para se separarem quando comparados aos pares de bases AT, os quais possuem apenas duas ligações tipo hidrogênio (LEHNINGER et al., 2000). Já a temperatura de anelamento ( $T_a$ ) é a temperatura na qual os *primers* se pareiam ao DNA molde e pode ser calculada a partir da  $T_m$ , sendo que a  $T_a$  de uma sequência é aproximadamente 5°C inferior à  $T_m$ .

Alguns modelos foram desenvolvidos para se estimar a  $T_m$ . O modelo *nearest-neighbor* (N-N) para ácidos nucléicos assume que a estabilidade de um par de base depende da identidade e orientação dos pares de bases vizinhos a este (SANTALUCIA, 1998). O efeito dessas bases vizinhas é matematicamente considerado através de cálculos que usam parâmetros termodinâmicos *nearest-neighbor* determinados experimentalmente (OWCZARZY et al., 2005). Este modelo produz a predição mais acurada de  $T_m$  e é usado para a seleção de *primers* de PCR (AHSEN et al., 2001). O modelo N-N assume também que a energia da sonda de hibridização pode ser calculada da entalpia ( $\Delta H$ ) e entropia ( $\Delta S$ ) de todos o pares N-N, incluindo uma contribuição para cada nucleotídeo terminal não pareado (*dangling end*). Considerando esse aspecto, serão definidas três quantidades termodinâmicas que descrevem as transformações de energia que ocorrem durante uma reação química.

A energia livre de Gibbs (G) representa a quantidade de energia capaz de realizar trabalho no decorrer de uma reação a temperatura e pressão constantes. Quando uma reação ocorre com liberação de energia livre a reação é dita exergônica e  $\Delta G$  (variação da energia livre) tem valor negativo. Quando ocorre o contrário, a

reação é dita endergônica e  $\Delta G$  é positivo. As reações exergônicas ocorrem espontaneamente, enquanto que as endergônicas somente podem ocorrer quando há fornecimento de energia. A entalpia (H) representa o conteúdo em calor do sistema reagente. Quando uma reação libera calor ela é chamada exotérmica e  $\Delta H$  (variação da entalpia) tem valor negativo, mas se uma reação absorve calor ela é dita endotérmica e  $\Delta H$  tem valor positivo. Já a entropia (S) representa a casualidade (desordem) em um sistema. A força que impulsiona uma reação é  $\Delta G$ , a qual expressa o efeito resultante da entalpia e entropia, podendo ser calculada através da seguinte equação (LEHNINGER et al., 2000; SANTALUCIA, 1998):

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S,$$

onde  $\Delta G$  é a variação da energia livre de Gibbs do sistema reagente,  $\Delta H$  é a variação da entalpia, T é a temperatura absoluta e  $\Delta S$  é a variação da entropia.

A aplicação do modelo N-N para ácidos nucleicos foi primeiramente apresentada por Zimm (CROTHERS & ZIMM, 1964; citado por SANTALUCIA, 1998), Tinoco e coautores (DEVOE & TINOCO, 1962; GRAY & TINOCO, 1970; TINOCO et al., 1973; todos citado por SANTALUCIA, 1998). SantaLucia (1998) mostrou que existe diferença nos parâmetros termodinâmicos de oligonucleotídeos e de polímeros, ou seja, o comprimento do DNA interfere na sua termodinâmica. Há uma dependência do comprimento para o efeito do sal, mas não para a propagação de energia. Ahsen et al. (2001) mostraram o efeito de  $Mg^{2+}$ , DMSO e dNTPs na  $T_m$  de oligonucleotídeos em reações de PCR usando o modelo *nearest-neighbor*. Os íons  $Mg^{2+}$  são cofatores importantes para a atividade da Taq DNA polimerase e influencia fortemente a entropia ( $\Delta S$ ). O DMSO, dimetil sulfóxido, é comumente usado como co-solvente para facilitar a amplificação de alguns moldes. O DMSO diminui a  $T_m$  (cada porcentagem de DMSO diminui a  $T_m$  em  $0,75^\circ C$ ), o que deve ser considerado quando a  $T_m$  de um *primer* é calculada.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal usado neste trabalho foi cedido por Luciano Medina Macedo (MACEDO, 2009). Foram extraídos o DNA genômico dos parentais (DG e GL2) e de 203 indivíduos F1 de espécies de *Eucalyptus*, sendo 154 amostras provenientes de uma população de clones no Rio Grande do Sul e 49 amostras de uma população de clones em Minas Gerais, ambas de empresas integrantes do Projeto *Genolyptus*.

O DNA genômico dos parentais (DG e GL2) foi extraído do tecido foliar utilizando o protocolo descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998). O DNA das progênies foi extraído do tecido do câmbio vascular seguindo um protocolo otimizado desenvolvido no Laboratório de Genética e Genômica de Plantas da UFG.

### 4.2 SCREENING DOS PRIMERS

Inicialmente, 292 pares de *primers* (*forward* e *reverse*) específicos, marcados com fluorescência, que flanqueiam locos SSR de espécies de *Eucalyptus*, já disponibilizados pela Rede *Genolyptus*, foram submetidos à PCR, isoladamente, para fins de *screening*.

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (*Applied Biosystems*) (**Figura 11**) e utilizou-se kit comercial de PCR em *Multiplex* da Qiagen (*QIAGEN Multiplex PCR Kit*), o qual contém a HotStarTaq DNA Polimerase (QIAGEN, 2008b). As condições de reação da PCR foram, para cada reação, num volume final de 5  $\mu$ L: 1,0 ng de DNA genômico, 2,5  $\mu$ L de 1x *Master Mix* (*QIAGEN Multiplex PCR Kit*), 0,5  $\mu$ L de *Q-solution* (adquirido juntamente com o *QIAGEN Multiplex PCR Kit*), 0,1  $\mu$ L de cada par de *primers* com concentração de 10  $\mu$ M ou 1,0  $\mu$ L de cada par de *primers* com concentração de 1  $\mu$ M e o volume final foi completado com água ultra pura.



**Figura 11.** Termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). (adaptado de <http://www.geocities.com/rhuanito/imagens/lab23.JPG>).

As condições de amplificação foram as seguintes: uma etapa inicial de desnaturação a 95°C durante 15 minutos para activação da Hot Star Taq polimerase (QIAGEN, 2008a) seguida de 35 ciclos compostos por um passo de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, um passo de anelamento a 57°C durante 90 segundos e um passo de extensão a 72°C durante 90 segundos. O passo de extensão final foi efetuado a 72°C durante 30 minutos.

Posteriormente, cada reação foi diluída através da adição de 5  $\mu\text{L}$  de água ultra pura e então 1  $\mu\text{L}$  dessa reação era acrescido de 0,5  $\mu\text{L}$  de marcador molecular padrão, desenvolvidos segundo BRONDANI & GRATTAPAGLIA (2001), e 8,5  $\mu\text{L}$  de formamida, obtendo-se uma solução com volume final de 10  $\mu\text{L}$ . Essa solução foi então desnaturada no termociclador por cinco minutos em uma temperatura de 95°C e posteriormente imersa em gelo durante um período de dois minutos. Finalmente, as amostras foram injetadas em um analisador automático de fragmentos modelo ABI-

3100 (*Applied Biosystems*) (**Figura 12**) para a análise dos fragmentos amplificados produzidos pelas reações de PCR (*amplicons*).

A identificação dos fragmentos produzidos pelas reações de PCR no analisador automático de fragmentos foi realizada via eletroforese capilar, seguida pela detecção de sinal fluorescente, uma vez que os *primers* usados possuíam uma de suas extremidades 5' marcada com os fluorocromos *HEX* (verde), *NED* (amarelo) ou *6-FAM* (azul). O tamanho dos fragmentos da amostra foi determinado usando marcadores internos de tamanho padrão (*size standard*) marcados com fluorescência vermelha (*ROX*), através da eletroforese conjunta do marcador de massa molecular (*ladder*) com cada amostra genotipada. Esses fragmentos foram identificados por intermédio de um *laser*. Os dados foram coletados automaticamente no programa *Data Collection* (*Applied Biosystems*) e analisados manualmente com o auxílio do programa *GeneMapper 3.5* (*Applied Biosystems*).

Além disso, foram determinados os *ranges* (faixa na qual os alelos segregaram, dada em pares de base – pb) de cada um desses *primers* manualmente, através de uma análise visual no programa *GeneMapper*.



**Figura 12.** Foto de um analisador automático de fragmentos modelo ABI-3100 (*Applied Biosystems*) acoplado a um computador. (<http://www.ntuh.gov.tw/en/LARD/lardpic/corelab/ABI3100%E5%9C%96%E7%89%871.jpg>).

### 4.3 TESTE DOS PARES DE *PRIMERS*

Usando os locos microssatélites que segregaram adequadamente com bom padrão de amplificação foram montados sistemas *multiplex* arbitrários (*duplex*: 2 locos, *triplex*: 3 locos e *tetraplex*: 4 locos). Alguns critérios foram usados para a montagem dos *multiplex*: foram unidos num mesmo *multiplex primers* com temperatura de anelamento ( $T_a$ ) iguais ou próximas e, quanto à fluorescência, foram agrupados *primers* com cores diferentes ou ainda, *primers* da mesma cor, com *ranges* (faixa na qual os alelos segregam) diferentes para que não houvesse sobreposição dos locos.

Posteriormente, os *multiplex* foram submetidos à PCR, para fins de avaliação de compatibilidade. As reações de PCR foram realizadas em um termociclador *GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)* e utilizou-se kit de PCR em *Multiplex* da Qiagen (*QIAGEN Multiplex PCR Kit*), o qual contém a HotStarTaq DNA Polimerase. As reações foram preparadas com volume total de 5  $\mu$ L cada com a seguinte composição: 1,0 ng de DNA genômico, 2,5  $\mu$ L de 1x *Master Mix*, 0,5  $\mu$ L de solução-Q, 0,1  $\mu$ L de cada par (*forward* e *reverse*) de *primers* com concentração de 10  $\mu$ M (1,0  $\mu$ L de cada par de *primers* com concentração de 1  $\mu$ M) e o volume final foi completado com água ultra pura.

Os ciclos de PCR foram realizados com uma etapa inicial de desnaturação a 95°C durante 15 minutos (para activação da Hot Star Taq polimerase) seguida de 35 ciclos compostos por um passo de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, um passo de anelamento a 57°C durante 90 segundos e um passo de extensão a 72°C durante 90 segundos. Posteriormente, foi realizado um passo de extensão final a 72°C durante 30 minutos.

Os fragmentos amplificados foram separados via eletroforese capilar fluorescente automatizada utilizando um analisador automático de fragmentos modelo ABI-3100 (*Applied Biosystems*). O tamanho dos fragmentos da amostra foi determinado usando um marcador interno de tamanho padrão (*size standard*) desenvolvido segundo BRONDANI & GRATTAPAGLIA (2001), através da

eletroforese conjunta do marcador de massa molecular com cada amostra genotipada. Os dados foram coletados automaticamente no programa *Data Collection* (*Applied Biosystems*) pela detecção de fluorescências diferentes e analisados manualmente com o auxílio do programa *GeneMapper*.

Ao final desta etapa foram obtidos dois conjuntos de combinações entre pares de *primers* formados pelos *multiplex*, *duplex* compatíveis e *duplex* incompatíveis, os quais serviram de controle e permitiram a avaliação das estratégias de análise baseadas nas ferramentas de Bioinformática. Cada *triplex* formou três novos *duplex* e cada *tetraplex* formou quatro novos *duplex*. Foram considerados compatíveis conjuntos *duplex* que permitiram a adequada amplificação e avaliação de cada um dos locos envolvidos. Por outro lado, foram considerados incompatíveis pares de *primers* que, quando colocados juntos em uma única reação de PCR, não produziram os fragmentos de interesse.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DE CRITÉRIOS DE COMPATIBILIDADE ENTRE PARES DE *PRIMERS*

##### 4.4.1 Análise com o *software Multiplexer*

Todas as combinações testadas em laboratório foram avaliadas pelo *software Multiplexer*, que foi desenvolvido utilizando linguagem *Delphi/Kylix*, o que permite a sua execução tanto em sistemas operacionais *Windows* quanto *Linux*. Foram desenvolvidos módulos de análise para a obtenção de *multiplexes* buscando-se identificar aqueles pares compatíveis/incompatíveis com base nos critérios definidos a seguir:

- I. Temperatura de anelamento dos *primers*: foram considerados compatíveis *primers* com diferença em suas temperaturas de anelamento inferior a 10°C;

II. Possibilidade de anelamento entre *primers* de locos diferentes: *primers* com seqüências de três nucleotídeos complementares foram considerados incompatíveis.

As temperaturas de *melting* ( $T_m$ ) dos 94 locos selecionados na etapa de *screening* foram reestimadas para as seqüências *forward* e *reverse* de cada *primer* através do programa Primer3Plus (UNTERGASSER et al., 2007) disponível online (**Figura 13**), devido a falta de informação da temperatura de alguns locos. Estas temperaturas foram utilizadas para o cálculo das temperaturas de anelamento ( $T_a$ ) usadas para avaliação de compatibilidade entre pares de *primers* no *software* Multiplexer ( $T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$ ).

The screenshot shows the Primer3Manager web interface. At the top, there is a navigation bar with links for 'Primer3Plus', 'Help', 'About', and 'Source Code'. Below this, there are several buttons: 'Order selected Primers', 'Refresh', 'Reset Form', and 'Delete selected Primers'. A section for file upload contains a text input field, a 'Browse...' button, and 'Upload File' and 'Save File' buttons. The main part of the interface is a table with the following columns: 'Select', 'Name', 'Sequence', 'Designed on', and 'Check! BLAST!'. The table contains four rows of primer data.

Select	Name	Sequence	Designed on	Check! BLAST!
<input type="checkbox"/>	EMBRA081_F	CATGAGTTACTGCAAGAAAAG	26.06.2009	<a href="#">Check!</a> <a href="#">BLAST!</a>
<input type="checkbox"/>	EMBRA081_R	ACAGCCAAAACCAAATC	26.06.2009	<a href="#">Check!</a> <a href="#">BLAST!</a>
<input type="checkbox"/>	EMBRA140_F	GGTTTGATAGGTGGATTGGG	26.06.2009	<a href="#">Check!</a> <a href="#">BLAST!</a>
<input type="checkbox"/>	EMBRA140_R	GGTTGATGACTGAGAGATGAAGG	26.06.2009	<a href="#">Check!</a> <a href="#">BLAST!</a>

At the bottom of the table, there are again buttons for 'Order selected Primers', 'Refresh', 'Reset Form', and 'Delete selected Primers'.

**Figura 13.** Tela do programa Primer3Plus para estimar temperatura de *melting* ( $T_m$ ).

Baseado nos dois critérios citados anteriormente, temperatura de anelamento dos *primers* ( $T_a$ ) e possibilidade de anelamento entre *primers* de locos diferentes, foram feitas algumas análises cujos resultados foram usados como referência para o ajuste dos parâmetros do *software* Multiplexer.



Foram feitas algumas alterações no *software* Multiplexer. Nesta etapa também foram considerados os dois critérios em questão para declarar a compatibilidade entre os pares de *primers*. No entanto, foi possível alterar o tamanho da janela, que define o número mínimo considerado de complementaridade entre as sequências dos *primers* envolvidos na reação de PCR, e a diferença de temperatura entre as sequências.

Então, foi montada uma tabela semelhante à **Tabela 1** relacionando os resultados obtidos pelo *software* Multiplexer (predição da compatibilidade entre os pares de *primers*), antes da etapa do ajuste dos parâmetros, e os resultados obtidos na bancada (laboratório). Após a etapa do ajuste dos parâmetros, o *software* Multiplexer foi reavaliado através do mesmo procedimento.

**Tabela 1.** Tabela de contingência geral comparativa dos resultados preditos pelo *software* Multiplexer em relação àqueles obtidos pela análise de laboratório dos pares de *primers* em genótipos de *Eucalyptus*.

		Laboratório		
		Compatível (C)	Incompatível (I)	
<i>Software</i> Multiplexer	Compatível (+)	a	b	a + b
	Incompatível (-)	c	d	c + d
		a + c	b + d	n

Os resultados obtidos *in silico* foram comparados com aqueles obtidos no laboratório (bancada) através do Teste Exato de Fisher, utilizando o programa estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008), no sentido de se verificar o nível de significância da associação entre os resultados preditos pelo *software* Multiplexer e aqueles obtidos na análise de laboratório.

Além do Teste Exato de Fisher, foram obtidas ainda estimativas para os parâmetros a seguir:

- Probabilidade de ser compatível no *software*:

$$P(+)=\frac{a+b}{n}$$

- Probabilidade de ser incompatível no *software*:

$$P(-)=\frac{c+d}{n}$$

- Probabilidade de ser compatível no laboratório:

$$P(C)=\frac{a+c}{n}$$

- Probabilidade de ser incompatível no laboratório:

$$P(I)=\frac{b+d}{n}$$

- Valor Preditivo Positivo:

$$P(C/+)=\frac{a}{a+b}$$

- Valor Preditivo Negativo:

$$P(I/-)=\frac{d}{c+d}$$

- Sensibilidade:

$$P(+/C) = \frac{a}{a+c}$$

- Falso Positivo:

$$P(+/I) = \frac{b}{b+d}$$

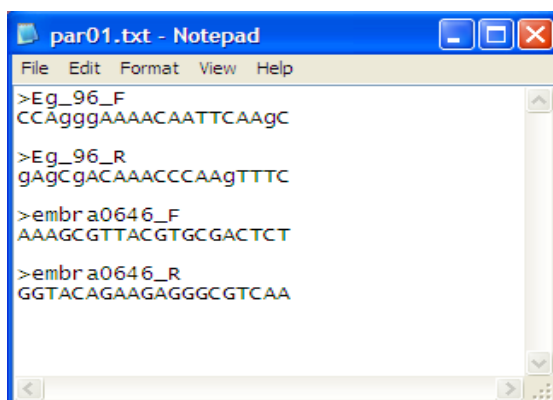
- Falso Negativo:

$$P(-/C) = \frac{c}{a+c}$$

Com base nestes resultados foram otimizados os parâmetros utilizados pelo *software* Multiplexer, para fins de maximização da eficiência em termos de predição de combinações compatíveis de pares de *primers*.

#### 4.4.2 Análise com o *software* AutoDimer

Foram montados 74 arquivos de entrada, correspondentes às 74 combinações de pares de *primers* analisados, os quais foram usados para análise no AutoDimer (VALLONE & BUTLER, 2004). O formato desses arquivos pode ser visualizado na **Figura 14** e para mais detalhes pode-se consultar a referência.



```
par01.txt - Notepad
File Edit Format View Help
>Eg_96_F
CCAgggAAAACAATTCAAgC
>Eg_96_R
gAgCgACAAACCCAAGTTTC
>embr a0646_F
AAAGCGTTACGTGCGACTCT
>embr a0646_R
GGTACAGAAGAGGGCGTCAA
```

**Figura 14.** Exemplo de formato do arquivo de entrada (*input*) do *software* AutoDimer.

Os valores dos parâmetros usados pelo *software* (parâmetros termodinâmicos *nearest-neighbor* ou N-N), os quais podem ser definidos e alterados pelo usuário, foram os valores padrões sugeridos pelo *software* (valores *default*). Estes valores foram:  $[Na^+]$  de 0,085 mol/L, concentração total de *primer* de 1,0  $\mu M$  e  $\Delta G$  de 37°C. O valor *score* é determinado pela combinação do número de pares de base Watson-Crick (+1) com *mismatches* (-1), sendo que *gaps* e nucleotídeos indefinidos (“N”) não são incluídos no cálculo do *score*. Foi usado um *score* de -100 para que todos os resultados possíveis fossem descritos nos arquivos de saída (*output*) (**Figura 15**), os quais foram gerados pelo *software* em um arquivo texto e salvos para avaliações futuras.

O *software* AutoDimer compara sequências de oligonucleotídeos e relata o potencial de reatividade entre essas sequências. Ele foi usado com a finalidade de se avaliar critérios de compatibilidade entre pares de *primers* e também de se observar a eficiência do mesmo em comparação ao *software* Multiplexer.

```

par01_out.txt - Notepad
File Edit Format View Help
Number of Hits = 400
Number of Sequences = 4
Na+ = 0.085 Ct = 1.0
Threshold Score = -100

Eg_96_F CCAGGGAAAACAATTCAAGC versus Eg_96_F CCAGGGAAAACAATTCAAGC
Matches = 0
Score = -1
N
est. tm = less than 0 oc
DeltaG 37 degrees = > 0 kcal/mole
          5'-CCAGGGAAAACAATTCAAGC-3'
              X
          3'-CGAACTTAACAAAAGGGACC-5'

Eg_96_F CCAGGGAAAACAATTCAAGC versus Eg_96_F CCAGGGAAAACAATTCAAGC
Matches = 0
Score = -1
N
est. tm = less than zero
DeltaG 37 degrees = greater than zero
          3'-CGAACTTAACAAAAGGGACC-5'
              X
          5'-CCAGGGAAAACAATTCAAGC-3'

Eg_96_F CCAGGGAAAACAATTCAAGC versus Eg_96_F CCAGGGAAAACAATTCAAGC
Matches = 0
Score = -2
NN
est. tm = less than 0 oc
DeltaG 37 degrees = > 0 kcal/mole
          5'-CCAGGGAAAACAATTCAAGC-3'
              XX
          3'-CGAACTTAACAAAAGGGACC-5'

Eg_96_F CCAGGGAAAACAATTCAAGC versus Eg_96_F CCAGGGAAAACAATTCAAGC
Matches = 2
Score = 2
GC
est. tm = less than zero
DeltaG 37 degrees = greater than zero
          3'-CGAACTTAACAAAAGGGACC-5'
              ||
          5'-CCAGGGAAAACAATTCAAGC-3'

Eg_96_F CCAGGGAAAACAATTCAAGC versus Eg_96_F CCAGGGAAAACAATTCAAGC
Matches = 0

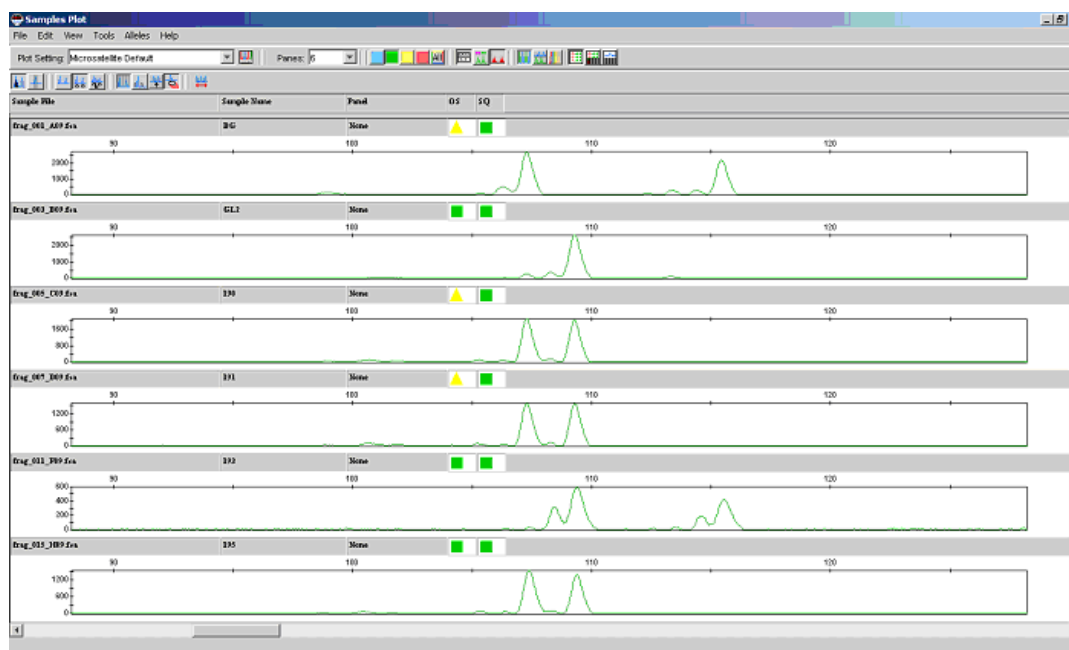
```

**Figura 15.** Exemplo de um arquivo de saída (*output*) do *software* AutoDimer.

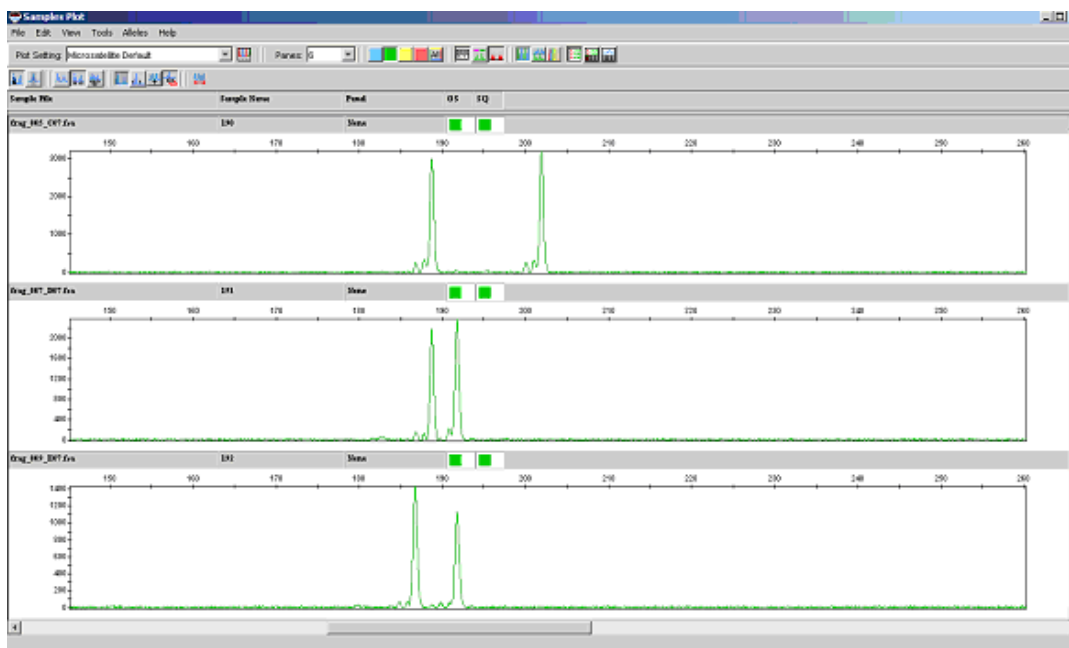
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 SCREENING DOS PRIMERS

Ao final da etapa de *screening* dos 292 pares de *primers* iniciais foram selecionados 94 locos, os quais correspondem a locos microssatélites que segregaram e tiveram um bom padrão de amplificação na PCR isolada (**Figura 16**). Além disso, foram determinados os *ranges* (amplitude na qual os alelos segregaram, dada em pares de base – pb) de cada um desses *primers* manualmente, através de uma análise visual no programa *GeneMapper* (**Figura 17**). Uma lista com os *primers* (locos) que foram selecionados na etapa de *screening* e seus respectivos *ranges* se encontra no **Anexo 1**.



**Figura 16.** EMBRA1770. Loco microssatélite que segregou e teve um bom padrão de amplificação na PCR isolada e, conseqüentemente, foi selecionado na etapa de *screening*.



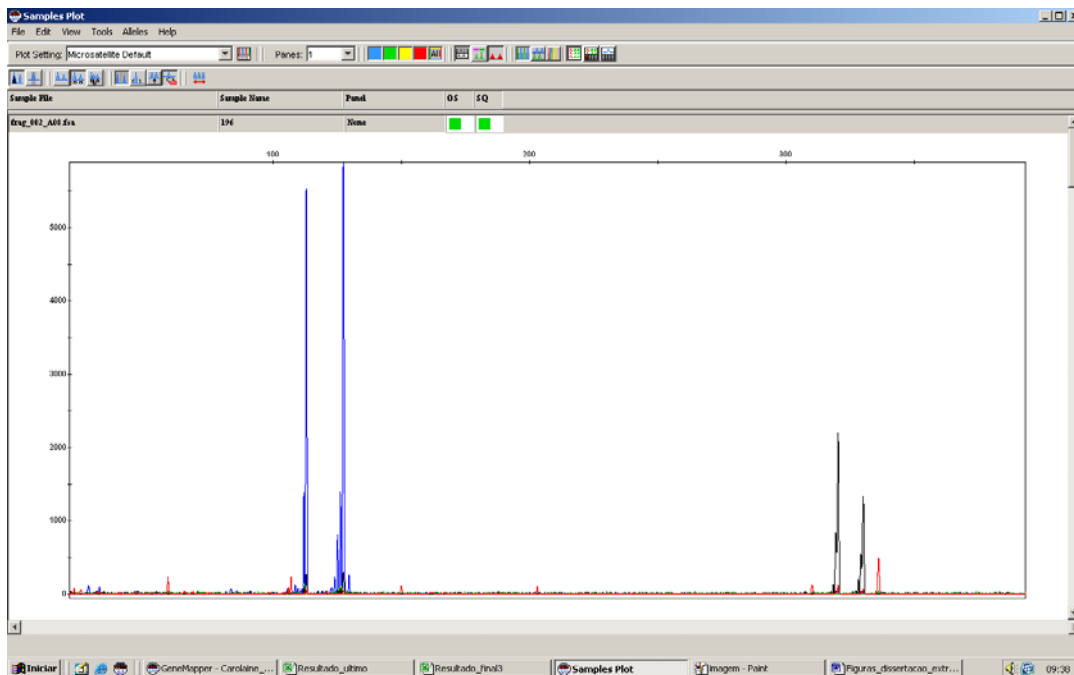
**Figura 17.** EMBRA1679. A determinação do *range* (amplitude na qual o alelo segregou, dada em pares de base – pb) desse loco, através de uma análise visual no programa GeneMapper, foi de 180-205 pb.

## 5.2 TESTE DOS PARES DE *PRIMERS*

Após a etapa de *screening* dos *primers*, foram obtidos 74 pares de *primers* formados por locos selecionados nessa etapa. O resultado do teste de compatibilidade entre os 74 pares de *primers* formados a partir de sistemas *multiplex* (*duplex*, *triplex* e *tetraplex*) (**Figuras 18, 19 e 20**), após serem estes submetidos a m-PCR e posteriormente terem seus *amplicons* separados via eletroforese capilar fluorescente automatizada utilizando um analisador automático de fragmentos, pode ser visualizado no **Anexo 2**.

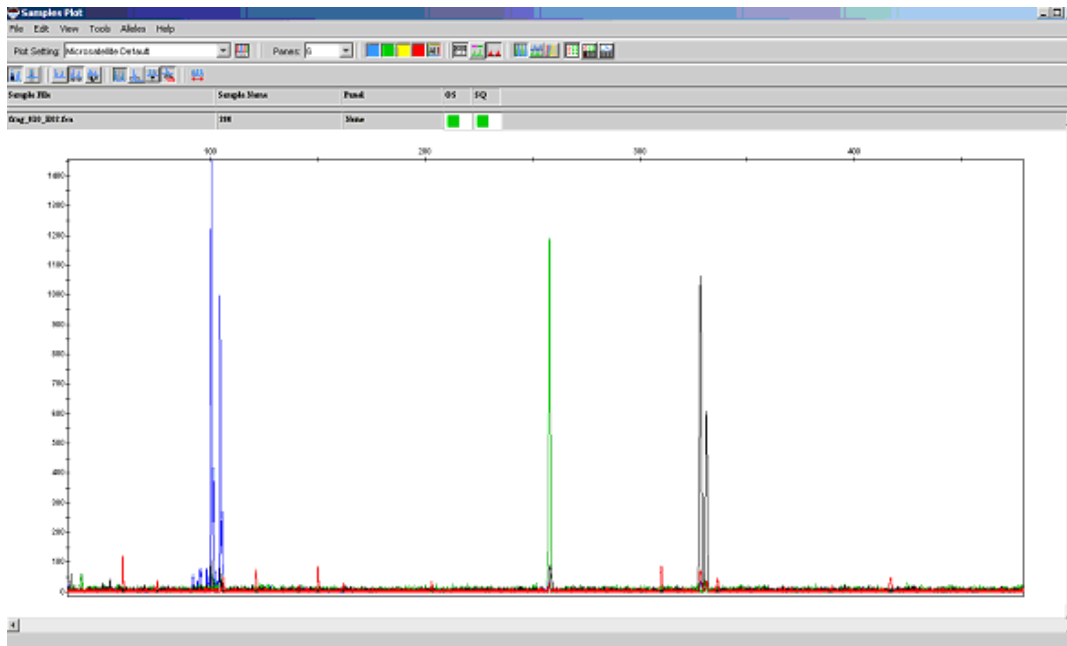
No **Anexo 2** pode-se observar uma lista com os 74 pares de *primers* e seus respectivos resultados na bancada. Este resultado foi obtido da seguinte forma: quando os dois locos microssatélites que constituem um *duplex* segregaram adequadamente, possibilitando a visualização da amplificação dos mesmos, este *duplex* foi considerado compatível (**Figura 21**); quando pelo menos um dos dois locos microssatélites que constituem um *duplex* não segregou, este *duplex* foi

considerado incompatível. Este resultado foi o controle usado para a análise com os *softwares* Multiplexer e AutoDimer, a qual permitiu a avaliação de critérios de compatibilidade entre pares de *primers*.

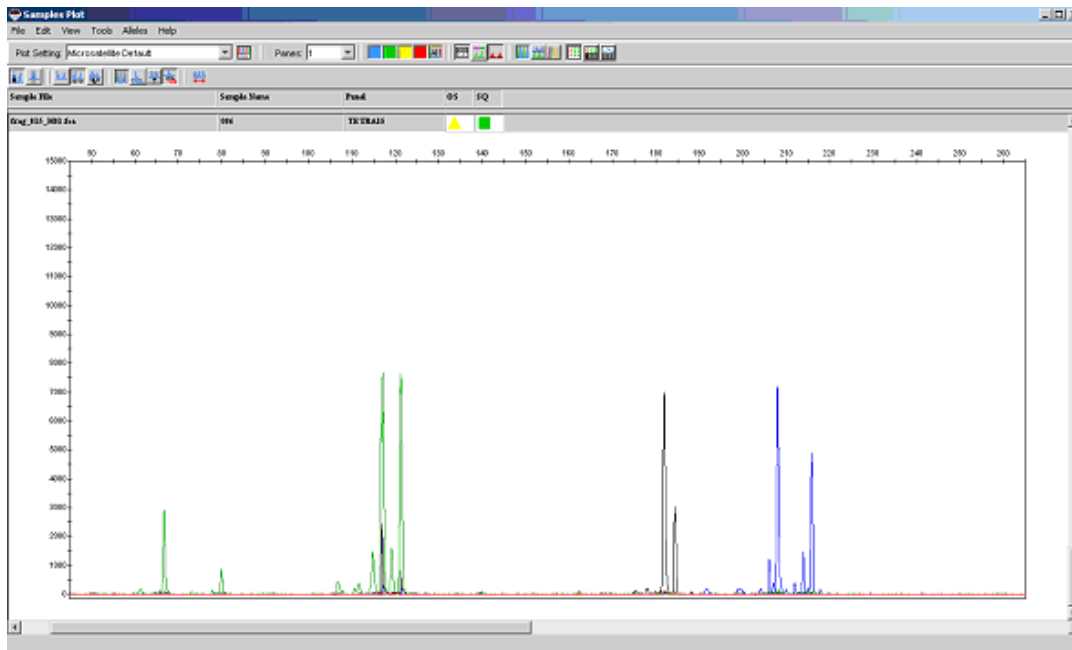


**Figura 18.** Duplex (*multiplex* PCR): EMBRA0655 (azul); EMBRA1924 (amarelo, que no *GeneMapper* aparece em preto); ROX, marcador padrão, em vermelho.





**Figura 19.** *Triplex (multiplex PCR):* EMBRA1656 (azul); EMBRA1456 (verde); EMBRA0971 (amarelo, que no *GeneMapper* aparece em preto); ROX, marcador padrão, em vermelho.



**Figura 20.** *Tetraplex* (multiplex PCR): EMBRA1920 (verde, range 60-90); EMBRA0214 (verde, range 105-150); EMBRA0950 (amarelo, que no *GeneMapper* aparece em preto); EMBRA1308 (azul).



**Figura 21.** EMBRA1008 (azul) e EMBRA0917 (fluorescência amarela, que no *GeneMapper* aparece em preto) visualizado no *GeneMapper*. Um par (*duplex*) compatível na bancada. Corresponde ao par 22 do **Anexo 2**.

### 5.3 AVALIAÇÃO DE CRITÉRIOS DE COMPATIBILIDADE ENTRE PARES DE *PRIMERS*

#### 5.3.1 Análise com o *software* Multiplexer

As temperaturas de *melting* dos 94 locos selecionados na etapa de *screening*, reestimadas para a sequência *forward* e *reverse* de cada *primer* correspondente através do programa Primer3Plus (UNTERGASSER et al., 2007), podem ser visualizadas no **Anexo 1**.

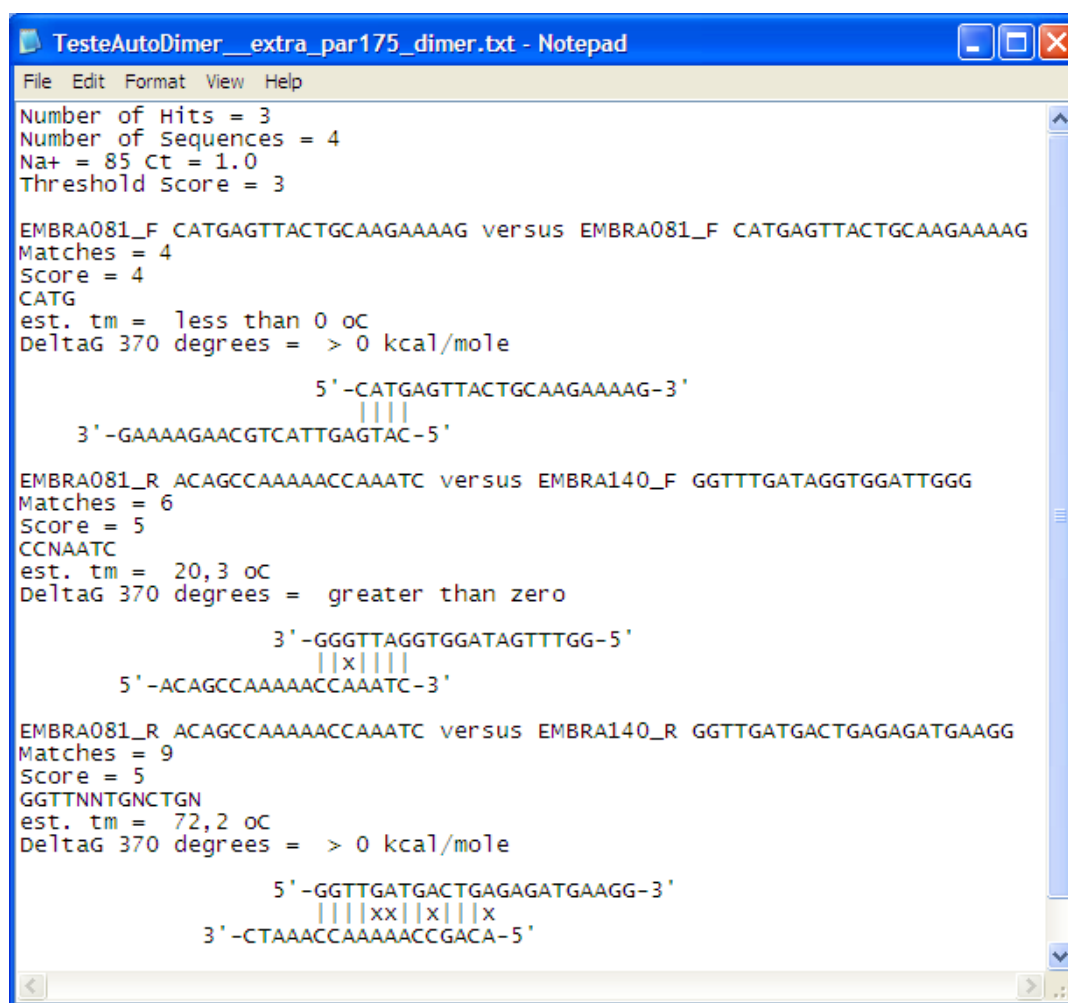
Essas temperaturas foram reestimadas para confirmação dos dados enviados pelo Cenargen. Os novos valores foram semelhantes, porém houve algumas diferenças. Baseando-se nos novos valores da  $T_m$ , houve apenas dois pares de *primers* com diferença de temperatura significativa, EMBRA0211/EMBRA1977 e EMBRA0140/EMBRA0081. O par EMBRA0211/EMBRA1977 possui uma diferença de  $T_m$  de aproximadamente 6°C e o par EMBRA0140/EMBRA0081 possui uma diferença de  $T_m$  de aproximadamente 8°C (veja **Anexo 1**). Este último par, segundo os dados do Cenargen, possui uma diferença de 12°C.

Estes pares foram usados para determinar uma diferença de temperatura ( $T_a$  ou  $T_m$ ) ideal sugerida a ser usada pelo *software*. Foi observado que, mesmo com essa diferença de temperatura, ambos foram compatíveis na bancada. O *software* Multiplexer os declarou como incompatíveis antes do ajuste dos parâmetros. Isso ocorreu porque os critérios internos do *software*, neste caso, eram:

- I. Diferença de temperatura de anelamento dos *primers* inferior a 10°C: compatíveis;
- II. *Primers* com sequências de três nucleotídeos complementares: incompatíveis.

O critério II permitiu que muitos pares fossem declarados como incompatíveis, devido o fato de ser bastante comum dois pares possuírem três nucleotídeos complementares (veja **Figura 22**). Foi confirmado que esse número de complementaridade não é suficiente para inviabilizar a produção dos *amplicons*. Essa

questão foi analisada mais profundamente através das modificações feitas no *software* Multiplexer, as quais permitiram a alteração do número mínimo de complementaridade considerado (tamanho da janela) e da diferença de temperatura entre as sequências, podendo-se testar a influência destes dois parâmetros na compatibilidade entre os pares de *primers* envolvidos em cada *multiplex* (Anexo 2).



```

TesteAutoDimer__extra_par175_dimer.txt - Notepad
File Edit Format View Help
Number of Hits = 3
Number of Sequences = 4
Na+ = 85 Ct = 1.0
Threshold Score = 3

EMBRA081_F CATGAGTTACTGCAAGAAAAG versus EMBRA081_F CATGAGTTACTGCAAGAAAAG
Matches = 4
Score = 4
CATG
est. tm = less than 0 oC
DeltaG 370 degrees = > 0 kcal/mole

          5'-CATGAGTTACTGCAAGAAAAG-3'
          ||||
3'-GAAAAGAACGTCATTGAGTAC-5'

EMBRA081_R ACAGCCAAAAACCAAATC versus EMBRA140_F GGGTTGATAGGTGGATTGGG
Matches = 6
Score = 5
CCNAATC
est. tm = 20,3 oC
DeltaG 370 degrees = greater than zero

          3'-GGGTTAGGTGGATAGTTTGG-5'
          ||x||||
5'-ACAGCCAAAAACCAAATC-3'

EMBRA081_R ACAGCCAAAAACCAAATC versus EMBRA140_R GGTTGATGACTGAGAGATGAAGG
Matches = 9
Score = 5
GGTTNNTGNCTGN
est. tm = 72,2 oC
DeltaG 370 degrees = > 0 kcal/mole

          5'-GGTTGATGACTGAGAGATGAAGG-3'
          ||||xx||x|||x
3'-CTAAACCAAAAACCGACA-5'

```

**Figura 22.** Teste de complementaridade entre as sequências de *primers* do par EMBRA0140/EMBRA0081 feita através do *software* AutoDimer (VALLONE & BUTLER, 2004). F designa sequência *forward* e R designa sequência *reverse*.

Foram obtidos vários resultados de compatibilidade para todas as combinações possíveis de pares compostas pelos 94 locos selecionados no *screening* através do Multiplexer. Para que o parâmetro tamanho da janela fosse testado, fixou-se um valor para o parâmetro diferença de temperatura em 10°C. Através dos resultados obtidos observou-se que o número ideal de complementaridade entre as sequências dos *primers* envolvidos na reação de PCR foi cinco bases subsequentes. Quando esse valor foi diminuído o *software* declarou muitos falsos negativos (probabilidade dos pares de *primers* serem incompatíveis no *software* dado que foram compatíveis na bancada) e quando esse valor foi aumentado o número de falsos positivos (probabilidade dos pares de *primers* serem compatíveis no *software* dado que foram incompatíveis na bancada) aumentou.

As **Tabelas 2 e 3** mostram os resultados que servirão de apoio para a análise estatística dos dados comparativos do *software* Multiplexer e da bancada.

**Tabela 2.** Tabela de contingência comparativa dos resultados preditos pelo *software* Multiplexer em relação àqueles obtidos pela análise de laboratório dos pares de *primers* em genótipos de *Eucalyptus*.

		Laboratório		
		Compatível (C)	Incompatível (I)	
<i>Software</i> Multiplexer	Compatível (+)	a = 56	b = 10	a + b = 66
	Incompatível (-)	c = 5	d = 3	c + d = 8
		a + c = 61	b + d = 13	n = 74

**Tabela 3.** Tabela de contingência comparativa dos resultados preditos pelo *software* após ajuste dos parâmetros (Mult. 5/10)\* em relação àqueles obtidos pela análise de laboratório dos pares de *primers* em genótipos de *Eucalyptus*.

		Laboratório		
		Compatível (C)	Incompatível (I)	
<i>Software</i> Multiplexer	Compatível (+)	a = 56	b = 9	a + b = 65
	Incompatível (-)	c = 5	d = 4	c + d = 9
		a + c = 61	b + d = 13	n = 74

\*: Mult. 5/10 representa tamanho da janela 5 e diferença de temperatura 10°C.

O Teste Exato de Fisher foi usado para comparar os resultados obtidos *in silico* com aqueles obtidos no laboratório. A hipótese testada no teste é a de nulidade ou igualdade ( $H_0$ ) que, neste caso, afirma que os resultados obtidos *in silico* são independentes daqueles obtidos no laboratório, ou seja, não estão associados. A hipótese alternativa ( $H_1$ ), no caso de se rejeitar  $H_0$  afirma, por consequência, que os resultados obtidos *in silico* não são independentes daqueles obtidos no laboratório, ou seja, estão associados. Então, o parâmetro ( $\theta$ ) em questão representa a compatibilidade entre os resultados *in silico* e os resultados obtidos na bancada, sendo seu verdadeiro valor desconhecido, uma vez que foi analisada apenas uma amostra de locos de marcadores microssatélites da espécie *Eucalyptus* spp.

O teste com confiança de 95% ( $1-\alpha$ ) e nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ) obteve um p-valor de 0,1409 (**Figura 23**) para os resultados do *software* Multiplexer (**Tabela 2**). O p-valor representa uma medida de plausibilidade, sendo a probabilidade de, assumindo  $H_0$  verdadeira, os dados se ajustarem à  $H_0$ . Assim, comparando o p-valor de 14,09% com o nível de significância do teste  $\alpha = 5\%$  aceita-se então a hipótese de nulidade, pois não se tem evidências suficientes para rejeitá-la. Assim, pode-se dizer que os resultados obtidos *in silico* são independentes daqueles

obtidos no laboratório (bancada), ou seja, não estão associados. Este foi o resultado do teste obtido antes do ajuste dos parâmetros do *software* Multiplexer.



```

> contingencyTestData<-
+ matrix(c(56,5,10,3),
+ nr=2,
+ dimnames=list("Software"=c("+","-"),
+ "Bancada"=c("C","I")))
> contingencyTestData
      Bancada
Software C I
+ 56 10
- 5 3
> fisher.test(contingencyTestData)

      Fisher's Exact Test for Count Data

data:  contingencyTestData
p-value = 0.1409
alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1
95 percent confidence interval:
 0.4414248 20.3062053
sample estimates:
odds ratio
 3.288128
> |

```

**Figura 23.** Teste Exato de Fisher para o resultado do *software* Multiplexer, com p-valor destacado com uma elipse.

Posteriormente, quando foi usado o *software* Multiplexer com o parâmetro tamanho da janela igual a cinco e diferença de temperatura igual a 10°C (Multi. 5/10), observou-se uma alteração significativa no resultado do Teste Exato de Fisher (baseado na **Tabela 3**) em relação àqueles obtidos pela análise de laboratório. O teste com confiança de 95% ( $1-\alpha$ ) e nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ), obteve um p-valor de 0,0451 (**Figura 24**), o qual permitiu a validação do *software*. Neste caso, comparando-se o p-valor de 4,51% com o nível de significância do teste  $\alpha = 5\%$ , rejeita-se a hipótese de nulidade. Assim, pode-se dizer que os resultados obtidos *in*

*silico* são dependentes daqueles obtidos no laboratório (bancada), ou seja, estão associados.



```

R Console
> contingencyTestData<-
+ matrix(c(56,5,9,4),
+ nr=2,
+ dimnames=list("Software"=c("+","-"),
+ "Bancada"=c("C","I")))
> contingencyTestData
      Bancada
Software C I
+ 56 9
- 5 4
> fisher.test(contingencyTestData)

      Fisher's Exact Test for Count Data

data:  contingencyTestData
p-value = 0.04515
alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1
95 percent confidence interval:
 0.8024809 27.6519745
sample estimates:
odds ratio
 4.827164
> |

```

**Figura 24.** Teste Exato de Fisher para o resultado do *software* Multiplexer (Mult. 5/10), com p-valor destacado com uma elipse.

Considerando outros parâmetros analisados tem-se o Valor Preditivo Positivo, a Sensibilidade, o Falso Positivo e o Falso Negativo. O Valor Preditivo Positivo representa a probabilidade dos pares de *primers* serem compatíveis na bancada dado que foram compatíveis no *software*. A Sensibilidade representa a probabilidade dos pares de *primers* serem compatíveis no *software* dado que foram compatíveis na bancada. O Falso Positivo é a probabilidade dos pares de *primers* serem compatíveis no *software* dado que foram incompatíveis na bancada. E o Falso Negativo é a probabilidade dos pares de *primers* serem incompatíveis no *software* dado que foram compatíveis na bancada.



Os resultados da bancada foram:

- Frequência de pares de *primers* compatíveis:

$$P(C) = \frac{a+c}{n} \rightarrow P(C) = \frac{61}{74} \rightarrow P(C) = 0,82$$

- Frequência de pares de *primers* incompatíveis:

$$P(I) = \frac{b+d}{n} \rightarrow P(I) = \frac{13}{74} \rightarrow P(I) = 0,18$$

Os resultados a seguir são do *software* Multiplexer antes do ajuste dos parâmetros (baseado na **Tabela 2**):

- Frequência de pares de *primers* declarados como compatíveis pelo *software*:

$$P(+)=\frac{a+b}{n} \rightarrow P(+)=\frac{66}{74} \rightarrow P(+)=0,89$$

- Frequência de pares de *primers* declarados como incompatíveis pelo *software*:

$$P(-)=\frac{c+d}{n} \rightarrow P(-)=\frac{8}{74} \rightarrow P(-)=0,11$$

- Valor Preditivo Positivo:

$$P(C/+)=\frac{a}{a+b} \rightarrow P(C/+)=\frac{56}{66} \rightarrow P(C/+)=0,85$$

- Sensibilidade:

$$P(+/C) = \frac{a}{a+c} \rightarrow P(+/C) = \frac{56}{61} \rightarrow P(+/C) = 0,92$$

- Falso Positivo:

$$P(+/I) = \frac{b}{b+d} \rightarrow P(+/I) = \frac{10}{13} \rightarrow P(+/I) = 0,77$$

- Falso Negativo:

$$P(-/C) = \frac{c}{a+c} \rightarrow P(-/C) = \frac{5}{61} \rightarrow P(-/C) = 0,08$$

O Valor Preditivo Positivo foi de 0,85, o que significa que 85% dos pares de *primers* que foram considerados compatíveis pelo *software* realmente foram compatíveis na bancada. A Sensibilidade foi de 0,92, ou seja, 92% dos pares de *primers* realmente compatíveis foram detectados pelo *software* como tal. Os valores dos parâmetros Falso Positivo e Falso Negativo foram de 0,77 e 0,08, respectivamente. Este resultado representa os resultados *in silico* que foram diferentes da bancada, sendo que 77% dos pares de *primers* incompatíveis na bancada foram declarados como compatíveis pelo *software* e 8% dos pares de *primers* compatíveis na bancada foram declarados como incompatíveis pelo *software* (o Falso Negativo é o complemento da Sensibilidade).

Analisando os resultados do Multiplexer antes do ajuste dos parâmetros, observa-se que o *software* tem um alto Valor Preditivo Positivo e uma alta sensibilidade. O valor do parâmetro Falso Negativo foi baixo, o que é desejável. No entanto, o valor do parâmetro Falso Positivo foi significativamente alto.

Os resultados a seguir são do *software* Multiplexer, com o parâmetro tamanho da janela igual a cinco e diferença de temperatura igual a 10°C (Mult. 5/10), em relação àqueles obtidos pela análise de laboratório (baseado na **Tabela 3**):

- Frequência de pares de *primers* declarados como compatíveis pelo *software*:

$$P(+)=\frac{a+b}{n} \rightarrow P(+)=\frac{65}{74} \rightarrow P(+)=0,88$$

- Frequência de pares de *primers* declarados como incompatíveis pelo *software*:

$$P(-)=\frac{c+d}{n} \rightarrow P(-)=\frac{9}{74} \rightarrow P(-)=0,12$$

- Valor Preditivo Positivo:

$$P(C/+)=\frac{a}{a+b} \rightarrow P(C/+)=\frac{56}{65} \rightarrow P(C/+)=0,86$$

- Sensibilidade:

$$P(+/C)=\frac{a}{a+c} \rightarrow P(+/C)=\frac{56}{61} \rightarrow P(+/C)=0,92$$

- Falso Positivo:

$$P(+/I)=\frac{b}{b+d} \rightarrow P(+/I)=\frac{9}{13} \rightarrow P(+/I)=0,69$$

- Falso Negativo:

$$P(-/C)=\frac{c}{a+c} \rightarrow P(-/C)=\frac{5}{61} \rightarrow P(-/C)=0,08$$

A **Tabela 4** permite uma comparação dos resultados preditos pela versão original do *software* Multiplexer em relação àqueles obtidos pela versão otimizada do mesmo com os seguintes parâmetros: tamanho da janela 5 e diferença de temperatura 10°C.

**Tabela 4.** Tabela comparativa dos resultados preditos pela versão original do *software* Multiplexer em relação àqueles obtidos pela versão otimizada do mesmo após ajuste dos parâmetros (Mult. 5/10)\*.

	Versão original	Versão otimizada
Frequência de pares de <i>primers</i> declarados como compatíveis pelo <i>software</i>	0,89	0,88
Frequência de pares de <i>primers</i> declarados como incompatíveis pelo <i>software</i>	0,11	0,12
Valor Preditivo Positivo	0,85	0,86
Sensibilidade	0,92	0,92
Falso Positivo	0,77	0,69
Falso Negativo	0,08	0,08

\*: Mult. 5/10 representa tamanho da janela 5 e diferença de temperatura 10°C.

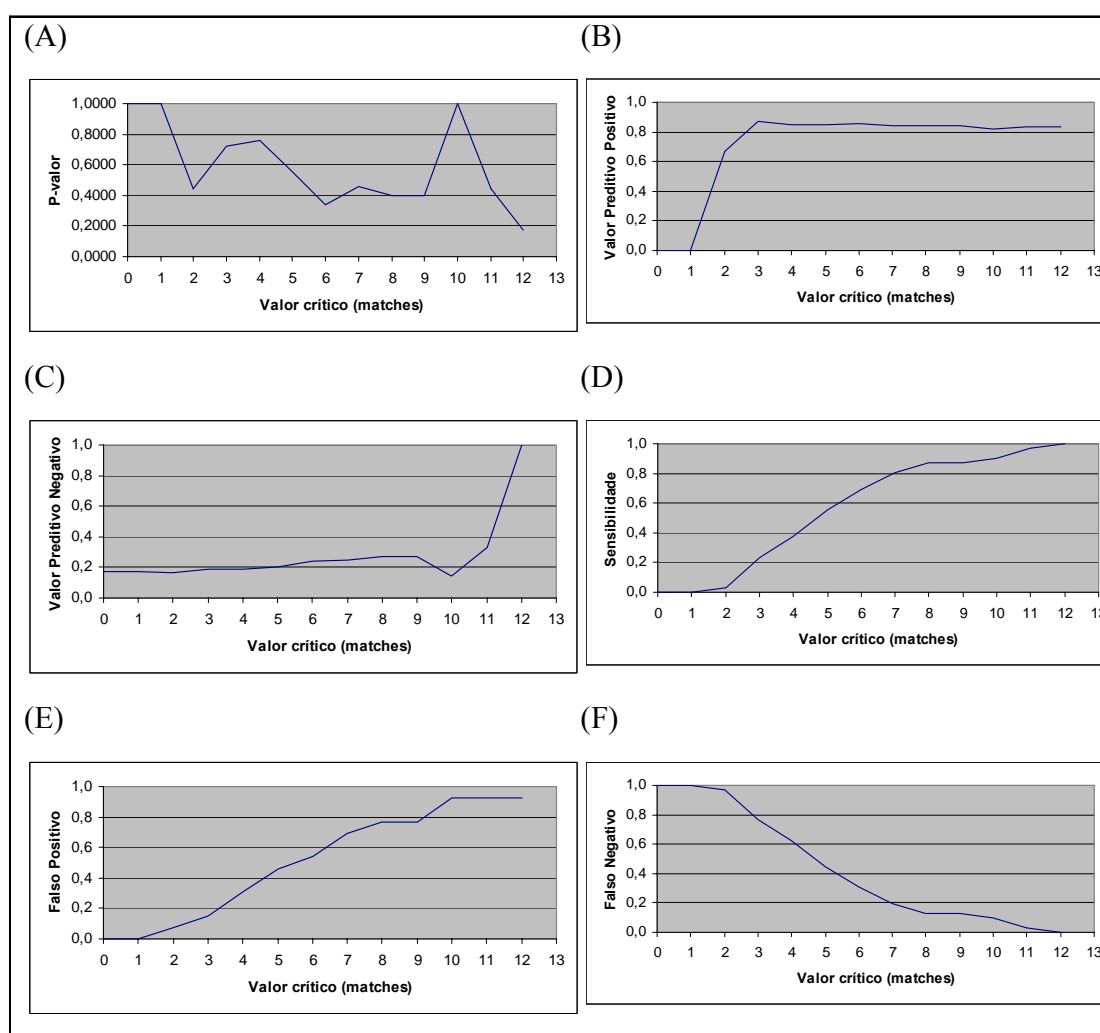
Analisando estes resultados pôde-se observar que houve uma diminuição significativa de 8% no valor do Falso Positivo da versão otimizada com relação à versão original do Multiplexer. Esse valor ainda foi relativamente alto (69%), mas não possui grande impacto uma vez que a frequência de pares de *primers* incompatíveis na bancada, P(I), foi de apenas 18%.

### 5.3.2 Análise com o *software* AutoDimer

Os resultados do *software* AutoDimer (**Anexo 2**) foram analisados e a eficiência do mesmo em comparação ao *software* Multiplexer foi avaliada para os critérios *matches*, *score*, Tm e  $\Delta G$ . A análise desses critérios foi realizada de acordo com os resultados de alguns parâmetros estatísticos como P-valor, Valor Preditivo

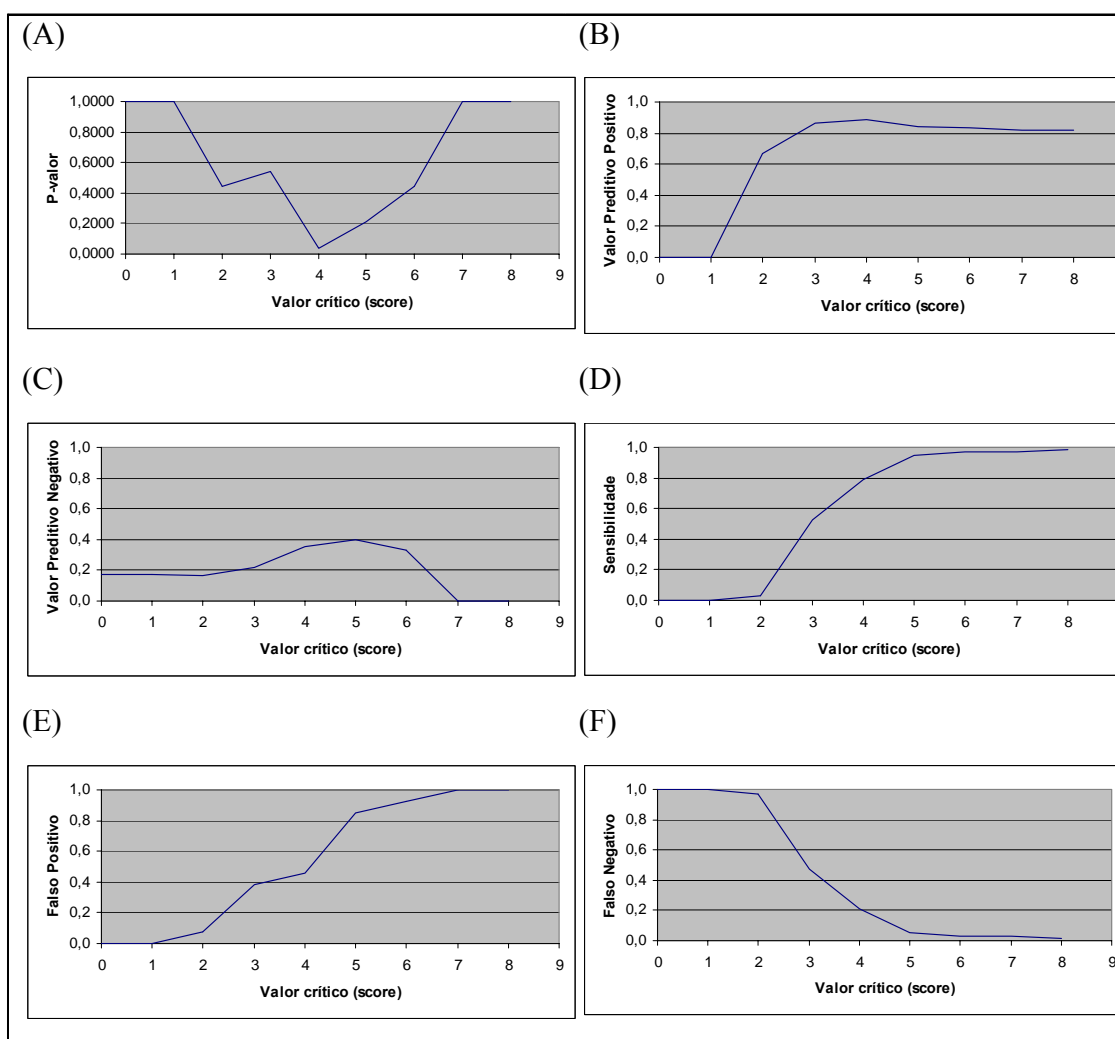
Positivo, Valor Preditivo Negativo, Sensibilidade, Falso Positivo e Falso Negativo (Figuras 25, 26 e 27).

Considerando o critério *matches* (Figura 25) não houve nenhum valor crítico que obteve um p-valor significativo (menor do que 0,05). Então, de acordo com esses resultados, *matches* não é um bom critério para se tomar como base na escolha de pares a serem usados em reações de *multiplex*.



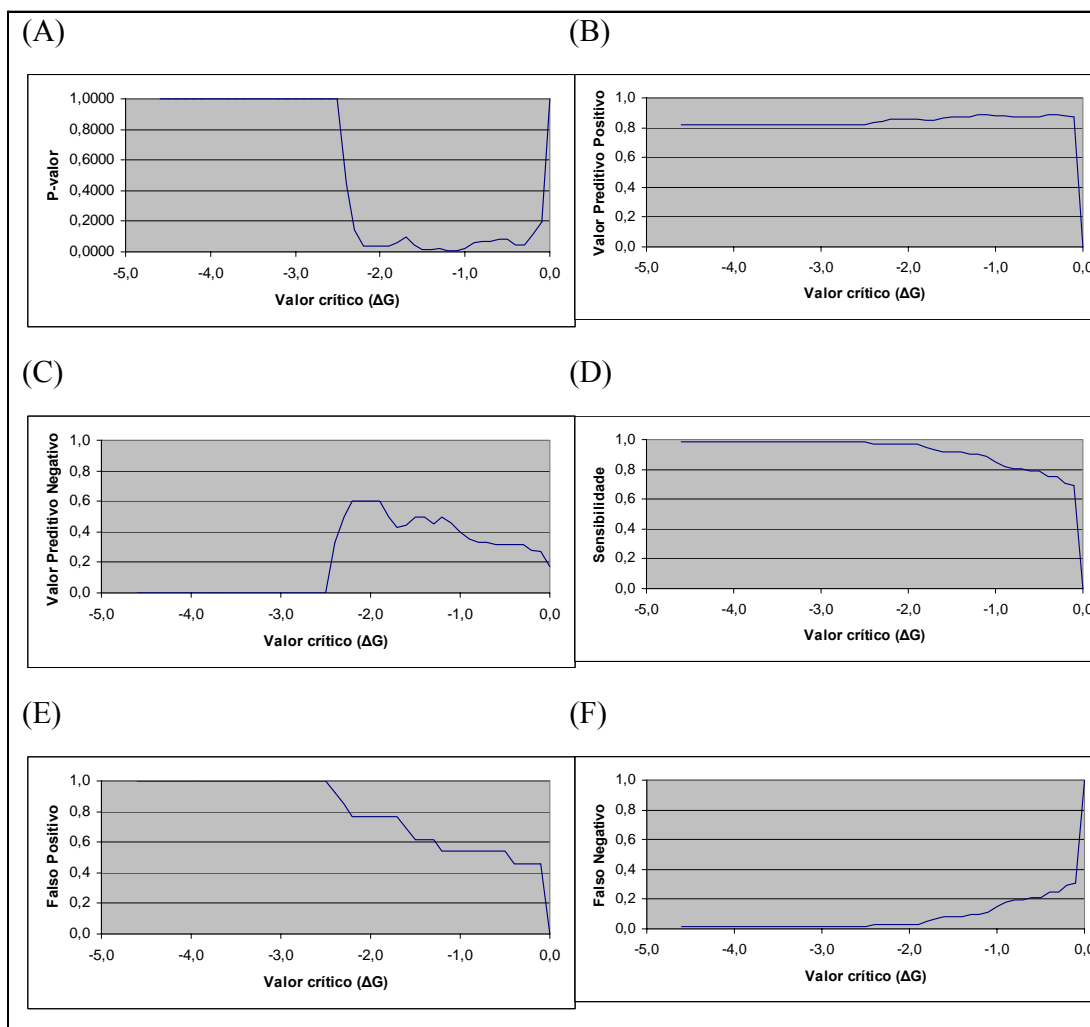
**Figura 25.** Análise estatística do critério *matches* do software AutoDimer. (A) P-valor; (B) Valor Preditivo Positivo; (C) Valor Preditivo Negativo; (D) Sensibilidade; (E) Falso Positivo e (F) Falso Negativo.

Considerando o critério *score* (**Figura 26**) o valor crítico igual a 4 foi o único cujo p-valor foi significativo (0,0341) e o que obteve o maior valor preditivo positivo (aproximadamente 89%). Assim, esse valor crítico foi escolhido como melhor, uma vez que esses parâmetros estatísticos se sobrepõem aos demais numa análise como esta. Pode-se então dizer que quando pares de locos com valores de *score* maiores ou igual a 4 forem considerados incompatíveis e menores que 4 forem considerados compatíveis espera-se obter melhores resultados na bancada.



**Figura 26.** Análise estatística do critério *score* do *software* AutoDimer. (A) P-valor; (B) Valor Preditivo Positivo; (C) Valor Preditivo Negativo; (D) Sensibilidade; (E) Falso Positivo e (F) Falso Negativo.

No entanto, o critério  $\Delta G$  (**Figura 27**) foi o critério que obteve melhores resultados dentre todos os critérios analisados para este *software* isoladamente. O valor crítico escolhido como melhor foi  $\Delta G = -1,2$  kcal/mol, com valor preditivo positivo de aproximadamente 89% (o maior dentre os resultados) e p-valor equivalente a 0,0048 (aproximadamente 0,5%). Assim, considerar pares de locos com valores de  $\Delta G$  menores ou igual a  $-1,2$  kcal/mol como incompatíveis e maiores que  $-1,2$  kcal/mol como compatíveis pode maximizar os resultados de bancada.



**Figura 27.** Análise estatística do critério  $\Delta G$  do *software* AutoDimer. (A) P-valor; (B) Valor Preditivo Positivo; (C) Valor Preditivo Negativo; (D) Sensibilidade; (E) Falso Positivo e (F) Falso Negativo.

Observou-se que a temperatura de *melting* ( $T_m$ ) não é um bom critério, uma vez que não discrimina bem entre os resultados. Apenas o par 55 (**Anexo 2**) com  $T_m$  de  $14,9^\circ\text{C}$  possui resultado diferente dos demais ( $T_m < 0^\circ\text{C}$ ).

Após todas estas análises, foi feita uma última avaliação unindo os critérios *score* e  $\Delta G$ . Assim, pares de locos com  $score \geq 4$  ou  $\Delta G \leq -1,2$  kcal/mol foram considerados incompatíveis e pares de locos com  $score < 4$  ou  $\Delta G > -1,2$  kcal/mol foram considerados compatíveis. A união desses dois critérios obteve resultados ainda melhores: Valor Preditivo Positivo igual a 0,939 (94%) e p-valor igual a



0,000628 (menor que 0,1%). Estes resultados sugerem que os critérios *score* e  $\Delta G$  unidos devem ser implementados no *software* Multiplexer.

## 6 CONCLUSÕES

A análise com o *software* Multiplexer permite concluir que:

- i. Uma diferença de temperatura entre *primers* usados em sistemas *multiplex* de PCR em torno de 10°C pode permitir a amplificação dos fragmentos desejados (*amplicons*) na reação. Esse valor pode ser sugerido como critério a ser usado pelo *software* Multiplexer, uma vez que, valores menores que este pode excluir pares compatíveis e valores maiores podem incluir pares incompatíveis;
- ii. Em relação à possibilidade de anelamento entre sequências de *primers* de locos diferentes (inter dímeros), um valor de no mínimo cinco pares de bases se mostrou satisfatório a usar no *software* Multiplexer. Isto sugere que, na bancada, um número de complementaridade entre sequências de *primers* menores que este pode permitir a amplificação dos fragmentos desejados na reação;
- iii. O *software* Multiplexer, antes de ter seus parâmetros ajustados, não possuía uma boa predição devido a um critério interno que declarava incompatível qualquer par de *primers* com sequências de três nucleotídeos complementares;
- iv. Após o ajuste dos parâmetros, a *software* Multiplexer se mostrou bastante funcional. Através do Teste Exato de Fisher, com confiança de 95% e  $\alpha$  de 5%, pode-se concluir que os resultados obtidos no *software* estão associados àqueles obtidos no laboratório;

A análise com o *software* AutoDimer permite concluir que:

- v. *Matches* não é um bom critério para se tomar como base na escolha de pares a serem usados em reações de *multiplex*;

- vi. O valor crítico ideal para o critério *score* é 4. Assim, quando pares de locos com valores de *score* maiores ou igual a 4 forem considerados incompatíveis e menores que 4 forem considerados compatíveis espera-se obter melhores resultados na bancada;
- vii. A temperatura de *melting* ( $T_m$ ) não é um bom critério, uma vez que não discrimina bem entre os resultados;
- viii. O valor crítico ideal para o critério  $\Delta G$  é -1,2 kcal/mol. Assim, considerar pares de locos com valores de  $\Delta G$  menores ou igual a -1,2 kcal/mol como incompatíveis e maiores que -1,2 kcal/mol como compatíveis pode maximizar os resultados de bancada;

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir, de forma geral, que:

- ix. A união dos critérios *score* e  $\Delta G$  obteve os melhores resultados entre todos os critérios analisados: Valor Preditivo Positivo igual a 0,939 (94%) e p-valor igual a 0,000628 (menor que 0,1%);
- x. Os critérios *score* e  $\Delta G$  unidos devem ser implementados no *software* Multiplexer, tornando disponível à comunidade uma versão capaz de ainda gerar melhores resultados.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHSEN, N. V.; WITTEWER, C. T.; SCHUTZ, E. Oligonucleotide Melting Temperatures under PCR Conditions: Nearest-Neighbor Corrections for  $Mg^{2+}$ , Deoxynucleotide Triphosphate, and Dimethyl Sulfoxide Concentrations with Comparison to Alternative Empirical Formulas. **Clinical Chemistry**, v. 47, n. 11, p. 1956-1961, 2001.
- AKKAYA, M. S.; BHAGWAT, A. A.; CREGAN, P. B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, v. 132, p. 1131-1139, 1992.
- BARTLETT, J. M. S.; STIRLING, D. **PCR Protocols**. Methods in Molecular Biology, v. 226, Totowa, NJ: Humana Press, 2003. 531p.
- BLAIR, M. W.; HEDETALE, V.; MCCOUCH, S. R. Fluorescentlabeled microsatellite panels useful for detecting allelic diversity in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). **Theor. Appl. Genet.**, v. 105, p. 449-457, 2002.
- BREDEMEIJER, G. M. M.; ARENS, P.; WOUTERS, D.; VISSER, D.; VOSMAN, B. The use of semi-automated fluorescent microsatellite analysis for tomato cultivar identification. **Theor. Appl. Genet.**, v. 97, p. 584-590, 1998.
- BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theor. Appl. Genet.**, v. 97, p. 816-827, 1998.
- BRONDANI R. P. V.; GATTAPAGLIA, D. Cost-effective Method to Synthesize a Fluorescent Internal DNA standard for Automated Fragment Sizing. **Biotechniques**, v. 31, n. 4, p. 793-800, 2001.
- BUTLER, J. M.; RUITBERG, C. M.; VALLONE, P. M. Capillary electrophoresis as a tool for optimization of multiplex PCR reactions. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 369, p. 200-205, 2001.
- BUSO, S. C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZSOHN, M. C.; AMARAL, Z. P. S.; BRONDANI, R. P. V. Marcadores microssatélites em espécies vegetais. **Biociência**, n. 30, p. 46-50, 2003.
- CHAMBERLAIN, J. S.; GIBBS, R. A.; RANIER, J. E.; NGUYEN, P. N.; CASKEY, C. T. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 1114-11156, 1988.
- CHIEN, A.; EDGAR, D. B.; TRELA, J. M. Deoxyribonucleic Acid Polymerase from the Extreme Thermophile *Thermus aquaticus*. **Journal of Bacteriology**, v. 127, n. 3, p. 1550-1557, Sept. 1976.

COBURN, J. R.; TEMNYKH, S. V.; PAUL, E. M.; McCOUCH, S. R. Design and Application of Microsatellite Marker Panels for Semiautomated Genotyping of Rice (*Oriza sativa* L.). **Crop Sci**, v. 42, p. 2092-2099, 2002.

COLLEVATTI, R. G.; BRONDANI, R. V.; GRATTAPAGLIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, v. 83, n. 6, p. 748-756, 1999.

EDWARDS, A.; CIVITELLO, A.; HAMMOND, H. A.; CASKEY, C. T. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. **Am. J. Hum. Genet**, v. 49, p. 746-756, 1991.

ELNIFRO, E.; ASHSHI, A.; COOPER, R.; KLAPPER, P. Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 559-570, Oct. 2000.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

FALCÃO, C. L.; PAPPAS, M. C. R.; LOURENÇO, R. T.; ALENCAR, M. M. de; BATISTA, A. R. S.; PAPPAS JR., G. J.; GRATTAPAGLIA, D. **Desenvolvimento e mapeamento de microssatélites derivados de ESTs em *Eucalyptus***. Embrapa, Circular Técnica 32, 2004.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220 p.

FERREIRA, M. A.; JUNQUEIRA, L. P.; LAMAS, N. S.; OHSE, B. J. G.; CERQUEIRA, A. A.; AMARAL, Z. P. S.; BUSO, G. S. C. **Desenvolvimento e utilização de sistemas multiplex de marcadores SSR para feijão**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa recursos Genéticos e Biotecnologia, Jun. 2006.

GAUFFRE, B.; GALAN, M.; BRETAGNOLLE, V.; COSSON, J. F. Polymorphic microsatellite loci and PCR multiplexing in the common vole, *Microtus arvalis*. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 830-832, 2007.

GRUNSTEIN, M; HOGNESS, D. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. **Proceedings of the National Academy of Science**. USA, v. 72, p. 3961-3965, 1975.

HENEGARIU, O.; HEEREMA, N. A.; DLOUHY, S. R.; VANCE, G. H.; VOGT, P. H. Multiplex PCR: critical parameters and step by step protocol. **BioTechniques**, v. 23, p. 504-511, 1997.

KAPLINSKI, L.; ANDRESON, R.; PUURAND, T.; REMM, M. MultiPLX: automatic grouping and evaluation of PCR primers. **Bioinformatics Application Note**, v. 21, n. 8, p. 1701-1702, 2005.

KIRST, M.; GRATTAPAGLIA, D. Development of genotyping systems for *Eucalyptus* species based on multiplexed SSR. **Plant & Animal Genome VII Conference**, Town & Country Hotel, San Diego, CA, January 17-21, 1999.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: SARVIER, 2000 (reimpressão). 839 p.

LEMES, M. R.; BRONDANI, R. P. V.; GRATTAPAGLIA, D. Multiplexed Systems of Microsatellite Markers for Genetic Analysis of Mahogany, *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae), a Threatened Neotropical Timber Species. **The Journal of Heredity**, v. 93, n. 4, p. 287-291, 2002.

LINDQVIST, A. B.; MAGNUSSON, P. K. E.; BALCIUNIENE, J.; WADELIUS, C.; LINDHOLM, E.; ALARCÓN-RIQUELME, M. E.; GYLLENSTEN, U. B. Chromosome-specific Panels of Tri- and Tetranucleotide Microsatellite Markers for Multiplex Fluorescent Detection and Automated Genotyping: Evaluation of Their Utility in Pathology and Forensics. **Genome Research**, v. 6, p. 1170-1176, 1996.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 44, n. 3, p. 397-401, 1989.

LOURENÇO, R. T. **Estrutura genômica de três megabases de DNA genômico (shotgun) de *Eucalyptus*: conteúdo nucleotídico, sequências repetitivas e genes**. 2004. 139 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular: Genética de Microrganismos), Universidade Estadual de Campinas, 2004.

LUO, G.; MITCHELL, T. G. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 2860-2865, 2002.

MACEDO, L. M. **Mapeamento de QTL para Características de Interesse Industrial da Madeira de *Eucalyptus* em Progenie de Híbridos Interespecíficos**. 2009. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, 2009.

MASI, P.; ZEULI, P. L. S.; DOMINI, P. Development and analysis of multiplex microsatellite markers sets in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Springer Netherlands**, v. 11, n. 4, p. 303-313, 2003.

MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Ano 1, n. 5, 1998.

MISSIAGIA, A.; GRATTAPAGLIA, D. Plant microsatellite genotyping with 4-color fluorescent detection using multiple-tailed primers. **Genetics and Molecular Research**, v. 5, p. 72-78, 2006.

MULLIS, K. B. **Process for amplifying nucleic acid sequences**. U.S. Patent #4,683,202, 1987. Disponível em: <<http://www.freepatentsonline.com/4683202.html>>.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A.; SCHARF, S.; SAIKI, R. K.; HORN, G.; ERLICH, H. A. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, p. 263-272, 1986.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol.**, v. 155, p. 335-350, 1987.

NARVEL, J. M.; CHU, W. C.; FEHR, W. R. Development of multiplex sets of simple sequence repeat DNA markers covering the soybean genome. **Mol. Breed.**, v. 6, p. 175-183, 2000.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4th ed. New York: Worth, 2005. 1200 p.

O'CONNEL, J. **Methods in molecular biology: RT-PCR Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 2002. 379 p.

SOARES, T. N. **Estrutura e padrão espacial da variabilidade genética de *Dipteryx alata* Vogel (Barueiro) no Cerrado**. 2006. 112 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, 2006.

OTTEWELL, K. M.; DONNELLAN, S. C.; MORAN, G. F.; PATON, D. C. Multiplexed Microsatellite Markers for the Genetic Analysis of *Eucalyptus leucoxylon* (Myrtaceae) and Their Utility for Ecological and Breeding Studies in other *Eucalyptus* Species. **Journal of Heredity**, v. 96, n. 4, p. 445-451, 2005.

OWCZARZY, R.; BEHLKE, M. Calculation of T<sub>m</sub> for Oligonucleotide Duplexes. **Integrated DNA Technologies**, p. 1-4, 2005.

PERALES, C.; CAVA, F.; MEIJER, W. J. J.; BERENGUER, J. Enhancement of DNA, cDNA synthesis and fidelity at high temperatures by a dimeric single-stranded DNA-binding protein. **Nucleic Acids Res.**, v. 31, p. 6473-6480, 2003.

PEREIRA, M. F. **Desenvolvimento de Marcadores Moleculares SSR e caracterização Genética de Populações Naturais de *Annona crassiflora* Mart. do**

**Estado de Goiás.** 2007. Tese (Doutorado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, 2007.

PEREIRA, M. F.; BANDEIRA, L. F.; BLANCO, A. J. V.; COELHO, A. S. G.; CIAMPI, A. Y. Caracterização genética de populações naturais de *Annona crassiflora* Mart. Utilizando marcadores microssatélites. In: IX SIMPÓSIO NACIONAL CERRADO, 2008. Brasília: II Simpósio Internacional Savanas Tropicais, 12-17 out. 2008.

PESSOA-FILHO, M. A. C.; BELO, A.; ALCOCHETE, A. A. N.; RANGEL, P. H. N.; FERREIRA, M. E. A set of multiplex panels of microsatellite markers for rapid molecular characterization of rice accessions. **BMC Plant Biology**, v. 7, n. 23, 2007.

QIAGEN. **HotStarTaq PCR Handbook**. 2008a. 44p.

QIAGEN. **Optimizatin of multiplex PCR**. 1999. 4p.

QIAGEN. **Multiplex PCR Handbook**. 2008b. 48p.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Áustria, 2008. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>.

RANGEL, P. N.; BRONDANI, R. P. V.; GARCIA, R. A. V.; PELOSO, M. J.; BRONDANI, C.; BLAIR, M. Desenvolvimento e aplicações de sistemas de genotipagem multiloco semi-automatizados baseados em marcadores microssatélites para feijoeiro. **CONAFE**, 2005.

RODRIGUES, A. J. L. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites e estrutura genética de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae)**. 2009. Tese (Doutorado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, 2009.

SAIKI, R.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.; HORN, G.; ERLICH, H. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-54, 1985.

SAIKI, R.; GELFAND, D.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.; HIGUCHI, R.; HORN, G.; MULLIS, K.; ERLICH, H. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p. 487-491, 1988.

SANTALUCIA J., Jr. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v. 95, p. 1460-1465, 1998.



TOMMASINI, L.; BATLEY, J.; ARNOLD, G. M.; COOKE, R. J.; DONINI, P.; LAW, J. R.; LOWE, C.; MOULE, C.; TRICK, M.; EDWARDS, K. J. The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. **Theor. Appl. Genet.**, v. 106, p. 1091-1101, 2003.

UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, J. A. M. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. W71-W74, 2007.

VALLONE, P. M.; BUTLER, J. M. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. **BioTechniques**, v. 37, p. 226-231, 2004.

VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 48-55, 2005.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 1-16, 2002.

ZUCCHI, M. I.; BRONDANI, R. P. V.; PINHEIRO, J. B.; BRONDANI, C.; VENCOVSKY, R. Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. To *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p. 512-513, 2002.

ZUCCHI, M. I.; PINHEIRO, J. B.; AGUIAR, A. V.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; VENCOVSKY, R. Spatial autocorrelation of divergence in populations of *Eugenia dysenterica* dc using SSR markers. **Florest e Ambiente**, v. 11, n.1, p. 29-38, ago./dez. 2004.

## 8 ANEXOS

**Anexo 1.** Lista dos 94 locos selecionados no *screening* com suas respectivas informações.

Loco	Cor	Seqüência <i>forward</i>	Seqüência <i>reverse</i>	Range (pb)	Tm (°C)-F*	Tm (°C)-R**
EG91	NED	GATCGGTTCTTGGTTTCTGC	GCGAAAAGCAGACGACTTTC	130-160	59,7	60,1
EG96	NED	CCAGGGAAAACAATTCAAGC	GAGCGACAAAACCAAGTTTC	250-290	59,5	59,7
EG99	NED	CTCATCAGCCTCCGAAACAC	GAAAGGAGGGACCTTTGAGG	170-205	60,8	60
EMBRA0081	NED	CATGAGTTACTGCAAGAAAAG	ACAGCCAAAAACCAAATC	75-110	52,9	53,5
EMBRA0140	HEX	CCATCTACATGCCGAACG	TGGAGGACGATGACCGTT	140-200	59,1	60,1
EMBRA0211	HEX	TTCTTTCCCTTCGGCCACC	GAGATGGAGGGCTTATGTGTGCG	240-290	67,7	66,2
EMBRA0646	6-FAM	AAAGCGTTACGTGCGACTCT	GGTACAGAAGAGGGCGTCAA	130-165	60,1	60,3
EMBRA0652	NED	TTCTTACATCTCCCCTTCC	TGAGGGCAAAAGATCTGGACT	130-165	59,1	60
EMBRA0653	NED	TTCCCGAAGCAGAAACTA	AGAAGCAGGTGCAGAGGTTG	250-285	59,8	60,6
EMBRA0654	HEX	GGGGCAAAATACAATCCAAA	CAAAATTGGCAAAATCACGA	190-265	59,6	59,5
EMBRA0655	6-FAM	ATGTGGCTAAACCGCAAAAC	CAAATAGGTCGTCGATTGTCA	100-135	60	60
EMBRA0661	HEX	GCAGAGGTATCAATCATCG	GATCTCTGCAATGTCCGGTT	165-245	59,2	60,1
EMBRA0662	NED	TCTCTCCTGTGTGCTCCT	ATTTGCGGATTCTTAGCGA	260-290	60	59,8
EMBRA0809	NED	CCTCACGCCAAAAGAAGAAG	GGGAATCGAAGAAACGATGA	260-290	60	60
EMBRA0904	NED	ACAGAGCGAGCGAGAAAGAG	GTGCAACAACCGACTCAAA	155-190	60	59,7
EMBRA0917	NED	CTTTTGGGAACTTTGGCAC	GTACGTCAAGCAGTCCGACA	185-210	59,6	59,9
EMBRA0925	NED	ATCCATCCACCAAGGAAAT	CGTAGAACTTGCGAGGAAG	230-260	60,4	60
EMBRA0945	NED	GCAAGGTTCCCTTTCTTCT	GCTGTGCTGCTCTTCTTCT	80-95	60,1	60,2
EMBRA0949	NED	CGTCCGCTCCAGTTCAAAAT	ACTTGCCGTACCAGAGGATG	260-280	62,4	60,1
EMBRA0950	NED	CGTCCGCTAAATCCTCTCT	GAATCGAGCTGGACGAAGAC	160-190	60,7	60
EMBRA0957	NED	ATCAGCTCGTTTGGCGAGT	CTGCAAGACTCTACCCTCG	95-110	61	60
EMBRA0971	NED	GAAATTCATCGACGAGAGCC	TTGTAGAACTCGGCGTCTT	320-340	59,8	59,9
EMBRA0983	NED	GTTCCGAAAGCTTCCCTCA	GGCCATCATGAGGGAGTAGA	210-130	61,5	60
EMBRA1008	6-FAM	AAGCTCGCAGCTCAGAAAAA	GTAATGTCCTCCGCCATGT	155-180	60,4	60
EMBRA1027	6-FAM	CTAGCATGGCCAGGTGGT	AAGTTCGTGGAGCAGAAGAA	310-320	59,7	60
EMBRA1033	6-FAM	TCCTCTTCGTCCTTCTTGA	ATCAGTCCGACGGCATAAAC	175-195	59,9	60
EMBRA1039	6-FAM	CCACGAAATCGCTCTCTCTC	GTCACCAATGAGGAGTCTG	280-295	60,1	60
EMBRA1057	6-FAM	ACGACTCCTGCAAGTGCTTC	TGCTTGAGCCATCTTTTCT	170-190	60,6	60
EMBRA1198	6-FAM	CTCTCTCCCTCTGCTCCCT	AAATGAAAATTCGAGCCCT	260-275	60,1	59,9
EMBRA1211	6-FAM	CACCTCTCCTTCTCTCTCCC	GCCTGAGGTTGTCTCTTTG	80-90	60,2	60
EMBRA1234	6-FAM	ATTCACCAAGCCGATCAGAG	ATGGACCGGTAGAGGGTCT	215-255	60,2	59,8
EMBRA1244	6-FAM	CGTGACTCTGTGAGCTGG	TCTTCTCACATGCCTTGCAC	260-300	59,8	60
EMBRA1247	6-FAM	TCTCTCTTCTCGCGATCC	AACACCACTTCAGCGTCTC	140-170	59,8	60,3
EMBRA1284	6-FAM	GATTCAGCAAGAAAGCTGGC	GGGGAAAGAATATTATGCACTG	125-150	60,1	60,1
EMBRA1307	6-FAM	TTGATTCCAAAATCTCGCCTC	CAACCAACACAGTTTCGAGGT	340-350	60,2	60,3
EMBRA1308	6-FAM	CGCTTCATTCAAAGCCTCTC	GCAGATGAGTTCCCATTTGGT	200-220	60,1	59,9
EMBRA1314	6-FAM	CGCCCTTCTCTCTCTCTTT	TCCTCTCATCAATCCCAAC	110-130	60,1	59,9
EMBRA1316	6-FAM	CGCACAACAGAAAACCTCCAG	CGGTTCCGGATGTACCTTTGT	110-140	59,5	60
EMBRA1320	6-FAM	GCCATGAATCAAAATTTGCC	CTTCTTTTTGTAGCGGCAG	180-220	60,3	60
EMBRA1329	6-FAM	AGAACTGGCTTCGCATCACT	TAATGCTACGGAGGTTGGG	300-320	60	60
EMBRA1332	6-FAM	TGAGGTGCTGGTTGATCTTG	GCGACTGTGCTCTTCATCA	80-100	59,8	60
EMBRA1364	6-FAM	CGTTTTCGCTCCTCTCTCTC	TGTAGAGATCGGGGTCCTTG	315-340	59,3	60,1
EMBRA1374	6-FAM	GTCTGAACTCGGCTTCCTTG	TTCTTCCCGTTGTAATCCG	330-360	60	59,9
EMBRA1382	6-FAM	GCAGTCGCAGATGTTGAAGA	ATCCGAAAGAAAGCCCAAT	250-270	60,1	59,9
EMBRA1431	6-FAM	GCGTCCGGCTTTACTCTGT	TGAGACGCTGAACCATCTTG	75-85	60,4	60
EMBRA1445	HEX	ATTGAGGAAAAACACAGCG	CGCCTCTCTGCTTTTGAT	115-135	60,1	59,7
EMBRA1450	6-FAM	AAGACTTCATTAGCCAGGCTGT	AAGCTTCCCATCAAAAGCAA	270-285	59,4	59,8
EMBRA1451	HEX	GCGTACTTGAAGATCCGCTC	AGACGCATCACTAGCGGAAG	285-305	60	60,6
EMBRA1456	HEX	TTCCGACGGTTATTTGAAGG	GAAACGATTTCTTGGCTTGC	245-260	59,9	59,8
EMBRA1469	HEX	CTCATCTTCTTCTCCAGCC	CGCAGAATCCATCAACCT	335-350	60,1	60,2
EMBRA1474	HEX	ATGCTCGTCTGCTCTTTCAT	TCCCTCTCCAGTTTACACC	190-230	59,8	60,1
EMBRA1481	6-FAM	TGCTCTCGGCAAAGGTAGAT	CGTCCGGTTTTCTTGTGTTGT	145-160	60	60
EMBRA1492	HEX	CATGTCTTCGAGTGCAATAA	AGTCTTCGCCTGACTTCCAA	300-355	59,9	60
EMBRA1535	HEX	AAATCCCACCTCCAAAGTT	AATGGAGAAGGTGTTGTCCG	245-270	59,7	60
EMBRA1551	6-FAM	GTCCGCTCGGTTACTCTGTC	CTCAGTCGAACGGAGGAGAG	70-100	60,8	60,1

EMBRA1555	HEX	AACAACCGATCAGACGAACC	ATTCATCCGTCCTCCCTGTTTT	240-285	60	60,6
EMBRA1562	HEX	CGCGAAGATCAAGGATGAAT	TGCTTTCTTGTCCTCTGCCT	160-210	60,2	60,1
EMBRA1578	6-FAM	GGGCGAGCGAGAGAAGAC	GTCAGGAAGGTGGACATCGT	70-110	61,2	60
EMBRA1584	6-FAM	CGTCCGCTCTCTCAATCT	GTCGAACTCGATGTCGCCT	95-140	59,7	60,3
EMBRA1612	NED	TTGAACCCCTGAACTGAAGCC	AGTACAGGTGGCCACAAAGG	290-315	60,2	60
EMBRA1616	HEX	GGACACTCTGC AACCTCTC	GACGAGGTGGAACCTGTAGC	135-165	59,8	59,7
EMBRA1624	NED	CACCCCGAAAGTTGTTAAGC	GGGAAGGGGAAGATGAAGAA	165-205	59,6	60,4
EMBRA1627	6-FAM	ACGACGTTGGACTTTGATCC	TCCGCTTCACCAAATTTCTC	85-100	60	60,2
EMBRA1654	HEX	CGACGTCATCGGTCAAACCTA	ATACGCTACGCCTCGAGAAA	190-240	59,7	60
EMBRA1656	6-FAM	TCCGCTCACATCTCACTGTT	GAAGAGGAGGAGGATCAGGG	90-110	59,4	60,1
EMBRA1679	HEX	GTCCGCCTTCCCTTCAC	ATCCTCAAGCTCTGGACCAC	180-210	63	59,3
EMBRA1688	HEX	CTTTCTCCCCCTCTTCCATC	GTGATCTCCTCCTCCGACAG	120-185	60	59,8
EMBRA1716	NED	TTGGTTCTTCTTGCTTGCT	GGGTCGTGTTGGAGTTGAGT	235-250	60	60
EMBRA1722	6-FAM	TTACCCGGAATCAGATGCAC	CCGACTTCGAAAAAGACGAG	135-165	59,9	60
EMBRA1744	NED	ATCACCAGCAGGAACCTCCAC	CTGCCAGCACCTCTCTTCTT	315-325	60,1	59,7
EMBRA1753	NED	GAGAGCTTGGACATGAAGGG	CTCCTCCTCCTCCTCCACTC	345-380	59,8	60,3
EMBRA1761	NED	GGCTCCCTCTCTCACTTCTT	TTTCCAGTGCTTCTCCGTCT	175-205	60	60
EMBRA1770	HEX	AATTTTGGTCTGCGTGGAAC	TGATCCGAAAAGGTGAATCC	95-130	60	59,9
EMBRA1793	NED	AGTCGTGGATGGTGTCTTCT	AGATCTGACCATAACGCGGAG	190-225	60	60,2
EMBRA1798	NED	ATCCACATTCACACCCACT	CAGCGACGACCTTTTTCTTC	180-195	60,1	60
EMBRA1808	NED	CAAGCTGCAGTAGATCGCC	CGTCCCGCTCCAAGTTCT	270-280	59,7	61,4
EMBRA1811	NED	GTGAGTTGAGTTCGCTTCC	AGTGAATCGGGAGAGGAGGT	275-310	60	60,1
EMBRA1812	NED	ATTCCGAAGCCCTAAAAGGA	TTTTGCCTTATGGGAAATGG	240-275	60	59,8
EMBRA1845	HEX	AATCTTCCCACCATCAACCA	AGAGAGGTTGCAGAAGCAGC	60-80	60,2	59,9
EMBRA1851	HEX	GTCGTCGCCATTGAAGTTCT	CGATCCTATCAGGCTCAGTG	95-125	60,3	58,4
EMBRA1868	NED	TGTGGAGCATGGAGTAGCAG	CAAACTCAGAGACGCCACA	280-345	60	60
EMBRA1920	HEX	AGCCAAAAGGAATATTGGGC	GTTCGCCCTCTCCCTCTC	60-90	60,3	59,9
EMBRA1924	NED	TCATAAAATAAAGAAAAATGAACCC	GAGGGGGTTGGGAATTGTAT	315-330	58,3	59,9
EMBRA1934	HEX	CAGAGCAGAAGCAAGCACAA	TCTGTGCGTAGAACCCTGC	110-140	60,5	60,1
EMBRA1945	NED	CCGGGCTAGCTCTTCTCTC	GAACCTCTCCATCTCCTCCC	250-280	60,6	60
EMBRA1960	HEX	GTCGAGGCAGGTGGAGTAGA	TCTCATCAATGGCTTCTCCTC	150-180	60,4	60,2
EMBRA1969	NED	TCCTCCTCCTCCTCCTTCT	GGTGTAGACGGTGACGTCT	215-230	59,9	60
EMBRA1977	NED	TTCGGCGATAGGGTTTATTG	AACTTGACGAGGAGGGGATT	85-115	59,9	59,9
EMBRA1990	NED	CCGCTCACTTCAGACAAGC	CGATTATCACCATCCCCATC	75-110	59,7	60
EMBRA1993	NED	TCATGCTGAACAAACCAGGA	TCAACTTCGCTCCCACTCTT	360-375	60,2	60
EMBRA2010	NED	GCAGGGCCTTCTGCTTAAT	AGATCAAGGGAGGGTGGAGT	270-305	59,4	59,9
EMBRA2011	NED	AAAATACGACCGCCATGAAG	TTGTGAGAGACGGAGACGTG	295-315	60	60
EMBRA2014	NED	CACCGACTTCTCTTCTTCG	CCCCATCCCTTCTCTCTC	100-135	60	60,1
EMBRA2049	NED	AGCCTCCTCTCACCTCCTC	GAGAGCTCCCTTCTGGGTCT	120-150	60	60

T<sub>m</sub> (°C)-F\*: Temperatura de *melting* da sequência forward;

T<sub>m</sub> (°C)-R\*\*: Temperatura de *melting* da sequência reverse.

**Anexo 2. Lista dos 74 pares de *primers* testados, com seus respectivos resultados de bancada e dos *softwares*.**

Par	Loco 1	Loco 2	Bancada	Resultados							
				Softwares				Matches	Score	Tm (°C)	ΔG (kcal/mol)
				MC1	MC2	MC3	MC4				
1	Eg_96	embra0646	S	S	S	S	S	5	3	<0	>0
2	Eg_96	embra1934	S	S	S	S	S	2	2	<0	>0
3	Eg_99	embra1234	S	S	S	N	S	4	3	<0	>0
4	embra0081	embra0140	S	N	S	N	S	6	5	<0	-0,69
5	embra0211	embra0655	N	N	N	N	N	12	5	<0	>0
6	embra0211	embra1474	N	N	N	N	N	7	6	<0	-2,37
7	embra0211	embra1977	S	N	S	N	S	2	2	<0	>0
8	embra0646	embra1934	S	S	S	N	S	6	4	<0	-1,8
9	embra0652	embra0661	N	S	S	N	S	9	4	<0	>0
10	embra0653	embra1451	S	S	S	N	S	7	2	<0	>0
11	embra0653	embra1654	S	S	S	N	S	11	3	<0	>0
12	embra0654	embra1033	S	S	S	S	S	4	2	<0	>0
13	embra0655	embra1474	N	S	S	N	S	2	2	<0	>0
14	embra0655	embra1924	S	S	S	N	S	3	2	<0	>0
15	embra0661	embra1450	S	S	S	N	S	5	2	<0	>0
16	embra0661	embra1584	S	S	S	N	S	5	3	<0	>0
17	embra0661	embra1993	S	S	S	N	S	5	3	<0	>0
18	embra0662	embra1247	S	S	S	N	S	2	2	<0	>0
19	embra0809	embra1234	S	S	S	N	S	5	4	<0	>0
20	embra0809	embra1851	S	S	S	N	S	4	3	<0	-1,18
21	embra0904	embra1027	N	S	S	S	S	1	1	<0	>0
22	embra0917	embra1008	S	S	S	N	S	4	4	<0	0
23	embra0917	embra1364	S	S	S	N	S	9	4	<0	-2,41
24	embra0917	embra1934	N	S	N	N	S	3	2	<0	-1,6
25	embra0917	embra1960	S	S	S	N	S	1	1	<0	>0
26	embra0925	embra1445	S	S	S	N	S	2	2	<0	>0
27	embra0945	embra1057	S	S	S	N	S	3	3	<0	-0,85
28	embra0950	embra1308	S	S	S	N	S	5	4	<0	-0,43
29	embra0950	embra1314	S	S	S	N	S	10	4	<0	>0
30	embra0950	embra1920	S	S	S	N	S	3	2	<0	-0,24
31	embra0971	embra1456	S	S	N	N	N	4	4	<0	-1,01
32	embra0971	embra1656	S	S	S	N	S	2	2	<0	>0
33	embra0971	embra1722	S	S	S	N	N	10	7	<0	-1,68
34	embra0983	embra1329	S	S	S	N	N	4	3	<0	-0,97
35	embra0983	embra1456	N	S	S	N	S	5	4	<0	-0,48
36	embra0983	embra1770	S	S	S	N	N	6	2	<0	>0
37	embra1008	embra1492	S	S	S	N	S	9	2	<0	>0
38	embra1008	embra1934	N	S	S	N	S	9	4	<0	>0
39	embra1198	embra1456	S	S	S	N	S	3	3	<0	-0,27
40	embra1234	embra1851	S	S	S	N	S	2	2	<0	>0
41	embra1244	embra1624	S	S	N	N	N	5	3	<0	-0,24
42	embra1244	embra1654	S	N	N	N	S	2	2	<0	>0

43	embra1244	embra1920	S	S	S	N	S	5	3	<0	>0
44	embra1284	embra1451	S	S	S	N	S	10	4	<0	>0
45	embra1284	embra1808	N	S	S	N	S	6	4	<0	-1,56
46	embra1284	embra1868	S	S	S	N	S	4	2	<0	>0
47	embra1308	embra1808	N	S	S	N	S	4	2	<0	-2,41
48	embra1308	embra1920	S	S	S	N	S	3	2	<0	-1,37
49	embra1316	embra1456	S	N	N	N	S	6	2	<0	>0
50	embra1316	embra1761	S	S	S	N	S	2	2	<0	>0
51	embra1320	embra1688	S	S	S	N	S	7	2	<0	>0
52	embra1320	embra1716	S	S	S	N	S	7	2	<0	>0
53	embra1329	embra1770	S	S	S	N	N	4	2	<0	>0
54	embra1332	embra1716	S	S	S	S	N	3	2	<0	>0
55	embra1332	embra1845	S	N	N	N	N	10	8	14,9	-4,61
56	embra1332	embra2011	N	N	N	N	N	6	4	<0	-2,29
57	embra1364	embra1960	S	S	S	N	S	6	4	<0	-0,19
58	embra1364	embra1969	S	S	S	N	S	6	2	<0	>0
59	embra1374	embra1679	S	S	S	N	S	1	1	<0	>0
60	embra1431	embra1688	S	S	S	N	S	4	4	<0	-1,08
61	embra1431	embra1798	S	S	S	N	S	2	2	<0	>0
62	embra1450	embra1993	S	S	S	N	S	3	2	<0	>0
63	embra1451	embra1868	S	S	S	N	S	4	2	<0	-0,42
64	embra1456	embra1656	S	S	S	N	S	3	3	<0	>0
65	embra1474	embra1744	S	S	S	N	S	7	3	<0	-0,99
66	embra1492	embra1551	S	S	S	N	S	2	2	<0	>0
67	embra1551	embra1624	S	S	S	N	S	6	3	<0	>0
68	embra1627	embra1868	S	S	S	N	S	11	3	<0	>0
69	embra1679	embra1990	S	S	S	N	N	3	2	<0	>0
70	embra1688	embra1798	S	S	S	S	S	2	2	<0	>0
71	embra1722	embra1845	S	S	S	N	N	2	2	<0	>0
72	embra1770	embra1811	S	S	S	N	S	4	3	<0	-1,78
73	embra1808	embra1920	N	S	S	N	S	3	3	<0	-1,28
74	embra1845	embra2011	N	S	S	N	S	4	2	<0	>0

MC1: *software* Multiplexer antes do ajuste;

MC2: *software* Multiplexer ajustado com tamanho da janela 5 e diferença de temperatura de 10°C;

MC3: *software* Multiplexer ajustado com tamanho da janela 4 e diferença de temperatura de 10°C;

MC4: *software* Multiplexer ajustado com tamanho da janela 5 e diferença de temperatura de 3°C;

S: Compatível;

N: Incompatível.