



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS  
NATURAIS DA AMAZÔNIA**

**DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS COMPUTACIONAIS PARA ANÁLISE  
T-RFLP *IN SILICO* DO GENE RIBOSSÔMICO 16S**

**PAULO ADRIAN ASSUNÇÃO DA SILVA**

**MANAUS  
2015**

**PAULO ADRIAN ASSUNÇÃO DA SILVA**

**DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS COMPUTACIONAIS PARA ANÁLISE  
T-RFLP *IN SILICO* DO GENE RIBOSSÔMICO 16S**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

**Orientador: Prof Dr Cleiton Fantin Rezende  
Co-Orientador: Prof. Dr. Daniel Saito**

**MANAUS  
2015**

**PAULO ADRIAN ASSUNÇÃO DA SILVA**

**DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS COMPUTACIONAIS PARA ANÁLISE  
T-RFLP *IN SILICO* DO GENE RIBOSSÔMICO 16S**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Data da aprovação \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Banca Examinadora:

---

Dr. Cleiton Fantin Rezende  
Universidade do Estado do Amazonas

---

Dr. Rudi Emerson de Lima Procópio  
Universidade do Estado do Amazonas

---

Dr. Aldo Rodrigues de Lima Procópio  
Faculdade Metropolitana de Manaus

**MANAUS  
2015**

Ficha Catalográfica

S586d Silva, Paulo Adrian Assunção da  
Desenvolvimento de ferramentas computacionais para  
análise T-RFLP *in silico* do gene ribossômico 16S. / Paulo  
Adrian Assunção da Silva -- Manaus: Universidade do Es-  
tado do Amazonas, 2015.  
Xii, 110 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado Ama-  
zonas - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e  
Recursos Naturais da Amazônia, 2015.  
Orientador: Prof. Dr. Cleiton Fantin Rezende

1. Ferramenta computacional 2.T-RFLT 3. Gene 16S  
rDNA 4. Linguagem Ruby I. Título.  
CDU: 004:001.891

*À pessoa mais importante na minha vida, o meu amigo  
e incondicional parceiro Raldson Fernandes por toda a  
paciência e generosidade em meus momentos de  
desanimo e falta de estímulo, sem você nenhuma vitória  
valeria a pena.*

*...À minha mãe Elisete Assunção, principal responsável  
pela minha vida e a quem devo meu caráter e  
disciplina ao trabalho.  
A vocês dedico esta e todas as vitórias da minha vida  
**DEDICO.***

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais  
voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

*“O que prevemos raramente ocorre; o que menos  
esperamos geralmente acontece.”*

Benjamin Disraeli

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus porque a fé em sua existência me deu e me dá forças, e faz de mim, cada vez mais, a cada dia, uma pessoa melhor;

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas;

Ao meu orientador Prof. Dr. Cleiton Fantin Rezende, pela sua compreensão, apoio e todo o suporte para a realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Daniel Saito, meu co-orientador, pela sua generosidade, seu conhecimento, suas ideias e por sua dedicação, disposição e confiança;

A todos os professores e funcionários do MBT-UEA e aos meus colegas de curso pela convivência e trocas de experiências, em especial à Julia Cavalcante do Carmo, Marta Rodrigues de Oliveira e Kátia Cilene Gomes de Carvalho, por toda a ajuda e parceria nas informações e troca de experiências;

Aos meus colegas de trabalho da SEMSA, pelo apoio e compreensão em todos os momentos em que precisei me ausentar. Em especial a minha chefe Ademarina Teixeira Cardoso e ao meu colega e amigo Jonis Angelim, pelas palavras de incentivo para minha formação profissional;

Estendo meu agradecimento ao meu amigo Thiago Pitillo por acreditar que tudo daria certo no final. Pelo ouvido que me escutou e pelas risadas que amenizavam o estress diário.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho e curso, eu deixo o meu MUITO OBRIGADO!

## RESUMO

Técnicas de *fingerprinting* genético e abordagens independentes de cultivo têm sido largamente utilizadas para se avaliar a diversidade de comunidades microbianas em diversos ambientes. No entanto, a determinação da composição de espécies presentes nessas comunidades não é tarefa simples, normalmente requerendo ensaios caros e laboriosos. Nesse contexto, a técnica de T-RFLP (*Terminal restriction fragment length polymorphism*), utilizada para se determinar a estrutura de comunidades microbianas complexas pela análise de polimorfismos de fragmentos de restrição de DNA, constitui uma ferramenta prática, robusta e confiável. A predição taxonômica de fragmentos terminais de restrição (T-RFs) pode ser alcançada utilizando-se sequências de 16S rDNA de bactérias presentes na *world wide web* (www). Assim, foi desenvolvido um conjunto de ferramentas computacionais, denominado OneSix, para análise T-RFLP *in silico* de sequências presentes em bancos de dados de domínio público. Para tanto, foram conduzidas a amplificação por PCR (*Polymerase chain reaction*) e a digestão *in silico* de sequências de 16S rDNA curadas, presentes no sítio SILVA, utilizando-se as sequências de 11 *primers forward*, 10 *primers reverse* e 13 enzimas de restrição, comumente utilizados na técnica de T-RFLP. Os algoritmos foram desenvolvidos na linguagem de programação Ruby, devido a uma vasta classe de métodos e pacotes voltados à bioinformática, o Bioruby; e testados ao simular a técnica de PCR, resultando em 81 arquivos e T-RFLP, em 1053 arquivos. O OneSix pretende facilitar o processo de predição taxonômica de T-RFs por pesquisadores da área, através da geração de dados abrangentes e pertinentes à realidade da técnica de T-RFLP.

**Palavras-chave:** Ferramenta computacional. T-RFLP. Gene 16S rDNA. Linguagem Ruby.



## ABSTRACT

Techniques for genetic fingerprinting and independent cultivation approaches have been used extensively to evaluate the diversity of microbial communities in various environments. However, determining the composition of species present in these communities is not an easy task, typically requiring expensive and laborious testing. In this context, T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism), used to determine the structure of complex microbial communities for examining polymorphisms of DNA restriction fragments, is a practical, robust and reliable tool. The prediction taxonomy of terminal restriction fragments (T-RFs) can be achieved using the 16S rDNA sequence of bacteria present on the World Wide Web (www). Thus, it developed a set of computational tools, called OneSix, for T-RFLP analysis *in silico* of sequences present in public domain databases. Therefore, such sequences was conducted by PCR amplification (Polymerase Chain Reaction) and *in silico* digestion of the 16S rDNA sequences cured, present in the site SILVA, using the sequences of 11 forward primers, reverse primers 10 and 13 enzymes restriction, commonly used in T-RFLP technique. The algorithms were developed in the Ruby programming language, due to a broad class of packets directed to methods and bioinformatics, the bioruby; and tested by simulating the PCR, resulting in 81 files and T-RFLP, in 1053 files. The OneSix intends to facilitate the prediction process Taxonomic T-RFs by researchers in the field, by generating comprehensive and relevant data to the reality of T-RFLP technique.

**Keywords:** Computational tool. T-RFLP. 16S rDNA. Ruby language.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

Tabela 1. Lista de <i>Primers</i> Forward para teste dos algoritmos .....	31
Tabela 2. Lista de <i>Primers Reverse</i> para teste dos algoritmos .....	32
Tabela 3. Lista de enzimas de restrição para teste do algoritmo T-RFLP <i>in silico</i> .....	34
Tabela 4. Valores adotados para cálculo da massa molecular, expressos em Daltons (da). ....	34
Tabela 5. Lista de combinações de primers F e R para teste dos algoritmos. ....	35
Tabela 6. Temperatura de anelamento dos <i>primers</i> selecionados obtidos da PCR <i>in silico</i> . ...	39
Tabela 7. Combinações de <i>primers</i> F e R com poucos resultados (abaixo de 1% do total de sequências).....	39
Tabela 8. Temperatura de anelamento dos <i>primers</i> selecionados obtidos da PCR <i>in silico</i> . ...	42
Tabela 9. <i>Primers</i> F com tamanho médio do fragmento da extremidade 5' menor que o tamanho do próprio primer. E também, apresentando desvio padrão nulo. ....	42
Tabela 10. <i>Primers</i> R com tamanho médio do fragmento da extremidade 3' menor que o tamanho do próprio <i>primer</i> . E também, apresentando desvio padrão nulo. ....	43
Tabela 11. Combinações de <i>primers</i> F, R e enzimas com poucos resultados, abaixo de 1% do total de sequências. ....	43
Tabela 12. Gêneros encontrados em Wu et al. (2015) e nos arquivos resultantes da T-RFLP <i>in silico</i> com os mesmos tamanhos de fragmentos 5' .....	44

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

- Figura 1. Estrutura do ribossomo de um procarioto e suas subunidades. Na subunidade 50S, o 23S rRNA é mostrado na cor amarela, o 5S rRNA em laranja e proteínas em vermelho. Na subunidade 30S, o 16S rRNA é mostrado na cor verde e as proteínas em azul.....17
- Figura 2. Esquema da Análise por T-RFLP.....19
- Figura 3. Esquema da amplificação de DNA pela técnica de PCR.....20

### CAPÍTULO I

- Figura 1. Permutação de bases do *primer Forward* pela base degenerada “N”.....33
- Figura 2. Permutação de bases do *primer Reverse* pela base degenerada “N” ..... 33
- Figura 3. Gráfico com as melhores combinações de pares de *primers F e R*, com total de amplicons resultantes acima de 50% ..... 37
- Figura 4. Gráfico de comparação entre os resultados das melhores combinações de *primers F e R*, resultantes do OneSix (antes da remoção dos valores duplicados), e os resultados do TestPrime.....38
- Figura 5. Gráfico de comparação entre os resultados das melhores combinações de *primers F e R*, resultantes do OneSix (após a remoção dos valores duplicados), e os resultados do TestPrime.....38
- Figura 6. Gráfico de comparação entre as combinações de *primers F e R*, com resultados inferiores a 0,57%, resultantes do OneSix (antes da remoção de valores duplicados), e os resultados do TestPrime.....40
- Figura 7. Gráfico de comparação entre as combinações de *primers F e R*, com resultados inferiores a 0,57%, resultantes do OneSix (após a remoção de valores duplicados), e os resultados do TestPrime.....40
- Figura 8. Gráfico com as melhores combinações de pares de *primers F e R*, com total de amplicons resultantes acima de 60% .....41

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 BIOINFORMÁTICA.....	14
2.2 A LINGUAGEM DE PROGRAMAÇÃO RUBY.....	15
2.3 RNA RIBOSSÔMICO: 16S RRNA.....	16
<b>2.3.1 Utilização do gene 16S rRNA em estudos de diversidade microbiana .....</b>	<b>17</b>
2.4 <i>TERMINAL RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM</i> (T-RFLP).....	18
<b>2.4.1 Ferramentas para T-RFLP <i>in silico</i> existentes .....</b>	<b>21</b>
3 OBJETIVO GERAL.....	23
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
REFERÊNCIAS .....	24
CAPÍTULO I.....	27
INTRODUÇÃO.....	28
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
2.1 FERRAMENTAS DE DESENVOLVIMENTO.....	29
2.2 CLASSES DO BIORUBY .....	30
2.3 ALGORITMO E TESTES.....	31
<b>2.3.1 Parâmetros do Algoritmo .....</b>	<b>31</b>
<b>2.3.2 Análises das sequências do gene 16S rDNA. ....</b>	<b>35</b>
3 RESULTADOS .....	36
3.1 PCR <i>in silico</i> .....	37
3.2 T-RFLP <i>in silico</i> .....	41
4 DISCUSSÃO.....	44
CONCLUSÕES .....	48
REFERÊNCIAS .....	49
ANEXOS.....	53

## INTRODUÇÃO

A distinção entre os organismos intimamente relacionados pode ser realizada por exames bioquímicos, porém, a taxonomia convencional, por vezes, não demonstra uma representação fiel deste relacionamento taxonômico ou evolutivo, resultando em agrupamentos errôneos em um mesmo gênero ou família. Sendo assim, abordagens moleculares têm desempenhado um papel importante nas respostas destas questões (DALE; PARK, 2004).

Diversos métodos de estudo em microbiologia, principalmente os independentes de cultivo, pois muitos microrganismos não conseguem crescer em condições laboratoriais, realizam análises comparativas de um grande número de amostras e oferecem uma abordagem acelerada para os estudos de estruturas e composições de comunidades microbianas, além de uma rápida identificação de numerosas cepas dominantes (KARL, 2007; SHYU et al., 2007).

No ano de 1997, um novo sistema de classificação filogenética para procariotos foi proposto, sendo este baseado na variação da sequência dos genes 16S da subunidade 30S do RNA ribossômico (rRNA). Desde então, este gene é utilizado como marcador filogenético padrão para caracterizar comunidades bacterianas (STACKEBRANDT; RAINEY; WARD-RAINEY, 1997).

Alguns dos métodos de estudos utilizam técnicas de impressão digital (*fingerprinting*) com base em genes 16S, dentre elas destacam-se a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), eletroforese em gel com gradiente de temperatura (TGGE), análise automatizada de espaçadores intergênicos ribossomais (ARISA), análise de restrição de DNA ribossômico amplificado (ARDRA) e a análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos terminais de restrição (T-RFLP) (SCHUTTE et al., 2008; STRALIS-PAVESE et al., 2005).

Entretanto, a análise de genes 16S rRNA de indivíduos de várias bibliotecas, por técnicas como ARISA e ARDRA, tornam-se abordagens caras e ineficientes aos estudos de comunidades bacterianas. Assim, técnicas como T-RFLP são empregadas em avaliação destas sequências, porque são muito mais rápidas e mais aplicáveis a experimentos de campo em grande escala (KOPECKÝ; NOVOTNÁ; SÁGOVÁ-MARECKOVÁ, 2009). Atualmente, é um dos métodos mais poderosos para comparar rapidamente as estruturas e dinâmicas que envolvem mudanças nos parâmetros físico-químicos prevalentes das comunidades microbianas de amostras ambientais (CAFFARO-FILHO; FANTINATTI-GARBOGGINI; DURRANT, 2007; SHYU et al., 2007).

Na busca do tratamento de dados biológicos, a bioinformática destaca-se como uma nova área do conhecimento, devido ao constante crescimento da necessidade de soluções

computacionais que permitam resolver questões que envolvam genes, predição da configuração tridimensional de proteínas, identificação de inibidores de enzimas, organização de informações biológicas, inferências filogenéticas, entre outras (LESK, 2008).

Segundo Xiong (2006), a bioinformática consiste em duas modalidades complementares: a primeira é caracterizada pelo desenvolvimento de ferramentas computacionais e banco de dados, que inclui desde a concepção da ideia, planejamento e escrita do software até sua implementação; já a segunda preocupa-se em aplicar estas ferramentas na geração de conhecimento biológico para melhor compreensão dos sistemas vivos. As análises de informações biológicas, muitas vezes, geram novos problemas e desafios que propiciam o desenvolvimento de novas ferramentas computacionais. Este trabalho foi conduzido dentro da primeira modalidade, o desenvolvimento.

Neste contexto, esta dissertação, composta por um capítulo, aborda o desenvolvimento de um conjunto de ferramentas computacionais, denominado de OneSix, com o módulo T-RFLP, que simula a amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando iniciadores (*primers*) predeterminados e digestão com enzimas de restrição de sequências; tal ferramenta será validada utilizando sequências do gene 16S rRNA presentes no banco de dados online SILVA.

Deste modo, a expectativa é que estas ferramentas computacionais possam auxiliar o pesquisador da área de biologia molecular e genética, em suas pesquisas de diversidade microbiana, através da análise *in silico* das sequências do gene 16S do RNA ribossômico, comparando os resultados da análise *in vitro* com os dados, processados pelo programa objeto deste estudo.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 BIOINFORMÁTICA**

O conceito de Bioinformática surgiu na década de 1990 como uma nova área interdisciplinar do conhecimento científico, compreendendo as áreas de ciência da computação e ciências biológicas (OTTO et al., 2007). Esta disciplina utiliza a tecnologia dos computadores para armazenamento, manipulação, recuperação e disposição de informações relacionadas a macromoléculas biológicas, como DNA, RNA e proteínas (XIONG, 2006).

A bioinformática teve sua origem por volta da década de 1960, com os estudos de Margaret Dayhoff (1925-1983), que desenvolveu diferentes métodos computacionais para

análise de sequências, dentre elas destacando-se: a matriz de substituição *Point Accepted Mutation*, o método de máxima parcimônia para filogenia molecular e o primeiro banco de dados biológicos, contendo estrutura e sequências de proteínas (HUNT, 1983; XIONG, 2006).

No entanto, com o aprimoramento das técnicas de sequenciamento e novas tecnologias na década de 1980, houve a necessidade de se lidar com o volume crescente de informação, tornando a bioinformática uma área independente e essencial (OTTO et al., 2007). Por conseguinte, obteve grande destaque a partir da década de 1990, com o surgimento do Projeto Genoma, que permitiu um grande avanço na área, principalmente no âmbito da engenharia da computação, pois o processamento de grande quantidade de dados exigia processadores e memórias muito mais poderosas (LESK, 2008).

Já no Brasil, por volta de 1997, a bioinformática foi incorporada, pioneiramente, no projeto de sequenciamento do genoma da bactéria *Xylella fastidiosa*, que causa a doença do amarelinho nos laranjais. Consequentemente, a bioinformática passou a ganhar destaque em eventos acadêmicos de diversas áreas e no âmbito empresarial, principalmente no setor de desenvolvimento de novas ferramentas computacionais (ALVES, 2013).

Os problemas no campo da biologia, medicina e bioinformática são diversificados e complexos, logo é sensato que haja conhecimento das ferramentas computacionais disponíveis para que possam ser selecionadas para o problema em questão. No entanto, as ferramentas mais fundamentais e versáteis são, sem dúvida, as linguagens de programação (DUDLEY, BUTTE, 2009).

## 2.2 A LINGUAGEM DE PROGRAMAÇÃO RUBY

De acordo com Aaby (2004), uma linguagem de programação é uma notação para escrever programas no âmbito da computação, permitindo que o homem possa transmitir instruções, denominadas de algoritmo, para o computador; definir e manipular estruturas de dados ou controlar o fluxo de execução, resultando em um processamento das informações e respostas desejadas.

Apesar de existirem diversas linguagens de programação que possam ser adequadas e eficazes no domínio da bioinformática, as linguagens de *scripts* interpretadas mais modernas, tais como Perl, Python e Ruby, são as escolhas mais preferidas e prudentes (MOUNT, 2004).

A linguagem Perl é considerada de uso geral, desenvolvida originalmente para manipulação de textos, passando a ser utilizada em projetos de softwares que incluem administração de sistemas, desenvolvimento para internet, programação de redes,

desenvolvimento de interfaces gráficas, entre outros. Dentre suas maiores características está sua facilidade de uso, com suporte tanto para programação procedimental quanto orientada a objetos, além de um poderoso suporte para processamento de textos e uma das maiores coleções de módulos disponíveis (JR, 2000).

Por outro lado, Ruby é uma linguagem de programação dinâmica com uma complexa gramática, ao mesmo tempo clara e eficiente, puramente orientada a objetos, mas também possui a versatilidade quanto a estilos de programação processuais e funcionais. É uma linguagem de script interpretada para programação orientada a objetos, criada no início da década de 90 por Yukihiro Matsumoto, que uniu as qualidades de suas linguagens favoritas (Perl, Smaltek, Eiffel, Ada e Lisp) para formar uma nova linguagem de programação que equilibra a programação funcional com a imperativa (COLLINGBOURNE, 2006; FLANAGAN; MATSUMOTO, 2008).

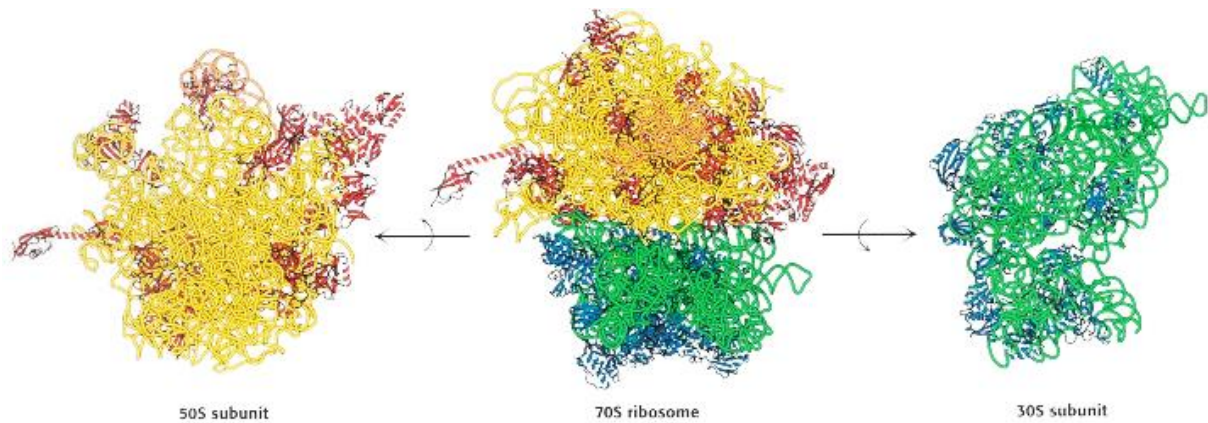
### 2.3 RNA RIBOSSÔMICO: 16S RRNA

O RNA é um carregador de informação genética e existem três tipos principais: o RNA mensageiro (mRNA), responsável por dirigir a síntese de proteínas; o RNA ribossômico (rRNA), que deriva do DNA contido nos cromossomos (rDNA, ou DNA ribossômico) constituindo cerca de 80% a 85% do RNA total de uma célula e sendo os componentes estruturais e funcionais dos ribossomos; e o RNA transportador (tRNA), que transporta os aminoácidos para a síntese polipeptídica (PEVSNER, 2009; XIONG, 2006).

O ribossomo é o local na célula onde ocorre a síntese da proteína. Esta organela possui subunidades que são designadas conforme seu coeficiente de sedimentação quando submetidas à ultracentrifugação (S – Svedberg, em homenagem ao físico Theodor Svedberg, 1884-1971, que inventou a ultracentrífuga), onde um S é igual a  $10^{-13}$  segundos. Em procariotos, encontra-se a partícula de ribonucleoproteína 70S (Figura 1), que é composta pelas subunidades 30S, contendo o rRNA 16S, e 50S, contendo o rRNA 23S e 5S. Em eucariotos, a ribonucleoproteína 80S consiste nas subunidades 60S, com rRNA 5S, 5.8S e 28S, 25S em plantas, e 40S, contendo o rRNA 18S (COX; DOUDNA; O'DONNELL, 2012; PEVSNER, 2009).



Figura 1 - Estrutura do ribossomo de um procarioto e suas subunidades. Na subunidade 50S, o 23S rRNA é mostrado na cor amarela, o 5S rRNA em laranja e proteínas em vermelho. Na subunidade 30S, o 16S rRNA é mostrado na cor verde e as proteínas em azul.



Fonte: Berg, 2002.

### 2.3.1 Utilização do gene 16S rRNA em estudos de diversidade microbiana

Metagenômica é o estudo de amostras de comunidades microbianas obtidas diretamente do habitat natural, propiciando uma direção em relação às suas estruturas comunitárias, composição filogenética, diversidade de espécies, capacidade metabólica e diversidade funcional (SHAH et al., 2011).

Nas análises de comunidades bacterianas, o rRNA é utilizado como alvo, caso as populações a serem analisadas sejam altamente ativas, pois o teor médio de rRNA por célula está diretamente relacionada com a taxa de crescimento das bactérias ativas e, por conseguinte, alterações no conteúdo do rRNA reflete as mudanças na atividade metabólica dentro da população (STRALIS-PAVESE et al., 2005).

Os pesquisadores Lane et al. (1985) foram os pioneiros na análise direta das sequências de genes 16S rRNA e 5S rRNA, permitindo a descrição da diversidade microbiana em uma amostra ambiental, sem cultivo.

Os genes do rRNA dos procariotos possuem alta conservação e pequenas variações de uma espécie para outra, onde ocorrem comumente no 16S rRNA. Com base nestas diferenças, pode-se calcular a distância evolutiva, permitindo a construção de uma árvore filogenética que ilustra uma possível rota evolutiva pela qual as espécies divergiram de um ancestral comum (DALE; PARK, 2004).

Segundo Acinas et al. (2004) e Pevsner (2009), os rRNA são estudados por serem partes de um conjunto de genes informativos que são fracamente afetados por transferência

horizontal, permitindo uma avaliação sólida das mudanças evolutivas. Ao encontro desta informação, os genes 16S rDNA tornaram-se um padrão na inferência de relações filogenéticas, classificação taxonômica, análise da diversidade ambiental, bem como quantificação de populações específicas de procariotos.

No entanto, o gene 16S rDNA, que codifica o gene 16S rRNA, é a molécula preferida para esses estudos filogenéticos devido ao seu tamanho e por ser melhor manipulado. Ademais, as sequências conservadas deste gene são utilizadas para o desenho de *primers* (PATEL et al., 2000).

Os genes 16S rRNA compartilham regiões na sequência que são altamente conservadas, e que são intercaladas com regiões mais variáveis (ZHANG, et al., 2003). Estes genes contêm nove regiões hipervariáveis (V1 a V9) que demonstram uma considerável diversidade nas sequências entre as diferentes bactérias e têm sido utilizadas para identificação das espécies (SHAH et al., 2011; WANG; QIAN, 2009).

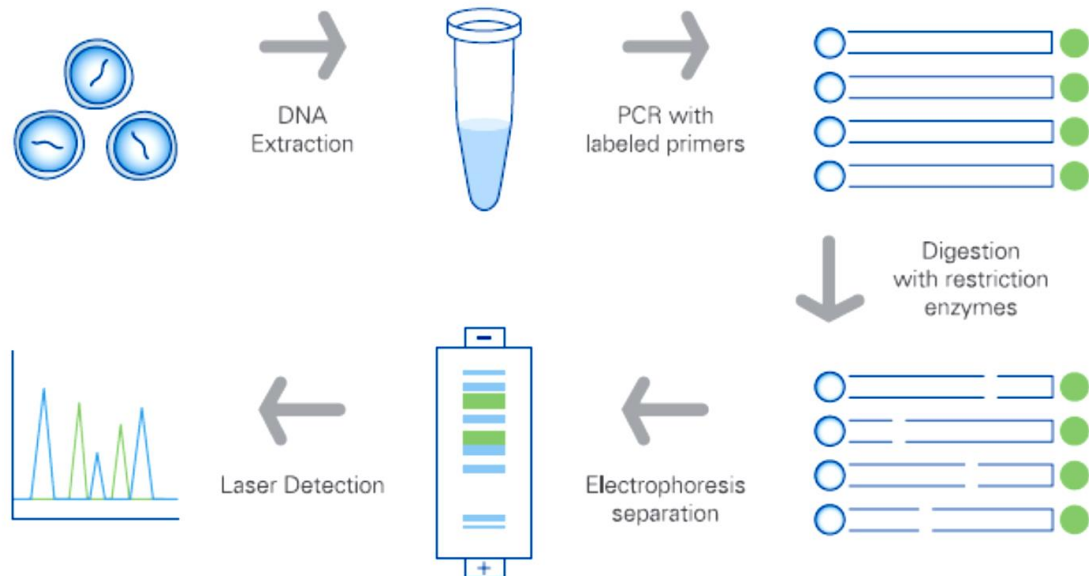
Não obstante, a análise baseada em 16S rRNA de amostras ambientais pode ser complicada devido a vários fatores, incluindo sequências quiméricas causadas por amplificação por PCR e erros de sequenciamento, o que pode resultar em superestimação da diversidade de espécies de projetos metagenômicos (SHAH et al., 2011).

#### 2.4 *TERMINAL RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (T-RFLP)*

A técnica de T-RFLP foi desenvolvida por Liu et al. (1997) como uma ferramenta para analisar a diversidade e estrutura das comunidades microbianas em amostras ambientais de microrganismos (DICKIE; FITZJOHN, 2007).

A técnica de T-RFLP (Figura 2) consiste em utilizar produtos da técnica de PCR, usada para amplificar uma sequência de DNA específica, e em seguida realizar a digestão, desta sequência amplificada, por enzimas de restrição, onde os produtos digeridos são separados por eletroforese capilar em gel, detectados e registrados em um analisador automatizado de sequências. Cada fragmento terminal é representado por um pico no cromatograma de saída e corresponde a membros da comunidade que partilham o mesmo tamanho deste fragmento (FERNANDEZ-GUERRA et al., 2010; JUNIER; JUNIER; WITZEL, 2008; KOPECKÝ; NOVOTNÁ; SÁGOVÁ-MARECKOVÁ, 2009).

Figura 2 – Esquema da análise por T-RFLP.



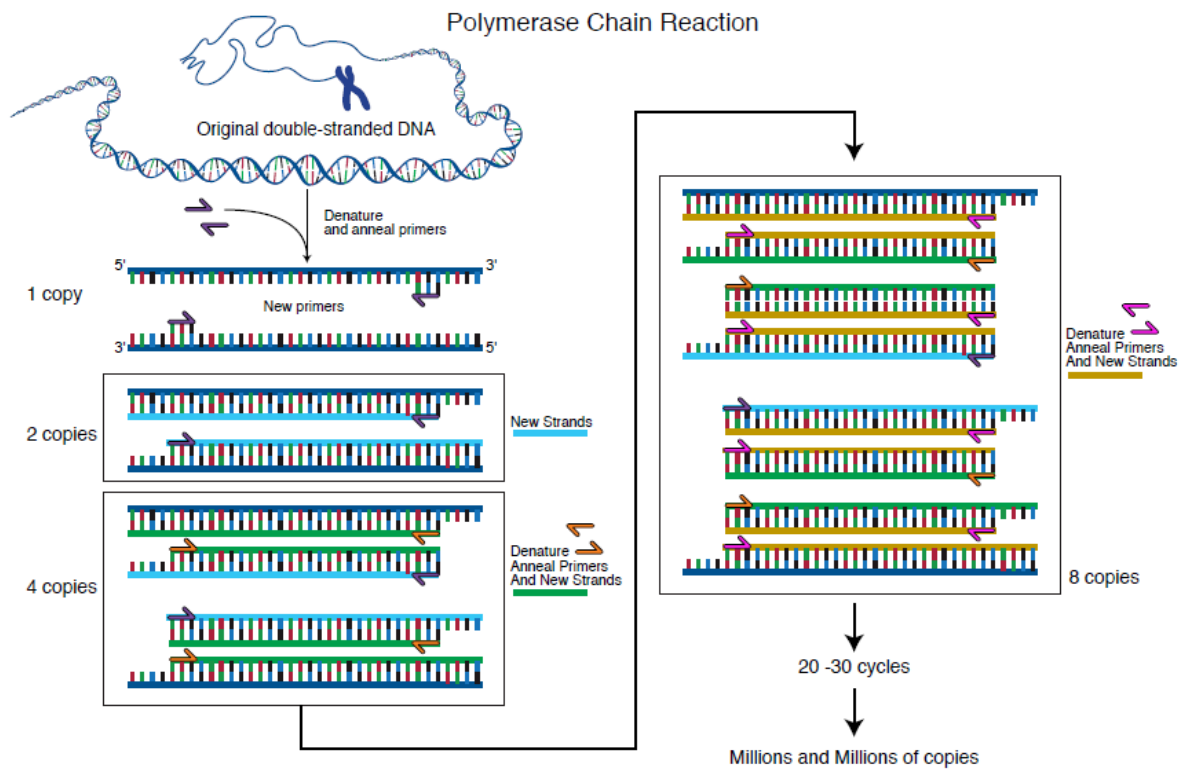
Fonte: Applied Biosystems, 2005.

Desde a sua invenção por Kary Mullis, em 1993, a PCR revolucionou a área da biologia molecular, acelerando drasticamente o progresso nos estudos de genes e genomas, e isto impacta positivamente na investigação médica e biológica (DORAK, 2007).

A PCR consiste em três passos essenciais, dependentes de temperaturas específicas: a desnaturação, onde há conversão de moléculas de cadeia dupla de DNA em cadeias simples; a hibridização, onde ocorre o anelamento dos *primers*, um ou ambos marcados por fluorescência, em cada fita de DNA; e a extensão, onde oligonucleotídeos são sintetizados pela DNA polimerase, ligando-os as bases complementares do DNA, de ambos lados (BORAH, 2011). Os ciclos repetidos resultam em um aumento exponencial da quantidade de DNA alvo. Por exemplo (Figura 3), utilizando-se vinte ciclos, aumenta-se em cerca de um milhão de vezes a quantidade de uma molécula de DNA. A concentração do DNA molde é inicialmente muito baixa, porém aumenta drasticamente à medida que a reação prossegue e surgem novos modelos (DALE; PARK, 2004).

Durante a síntese de DNA, a enzima DNA-polimerase seleciona o nucleotídeo correto para adicionar ao *primer* a fim de estender a cadeia de acordo com as regras de emparelhamento de bases de Watson e Crick (A-T e G-C). Esta enzima sempre catalisa a síntese na direção 5'-3' (MCPHERSON; MØLLER, 2007).

Figura 3 – Esquema da amplificação de DNA pela técnica de PCR.



Fonte: Leja, 2014.

A escolha de *primers* para a análise por T-RFLP deve ser específica a cada grupo taxonômico alvo e, também, suficientemente geral, de modo que possam amplificar todas as populações bacterianas de interesse. Entretanto, não há *primers* conhecidos que satisfazem ambos os critérios (KOPECKÝ; NOVOTNÁ; SÁGOVÁ-MARECKOVÁ, 2009).

O comprimento ótimo destes *primers* é geralmente aceito entre 18 a 22 nucleotídeos, suficiente para a especificidade adequada e se ligarem facilmente ao molde do DNA sob a temperatura de anelamento (BORAH, 2011). No entanto, se o comprimento for relativamente curto não haverá especificidade em relação ao gene. Por outro lado, quando muito longos são mais suscetíveis a formarem estruturas secundárias ou dímeros de *primers*, que diminuem a eficiência da PCR (DORAK, 2007).

Para o 16S rDNA, as sequências dos *primers* estão localizadas nas regiões conservativas que ladeiam uma região alvo utilizado para análise filogenética. Os primeiros conjuntos de *primers* foram desenhados usando regiões conservadoras de sequências de 16S rDNA de diferentes espécies e foram nomeados de acordo com as suas posições sobre o gene 16S da *Escherichia coli*. Nas últimas décadas, mais *primers* foram desenhados para estudos

bacterianos, até mesmo visando filós específicos, utilizando ferramentas como o software ARB (WANG; QIAN, 2009).

A variação no gene 16S rDNA não é distribuída uniformemente, algumas regiões são altamente conservadas, assim, um par de *primers* de PCR pode ser utilizado para reconhecer estas sequências em ambos os lados de uma região variável, permitindo amplificar e até sequenciar a região que contém as diferenças. O mesmo par de *primers* pode ser usado para qualquer organismo, onde a sequência obtida pode ser comparada com sequências de rRNA de microrganismos conhecidos, determinando, pelo menos provisoriamente, a identidade da bactéria desconhecida e a sua relação com as espécies conhecidas (DALE; PARK, 2004; FREDRIKSSON; HERMANSSON; WILÉN, 2013).

Entretanto, os polimorfismos também podem se acumular nas regiões conservadas, significando que as taxas de coberturas de alguns *primers* estão em declínio. Isto pode causar problemas no uso de *primers* amplamente aceitos, pois se utilizados de forma errônea, a detecção de algumas espécies bacterianas levará ao fracasso e, conseqüentemente, a estudos metagenômicos incompletos (WANG; QIAN, 2009).

De acordo com Aggarwal (2011), alguns locais podem ter qualquer um dos quatro nucleotídeos, permitindo diferentes combinações. Quando isto ocorre, verificamos a presença de uma base degenerada. Logo, um *primer* pode conter bases degeneradas. Desta forma, podem ser utilizados para direcionar um gene semelhante a partir de organismos diferentes.

A análise T-RFLP é aplicada com sucesso em diferentes alvos, incluindo os genes 16S rRNA e de genes de enzimas envolvidas em processos metabólicos específicos, tais como a fixação do nitrogênio, desnitrificação, nitrificação, entre outras (JUNIER; JUNIER; WITZEL, 2008).

Embora tenha sido amplamente utilizada para fins de comparação, T-RFLP sozinha não permite a identificação taxonômica conclusiva de filótipos individuais, porque é tecnicamente desafiador recuperar os fragmentos terminais para um sequenciamento direto. No entanto, quando comparada com dados de sequência de genes 16S rRNA representativos, a identificação torna-se viável (FERNANDEZ-GUERRA et al., 2010).

#### **2.4.1 Ferramentas para T-RFLP *in silico* existentes**

Por muito tempo, o desenho de *primers* baseados nos genes 16S rRNA foi limitado pelo baixo número de sequências disponíveis (WEISBURG et al., 1991). O desenvolvimento de *primers* com maior especificidade bacteriana começou após o surgimento do primeiro banco

de dados de genes ribossômicos, o *Ribosomal Database Project* (RDP), que compilava sequências oriundas do *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) e GenBank (MAIDAK et al., 1997; OVERMANN; COOLEN; TUSCHAK, 1999).

Existem programas para análise T-RFLP tais como o MICA (SHYU et al., 2007), TReFID (ROSCH; BOTHE, 2005), TRF-CUT (RICKE; KOLB; BRAKER, 2005), TRAMPR (FITZJOHN; DICKIE, 2007), TRiFLe (JUNIER; JUNIER; WITZEL, 2008) e TRFPred (FERNANDEZ-GUERRA et al., 2010).

MiCA é uma ferramenta baseada na web que permite a amplificação *in silico* por PCR e restrição de sequências do gene 16S rRNA, comparação de múltiplos perfis de T-RFLP, obtidos de uma única amostra, além da análise estatística dos resultados e agrupamento de amostras com base em semelhanças e diferenças (SHYU et al., 2007).

TReFID é um software instalável que contém três bancos de dados com resultados de análises de fragmentos terminais de restrição de múltiplas digestões por enzimas de restrição para os genes 16S rRNA, dinitrogenase redutase (*nifH*) e redutase o óxido nitroso (*nosZ*), permitindo criar listas de espécies, com bases nos dados de T-RFLP em complexas comunidades microbianas (ROSCH; BOTHE, 2005).

TRF-CUT trata-se de um módulo integrado ao software ARB, programa baseado em UNIX que fornece ferramentas para analisar grandes bancos de dados de rRNA. Este módulo foi desenvolvido para prever os fragmentos terminais de restrição dos genes rRNA alinhados ou sequências de genes funcionais, selecionando enzimas de alta resolução filogenética (PEVSNER, 2009; RICKE; KOLB; BRAKER, 2005).

TRAMPR é um pacote para linguagem R com objetivo de combinar polimorfismo de tamanhos de fragmentos terminais de restrição entre amostras desconhecidas e uma base de dados com espécies conhecidas (FITZJOHN; DICKIE, 2007). Ademais, o TRiFLe, escrito e executado em ambiente JAVA e com a mesma funcionalidade do TRAMPR, permite a especificação de qualquer tipo de gene, *primers* e enzimas de restrição (JUNIER; JUNIER; WITZEL, 2008).

TRF-PRED possui as mesmas funções que os programas citados anteriormente, além de utilizar facilmente as sequências do gene 16S rRNA disponíveis nos repositórios públicos como o RDP ou SILVA. A vantagem, em relação aos outros, é que o programa pode trabalhar com grandes conjuntos de sequências completas ou parciais, e também, é projetado para explorar todo o potencial de perfis de T-RFLP e seu uso na descrição das comunidades procarióticas (FERNANDEZ-GUERRA et al., 2010).

### 3 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um conjunto de ferramentas computacionais para análise de sequências do gene ribossômico 16S disponíveis na base de dados SILVA, simulando a técnica de T-RFLP, com especificações definidas pelo usuário.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um algoritmo, para PCR *in silico*, que realize a construção de uma biblioteca de *amplicons* identificados com os valores seus tamanhos, a partir de um banco de dados contendo sequências do gene 16S rDNA, e que salve os resultados em arquivos de planilha eletrônica organizados por pares de *primers* F e R.
- Desenvolver um algoritmo para T-RFLP *in silico*, que realize a construção de uma biblioteca de *amplicons*, com os respectivos fragmentos terminais de extremidade 5' e 3', a partir de um banco de dados contendo sequências do gene 16S rDNA; e que salve os resultados em arquivos de planilha eletrônica, organizados por *primers* e enzimas de restrição;
- Testar os algoritmos com os *primers* e enzimas mais utilizados em estudos com o gene 16S rDNA, no banco de dados provenientes do SILVA.
- Verificar quais configurações (*primers* e enzima) permitem um maior numero de resultados observados na análise de PCR e T-RFLP *in silico* do banco de dados provenientes do SILVA.

## REFERÊNCIAS

AABY, A. A. **Software: a fine art**. 2004.

ACINAS, S. G. et al. Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 9, p. 2629-2635, 2004.

AGGARWAL, P. Bisto-Primer-Tool to design and validate specific PCR primer pairs for phylogenetic analysis. (**Master's Theses of Science**) Marquette University, England, 2011.

ALVES, S. M. A bioinformática e sua importância para a biologia molecular. **REBES**, v. 4, p.18-25, 2013.

APPLIED BIOSYSTEMS. Terminal Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) Analysis on Applied Biosystems Capillary Electrophoresis Systems. **Application Notes**. 2005. Disponível em <<http://www.appliedbiosystems.com/>>. Acesso em 20 de janeiro de 2014.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. **Biochemistry**. New York: WH Freeman. 5a ed., 2002.

BORAH, P. Primer designing for PCR. **Science Vision**, v. 3, n. 11, p. 134-136, jul. 2011.

CAFFARO-FILHO, R. A.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; DURRANT, L. R. Quantitative analysis of Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) microbial community profiles: peak height data showed to be more reproducible than peak area. **Braz. J. Microbiol.**, v. 4, n. 38, p. 736-738, 2007.

COLLINGBOURNE, H. **The little book of Ruby**. Dark Neon, 2006. Tradução de Francisco de Oliveira. São Paulo: Sismicro Informática. Disponível em <<http://www.sismicro.com.br>>. Acesso em 20 de agosto de 2013.

COX, M. M.; DOUDNA, J. A.; O'DONNELL, M. **Biologia Molecular: Princípios e Técnicas**. Porto Alegre: Artmed, 2012.

DALE, J. W.; PARK, S. F. **Molecular Genetics of Bacteria**. 4th. Chichester-UK: John Wiley & Sons, 2004.

DICKIE, I. A.; FITZJOHN, R. G. Using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) to identify mycorrhizal fungi: a methods review. **Mycorrhiza**, v. 17, n. 4, p. 259-270, 2007.

DORAK, M. T. **Real-time PCR**. Taylor & Francis, 2007.

DUDLEY, J. T.; BUTTE, A. J. A Quick Guide for Developing Effective Bioinformatics Programming Skills. **PLoS Comput Biol**, v. 5, n. 12, 24 dez. 2009.

FERNANDEZ-GUERRA, A. et al. TRFPred: a nucleotide sequence size prediction tool for microbial community description based on terminal-restriction fragment length polymorphism chromatograms. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 262, 2010.

FITZJOHN, R. G.; DICKIE, I. A. TRAMP: AN R package for analysis and matching of terminal-restriction fragment length polymorphism (TRFLP) profiles. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 4, p. 583-587, 1 jul. 2007.



FLANAGAN, D.; MATSUMOTO, Y. **The ruby programming language**. Sebastopol: O'Reilly Media, Inc., 2008.

FREDRIKSSON, N. J.; HERMANSSON, M.; WILÉN, B. The choice of PCR primers has great impact on assessments of bacterial community diversity and dynamics in a wastewater treatment plant. **PLoS one**, v. 8, n. 10, p. e76431, 2013.

HUNT, L. T. Margareth O. Dayhoff 1925-1983. **DNA** v. 2, n. 2, p.97-98, 1983.

JR, D. **Guia de consulta rápida PERL**. São Paulo: Novatec Editora, 2000.

JUNIER, P.; JUNIER, T.; WITZEL, K. -P. TRiFLe, a program for in silico terminal restriction fragment length polymorphism analysis with user-defined sequence sets. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 74, n. 20, p. 6452-6456, out. 2008.

KARL, D. M. Microbial oceanography: paradigms, processes and promise. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 10, p. 759-769, 2007.

KOPECKÝ, J.; NOVOTNÁ, G.; SÁGOVÁ-MARECKOVÁ, M. Modification of the terminal restriction fragment length polymorphism analysis for assessment of a specific taxonomic group within a soil microbial community. **Plant Soil Environ.**, v. 55, n. 9, p. 397-403, 2009.

LANE, D. J. et al. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, n. 20, p. 6955-6959, 1985.

LEJA, D. Polymerase Chain Reaction – PCR. **National Human Genome Research Institute**. Disponível em <[http://www.genome.gov/Glossary/resources/polymerase\\_chain\\_reaction.pdf](http://www.genome.gov/Glossary/resources/polymerase_chain_reaction.pdf)>. Acesso em 20 de janeiro de 2014.

LESK, A. M. **Introdução à Bioinformática**. Porto Alegre: Artmed, 2008.

LIU, W. T. et al. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4516-4522, 1997.

MAIDAK, B. L. et al. The RDP (ribosomal database project). **Nucleic acids research**, v. 25, n. 1, p. 109-110, 1997.

MCPHERSON, M.; MØLLER, S. **PCR**. Garland Science, 2007.

MOUNT, D. W. **Bioinformatics: Genome and Sequence Analysis**. 2004.

OTTO, T. D. et al. A plataforma PDTIS de bioinformática: da sequência à função. **R. Eletr. de Com. Inf. Inov. Saúde**. v. 1, n. 2, sup. 1, jul.-dez., 2007.

OVERMANN, J.; COOLEN, M. J. L.; TUSCHAK, C. Specific detection of different phylogenetic groups of chemocline bacteria based on PCR and denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA gene fragments. **Archives of microbiology**, v. 172, n. 2, p. 83-94, 1999.

PATEL, J. B. et al. Sequence-based identification of Mycobacterium species using the Microseq 500 16S rDNA bacterial identification system. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 246-251, 2000.

PEVSNER, J. **Bioinformatics and Functional Genomics**. 2nd. New Jersey: John Wiley & Sons, 2009.

RICKE, P.; KOLB, S.; BRAKER, G. Application of a newly developed ARB software-integrated tool for in silico terminal restriction fragment length polymorphism analysis reveals the dominance of a novel pmoA cluster in a forest soil. **Appl. Environ Microbiol.**, v. 71, n. 3, p. 1671-1673, mar 2005.

ROSCH, C.; BOTHE, H. Improved assessment of denitrifying, N<sub>2</sub>-fixing, and total-community bacteria by terminal restriction fragment length polymorphism analysis using multiple restriction enzymes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 4, p. 2026-2035, abr. 2005.

SCHUTTE, U. et al. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 80, n. 3, p. 365-380, set. 2008.

SHAH, N. et al. Comparing Bacterial Communities Inferred From 16S rRNA Gene Sequencing and Shotgun Metagenomics. **Pacific Symposium on Biocomputing**, v. 16, p.165-176, 2011. Disponível em <<http://psb.stanford.edu/psb-online/proceedings/psb11/>> Acesso em 28 de fevereiro de 2014.

SHYU, C. et al. MiCA: a web-based tool for the analysis of microbial communities based on terminal-restriction fragment length polymorphisms of 16S and 18S rRNA genes. **Microb. Ecol.**, v. 53, n. 4, p. 562-570, mai. 2007.

STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F. A.; WARD-RAINEY, N. L. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. **International journal of systematic bacteriology**, v. 47, n. 2, p. 479-491, 1997.

STRALIS-PAVESE, N. et al. 16S rRNA based T-RFLP analysis of methane oxidising bacteria - Assessment, critical evaluation of methodology performance and application for landfill site cover soils. **Applied Soil Ecology**, v. 31, p. 251-266, 13 mai. 2005.

WANG, Y.; QIAN, P.Y. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, p. e7401, 9 out. 2009.

WEISBURG, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

XIONG, J. **Essential Bioinformatics**. New York: Cambridge University Press, 2006.

ZHANG, L. et al. Functional genetic selection of the decoding center in E. coli 16S rRNA. In: **Nucleic acids symposium series**. Oxford University Press, p. 319-320, 2003.

## CAPÍTULO I

**OneSix: ferramenta computacional para análise T-RFLP *in silico* do gene ribossômico 16S.**

## ONESIX: FERRAMENTA COMPUTACIONAL PARA ANÁLISE T-RFLP IN SILICO DO GENE RIBOSSÔMICO 16S.

SILVA, P. A. A.; SAITO, D.; FANTIN, C.;

Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus.

### Resumo

Técnicas de *fingerprinting* genético e abordagens independentes de cultivo têm sido largamente utilizadas para se avaliar a diversidade de comunidades microbianas em diversos ambientes. No entanto, a determinação da composição de espécies presentes nessas comunidades não é tarefa simples, normalmente requerendo ensaios caros e laboriosos. Nesse contexto, a técnica de T-RFLP (*Terminal restriction fragment length polymorphism*), utilizada para se determinar a estrutura de comunidades microbianas complexas pela análise de polimorfismos de fragmentos de restrição de DNA, constitui uma ferramenta prática, robusta e confiável. A predição taxonômica de fragmentos terminais de restrição (T-RFs) pode ser alcançada utilizando-se sequências de 16S rDNA de bactérias presentes na *world wide web* (www). Assim, foi desenvolvido um conjunto de ferramentas computacionais, denominado OneSix, para análise T-RFLP *in silico* de sequências presentes em bancos de dados de domínio público. Para tanto, foram conduzidas a amplificação por PCR (*Polymerase chain reaction*) e a digestão *in silico* de sequências de 16S rDNA curadas, presentes no sítio SILVA, utilizando-se as sequências de 11 *primers forward*, 10 *primers reverse* e 13 enzimas de restrição, comumente utilizados na técnica de T-RFLP. Os algoritmos foram desenvolvidos na linguagem de programação Ruby, devido a uma vasta classe de métodos e pacotes voltados à bioinformática, o Bioruby; e testados ao simular a técnica de PCR, resultando em 81 arquivos e T-RFLP, em 1053 arquivos. O OneSix pretende facilitar o processo de predição taxonômica de T-RFs por pesquisadores da área, através da geração de dados abrangentes e pertinentes à realidade da técnica de T-RFLP.

### INTRODUÇÃO

Ao longo dos últimos anos, observa-se um maior interesse no desenvolvimento de bibliotecas que possam relacionar o tamanho dos fragmentos resultados das análises de T-RFLP com a espécie, permitindo o aumento da resolução de questões de estudos com as comunidades microbianas e diminuição dos erros nas comparações realizadas (HIRAISHI; IWASAKI; SHINJO, 2000).

Apesar das linguagens de programação Perl e Python, tradicionalmente, serem mais utilizadas no campo da bioinformática, a linguagem de programação Ruby, surge como uma forte opção para realizar operações poderosas de cadeia de texto utilizando expressões regulares (FLANAGAN, MATSUMOTO, 2008). Para o desenvolvimento de ferramentas

computacionais que manipulem sequências de DNA, que são tratadas como conjuntos de caracteres, é necessária uma linguagem de programação com sintaxe simples e consistente, tal como Ruby. Esta linguagem é dinâmica e possui uma gramática complexa, porém, apresenta uma expressiva biblioteca de classes que interagem de forma rica e poderosa com seus objetos (FLANAGAN; MATSUMOTO, 2008)

A linguagem Ruby permite a utilização da biblioteca de classes Bioruby, que é um software livre e de código aberto, capaz de analisar sequências de DNA e RNA, modelagem de proteínas, análise filogenética, entre outras aplicações voltadas para bioinformática e biologia molecular (GOTO et al., 2010).

Geralmente, os fragmentos terminais de restrição provindos de ensaios experimentais são comparados com um conjunto de sequências existentes. No entanto, quando os organismos produzem fragmentos com tamanhos idênticos, esta comparação pode ser imprecisa, sendo essencial a utilização com várias enzimas. Sendo assim, a comparação de vários resultados destes experimentos com conjuntos de sequências com informações pré-analisadas de um banco de dados completo com as sequências dos genes 16S rDNA, pode contribuir para uma análise e interpretação dos dados T-RFLP, tornando-as mais rápidas e confiáveis (KITTS, 2001).

Atualmente, um dos principais bancos de dados de sequências do gene 16S rDNA, SILVA, possui mais de quatro milhões de entradas (QUAST et al., 2012). Para manipular essa quantidade crescente de dados, ferramentas *in silico* tornam-se necessárias para o projeto de *primers* específicos, bem como a simulação das técnicas moleculares que utilizam as sequências para inferência taxônomica de microrganismos (LUDWIG et al., 2004; MÜHLING et al., 2008).

Com intuito de superar as dificuldades causadas por ferramentas computacionais desatualizadas ou complexas em sua utilização, foi desenvolvido um algoritmo para as análises por T-RFLP *in silico*, permitindo a especificação de qualquer *primer* e enzima de restrição, bem como a definição do arquivo contendo as sequências a serem analisadas.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 FERRAMENTAS DE DESENVOLVIMENTO**

O projeto OneSix foi concebido utilizando as classes do software Bioruby, que oferece uma extensa série de funcionalidades comparáveis a outros softwares tais como BioPerl (STAJICH et al., 2002), Biopython (COCK et al., 2009) e BioJava (HOLLAND et al., 2008).

Para a escrita do algoritmo, foi escolhida a linguagem de programação Ruby, versão 1.9.3. A escolha desta versão se deu pela compatibilidade do Bioruby, uma biblioteca online que possui um conjunto de métodos e procedimentos programados voltados para bioinformática. A versão mais atual 2.2.2 não é compatível com a programação do Bioruby. A linguagem Ruby é instalada através de um instalador executável, conforme orientação por sistema operacional, tais informações para download e instalação pode ser obtido no endereço eletrônico <<http://rubyinstaller.org/downloads>>.

O Bioruby está disponível no endereço eletrônico <<http://www.bioruby.org>>. Sua instalação é realizada através do comando executado no prompt do MS-DOS: gem install bio.

O ambiente de desenvolvimento integrado, que permitiu o desenvolvimento dos algoritmos, foi o software Rubymine versão 6.3.3, disponível no endereço eletrônico <<https://www.jetbrains.com/ruby/download>>. Este programa através do suporte ao Ruby, permite uma programação mais rápida e eficiente. Além de permitir que os testes de implementação sejam executados em tempo real. Em relação ao equipamento para o desenvolvimento, foi utilizado um computador com processador de 3 GHz, memória RAM de 4 gigabytes e sistema operacional Microsoft Windows 8.1.

## 2.2 CLASSES DO BIORUBY

Segundo Pressman (2011), as classes contêm atributos, que são as características dos objetos, e métodos, que informa uma determinada ação para os objetos. Na linguagem Ruby, tudo é considerado um objeto, desde um simples número inteiro até uma cadeia de caracteres (COLLINGBOURNE, 2006).

A biblioteca de classes do Bioruby foi utilizada em determinadas ações dentro dos algoritmos de análise. Dentre elas, destacam-se:

- Bio::Sequence: classe utilizada para criar objetos de sequências de nucleotídeos e aminoácidos. Contém métodos que manipulam as sequências criadas, incluindo a utilização de expressões regulares, forma concisa e flexível de identificação e manipulação de cadeias de caracteres de interesse.
- Bio::RestrictionEnzyme: contém métodos que permitem fragmentar uma sequência de DNA usando uma ou mais enzimas de restrição.
- Bio::FastaFormat: contém métodos que convertem sequências e entrada de dados em formato FASTA, para manipulação posterior.

- Bio::FlatFile: contém métodos para ler arquivos de dados biológicos, detectando automaticamente o seu formato.

## 2.3 ALGORITMO E TESTES

O desenvolvimento do algoritmo OneSix ocorreu em duas etapas: elaboração do fluxo de atividades (Anexo A e B) e do algoritmo para amplificação por PCR *in silico* (Anexo C) e do algoritmo para digestão dos resultados anteriores com enzimas de restrição (T-RFLP *in silico*) (Anexo D); baixar as sequências do gene 16S rRNA do SILVA e usar os algoritmos programados.

### 2.3.1 Parâmetros do Algoritmo

Para o teste dos algoritmos, as listas de *primers Forward* (F) (Tabela 1) e *Reverse* (R) (Tabela 2), foram compostas por aqueles mais utilizados em estudos com o gene 16S rDNA. No entanto, novas sequências de *primers* poderão ser adicionadas, ou especificadas manualmente.

Tabela 1. Lista de *Primers Forward* para teste dos algoritmos

<i>Primer F</i>	Sequência do <i>Primer 5'-3'</i>	Referência(s)
8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Reysenbach & Pace (1995); Baker; Smith; Cowan (2003)
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Baker; Smith; Cowan (2003); Hongoh; Ohkuma; Kudo (2003)
63F	CAGGCCTAACACATGCAAGTC	Marchesi et al (1998)
341F	CCTACGGGAGGCAGCAG	Watanabe; Kodama; Harayama (2001), Muyzer et al. (1998)
343F	TACGGRAGGCAGCAG	Nossa et al. (2010)
517F	GCCAGCAGCCGCGGTAA	Wang; Qian (2009)
786F	GATTAGATACCCTGGTAG	Baker; Smith; Cowan (2003)
917F	GAATTGACGGGRCCC	Wang; Qian (2009)
968F	AACGCGAAGAACCTTAC	Zoetendal et al. (2002)
1055F	ATGGCTGTCGTCAGCT	Harms et al. (2003)
1099F	GYAACGAGCGCAACCC	Nossa et al. (2010)

Tabela 2. Lista de *Primers Reverse* para teste dos algoritmos

<i>Primer R</i>	Sequência do <i>Primer 5'-3'</i>	Referência
518R	ATTACCGCGGCTGCTGG	Muyzer et al. (1998)
536R	GWATTACCGCGGCKGCTG	Yoon; Lee; Park (1998)
806R	GGACTACCAGGGTATCTAAT	Huws et al. (2007)
907R	CCGTCAATTCMTTGTGAGTTT	Lane et al. (1985); Muyzer et al. (1998)
926R	CCGTCAATTCCTTTRAGTTT	Reysenbach; Pace (1995); Baker; Smith; Cowan (2003)
939R	CTTGTGCGGGCCCCGTCAATTC	Rudi et al. (1997); Baker; Smith; Cowan (2003); Huws et al. (2007)
1387R	CCCGGGAACGTATTCACCGC	Muyzer et al. (1998)
1389R	ACGGGCGGTGTGTACAAG	Liu et al. (1997); Fisher et al. (2007)
1406R	ACGGGCGGTGTGTRC	Lane (1991)
1492R	GYTACCTTGTTACGACTT	Lane (1991)

Em alguns casos, a sequência do *primer* não complementa perfeitamente na sequência molde, resultando em *mismatch*. No entanto, a região próxima a extremidade 3' precisa que o emparelhamento seja perfeito para que a enzima DNA-polimerase inicie a hibridação com a sequência alvo corretamente, a partir do final do *primer* (DORAK, 2007). Porém, para que a estabilidade e especificidade da reação PCR não seja afetada potencialmente, recomenda-se que cinco bases da extremidade 3' complementem perfeitamente (DORAK, 2007; STADHOUDERS et al., 2010; WU; HONG; LIU, 2009).

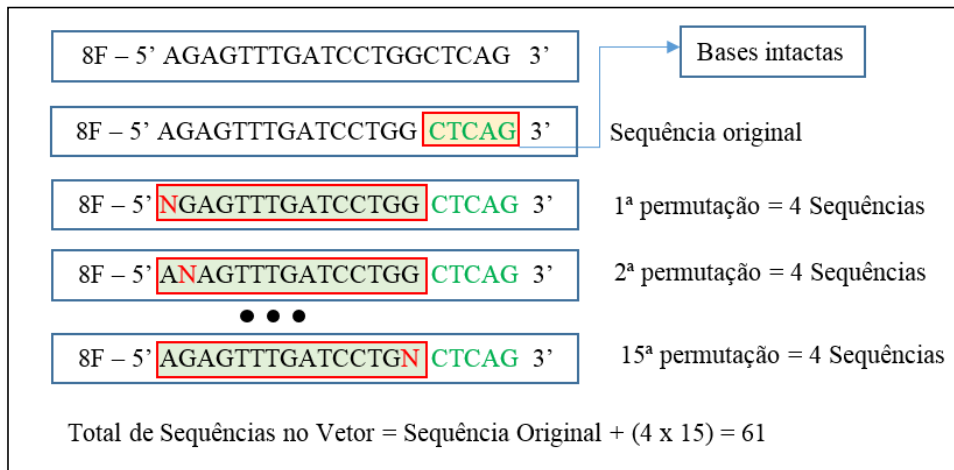
Considerando a possível incompatibilidade ou *mismatch* entre o *primer* e a sequência de DNA modelo, a sensibilidade dos *primers* foi configurada mantendo uma zona de segurança na região 3' de cada *primer* com cinco bases intactas. E nas bases restantes próximas a extremidade 5', foi desenvolvido um algoritmo que converteu as sequências dos *primers* em expressão regular.

As sequências resultantes do ajuste de sensibilidade foram armazenadas em um vetor. De acordo com Sebesta (2011), vetores são caracterizados por serem uma variável que armazena várias variáveis de mesmo tipo.

Além da zona de segurança, foi especificada um *mismatch* em cada base, permitindo mais sequências a serem pesquisadas no banco de dados. Como por exemplo (Figura 1), 15 bases estão fora da zona de segurança, ao permutar com a base degenerada N (assumindo A, T, C ou G), permitia um vetor contendo 60 sequências (4 x 15 posições diferentes), além da sequência original.



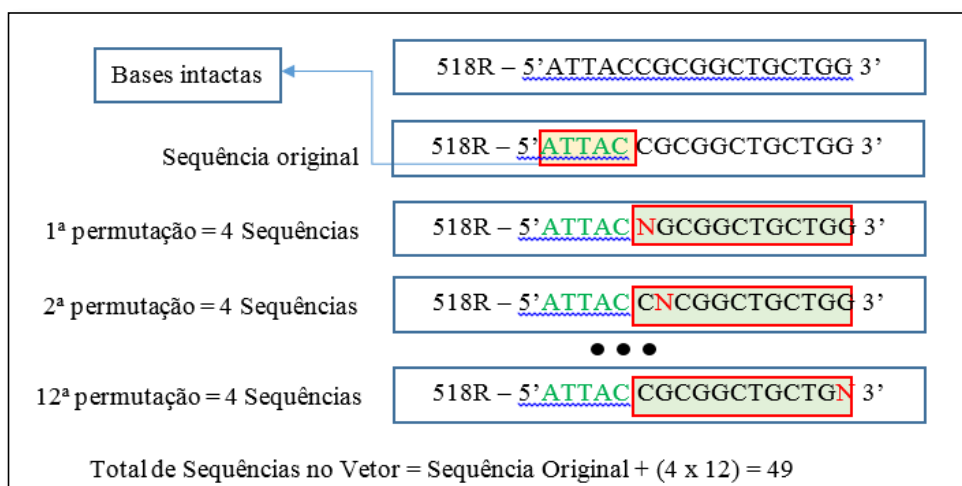
Figura 1. Permutação de bases do *primer Forward* pela base degenerada “N”.



Fonte: próprio autor.

Para os *primers R*, o mesmo princípio anterior é mantido como vemos no exemplo da Figura 2, porém, o armazenamento no vetor é realizado após aplicar o método “complement” da biblioteca Bioruby. Tal método é aplicado partindo da ideia de que todas as sequências 16S rDNA depositadas em banco de dados online obedecem à direção 5' - 3', sendo assim, o *complement* converte todo o texto em modo reverso, invertendo as posições dos caracteres, e trocando as bases pelos seus respectivos complementos (A por T / T por A e C por G / G por C). Esta ação permite pesquisar o *primer R* nas sequências contidas no banco de dados especificado, simulando a pesquisa como se fosse na outra fita de DNA.

Figura 2. Permutação de bases do primer Reverse pela base degenerada “N”.



Fonte: próprio autor.

As enzimas de restrição (Tabela 3) utilizadas para teste foram selecionadas a partir de estudos realizados com a técnica T-RFLP no gene 16S rDNA.

Para a digestão pelas enzimas de restrição da cadeia de caracteres resultantes da pesquisa com os *primers* F e R, foi utilizado o comando do Bioruby “cut\_with\_enzyme”.

Tabela 3. Lista de enzimas de restrição para teste do algoritmo T-RFLP in silico

Enzima de Restrição	Sequência de Reconhecimento 5'-3'	Referências
AluI	AG <sup>^</sup> CT	Liu et al. (1997); Edel-Hermann et al. (2004); Lal et al. (2011)
BamHI	G <sup>^</sup> GATCC	Lal et al. (2011)
BfaI	C <sup>^</sup> TAG	Lal et al. (2011)
EcoRI	G <sup>^</sup> AATTC	Lal et al. (2011)
HaeIII	GG <sup>^</sup> CC	Liu et al. (1997); Edel-Hermann et al. (2004); Lal et al. (2011)
HindIII	A <sup>^</sup> AGCTT	Lal et al. (2011)
DdeI	C <sup>^</sup> TNAG	Liu et al. (1997); Engebretson & Moyer (2003); Edel-Hermann et al. (2004);
MspI	C <sup>^</sup> CGG	Liu et al. (1997); Engebretson & Moyer (2003); Edel-Hermann et al. (2004); Lal et al. (2011)
TaqI	T <sup>^</sup> CGA	Liu et al. (1997); Edel-Hermann et al. (2004);
RsaI	GT <sup>^</sup> AC	Liu et al. (1997); Edel-Hermann et al. (2004); Lal et al. (2011)
BstUI	CG <sup>^</sup> CG	Liu et al. (1997); Engebretson & Moyer (2003); Edel-Hermann et al. (2004);
Sau96I	G <sup>^</sup> GNCC	Engebretson & Moyer (2003)
HhaI	GCG <sup>^</sup> C	Liu et al. (1997); Edel-Hermann et al. (2004); Lal et al. (2011)

O tamanho das sequências dos *amplicons* e dos fragmentos gerados por T-RFLP é calculado através do método “size” incorporado na própria linguagem Ruby, que retorna o valor do comprimento de cadeia de caracteres.

A massa molecular dos fragmentos terminais foi calculada pelo método *molecular\_weight*, incorporado no Bioruby. Nativamente, esta biblioteca adota os valores caulados pelo componente do software BioPerl, o Bio::Tools::SeqStats.pm. Porém, o Bioruby não prevê a massa molecular de bases degeneradas, somente das bases “A”, “T”, “C”, “G”, “U”. Logo, foi acrescentado no arquivo nativo *na.rb*, que contém métodos para tratamento de ácidos nucleicos, os valores médios de cada base degenerada, conforme descrito no Tabela 4.

Tabela 4. Valores adotados para cálculo da massa molecular, expressos em Daltons (da). (continua)

Biomolécula	Valor adotado (origem)
A	135,15 (nativo Bioruby)
T	126,13 (nativo Bioruby)
G	151,15 (nativo Bioruby)
C	111,12 (nativo Bioruby)
U	112,10 (nativo Bioruby)

Tabela 4. Valores adotados para cálculo da massa molecular, expressos em Daltons (da).  
(continuação)(conclusão)

Y [C/T]	118,63 (média)
R [A/G]	143,15 (média)
W [A/T]	130,64 (média)
S [G/C]	131,14 (média)
K [T/G]	138,64 (média)
M [A/C]	123,14 (média)
B [T/G/C]	129,47 (média)
D [A/T/G]	137,48 (média)
H [A/T/C]	124,13 (média)
Y [A/G/C]	132,47 (média)
N [A/T/C/G]	130,89 (média)
Fosfato - Desoxirribose	196,11 (nativo Bioruby)
Fosfato - Ribose	212,11 (nativo Bioruby)
Hidrogênio	1,00794 (nativo Bioruby)
Água	18,015 (nativo Bioruby)

### 2.3.2 Análises das sequências do gene 16S rDNA.

Para implementação inicial das ferramentas do OneSix, foi utilizado o banco de dados online SILVA SSU (*small subunit*) Referência (Ref) 122 Não Redundante (NR), disponível no sítio <<http://www.arb-silva.de>>, contendo 461.491 sequências do gene 16S rDNA do domínio Bacteria.

Para análise automática da técnica PCR e T-RFLP, dois algoritmos foram desenvolvidos (Anexo C e D), transformando a lista de vários *primers* F, R e enzimas de restrição em vetores, permitindo agilidade no processamento dos arquivos gerados.

A combinação de *primers* (Tabela 4) foi especificada conforme as posições relativas no gene 16S rDNA na bactéria *Escherichia coli*, permitindo, assim, 81 análises. Testes realizados com combinações onde o *primer* F, pela posição descrita em sua nomenclatura, era maior que o *primer* R, não geravam resultados. Logo, a combinação de *primers* baseada nas posições foi necessária.

Tabela 5. Lista de combinações de primers F e R para teste dos algoritmos. (continua)

<i>Primer</i> F	<i>Primers</i> R	Total de Análises = 81
8F	518R / 536R / 806R / 907R / 926R / 939R / 1387R / 1389R / 1406R / 1492R	10
27F	518R / 536R / 806R / 907R / 926R / 939R / 1387R / 1389R / 1406R / 1492R	10
63F	518R / 536R / 806R / 907R / 926R / 939R / 1387R / 1389R / 1406R / 1492R	10
341F	518R / 536R / 806R / 907R / 926R / 939R / 1387R / 1389R / 1406R / 1492R	10
343F	518R / 536R / 806R / 907R / 926R / 939R / 1387R / 1389R / 1406R / 1492R	10
517F	806R / 907R / 926R / 939R / 1387R / 1389R / 1406R / 1492R	8

Tabela 5. Lista de combinações de primers F e R para teste dos algoritmos. (continuação)(conclusão)

786F	907R / 926R / 939R / 1387R / 1389R / 1406R / 1492R	7
917F	1387R / 1389R / 1406R / 1492R	4
968F	1387R / 1389R / 1406R / 1492R	4
1055F	1387R / 1389R / 1406R / 1492R	4
1099F	1387R / 1389R / 1406R / 1492R	4

As melhores combinações de *primers* F e R para PCR *in silico* foram comparadas com resultados do software online TestPrime, disponível no sítio <[www.arb-silva.de](http://www.arb-silva.de)>, que permite a análise PCR testando *primers* F e R no banco de dados SSU RefNR 122. A mesma sensibilidade de *mismatch* utilizada no algoritmo de PCR *in silico* foi especificada no TestPrime.

Após os arquivos salvos, foi desenvolvido um algoritmo no *Microsoft Office Excel* (Excel), utilizando a linguagem de programação *Visual Basic for Applications* (VBA) para remover o código identificador da sequência, com intuito de manter somente a nomenclatura taxonômica.

A temperatura de anelamento dos *primers* que resultaram nos melhores resultados, para assim verificar a possibilidade de utilização dos pares, foi obtida através da biblioteca *probeBase – an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes* <<http://131.130.66.201/probebase/search.asp>>

### 3 RESULTADOS

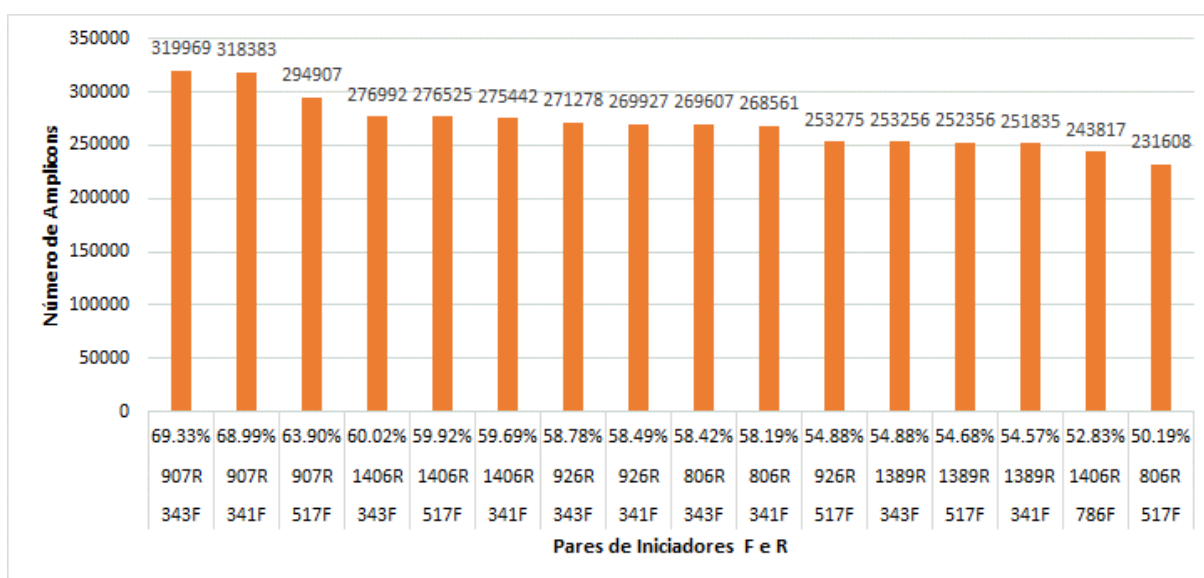
O resultado das análises, contendo informações como tamanho (número de bases nitrogenadas = caracteres) e massa molecular de cada fragmento terminal, além do cálculo da média de cada valor bem como o desvio padrão; estes resultados foram salvos em arquivos de planilha eletrônica do programa Excel, com o padrão de nomenclatura iniciado pelo banco de origem das sequências, *primers* e enzima de restrição utilizada (Exemplo: arb21052015.fasta\_8F\_27F\_EcoRI.xlsx). Tal extensão de arquivo só pode ser aberta em versões do Excel posteriores a 2010. Este formato de arquivo foi escolhido devido à facilidade na abertura de arquivos contendo muitos dados e ao tamanho ocupado em disco rígido. Inicialmente, foi escolhido o formato de arquivo texto separado por tabulação, porém, o tamanho ocupado era 10 vezes maior que o arquivo de extensão “xlsx”.

### 3.1 PCR *in silico*

O algoritmo para PCR *in silico* gerou 81 arquivos (1,8 Gigabytes) resumidos no Anexo E. O tempo médio de cada análise era de 30 minutos. Cada arquivo contém o identificador, a sequência e o tamanho do *amplicon* resultante de cada combinação de *primers*, a partir do arquivo do banco de dados SILVA SSU RefNR 122.

Para ilustração das melhores combinações de pares de *primers* (Figura 3), foram selecionados aqueles que obtiveram um total de *amplicons* acima de 50% ( $\approx 230.745$ ) do total de sequências (461.491) do banco de dados SILVA SSU RefNR 122, após tratamento pela algoritmo de remoção do identificador e remoção de valores duplicados.

Figura 3. Gráfico com as melhores combinações de pares de *primers* F e R, com total de *amplicons* resultantes acima de 50%



A comparação das melhores combinações com TestPrime foi realizada após toda a análise do algoritmo OneSix para PCR *in silico* utilizando os valores de antes (Figura 4) e após a remoção de valores duplicados integralmente (Figura 5). Esta comparação ocorreu em 01 de julho de 2015. Nessa data, o banco de dados SILVA SSU RefNR 122 continha 510.012 sequências.

Figura 4. Gráfico de comparação entre os resultados das melhores combinações de *primers* F e R, resultantes do OneSix (antes da remoção dos valores duplicados), e os resultados do TestPrime.

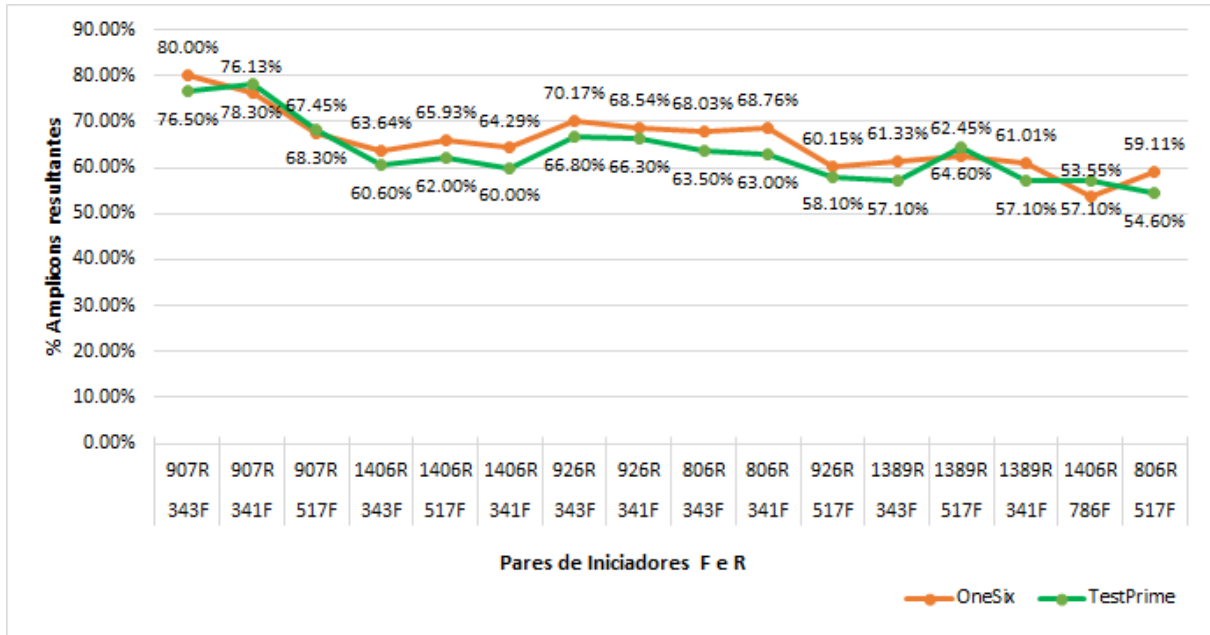
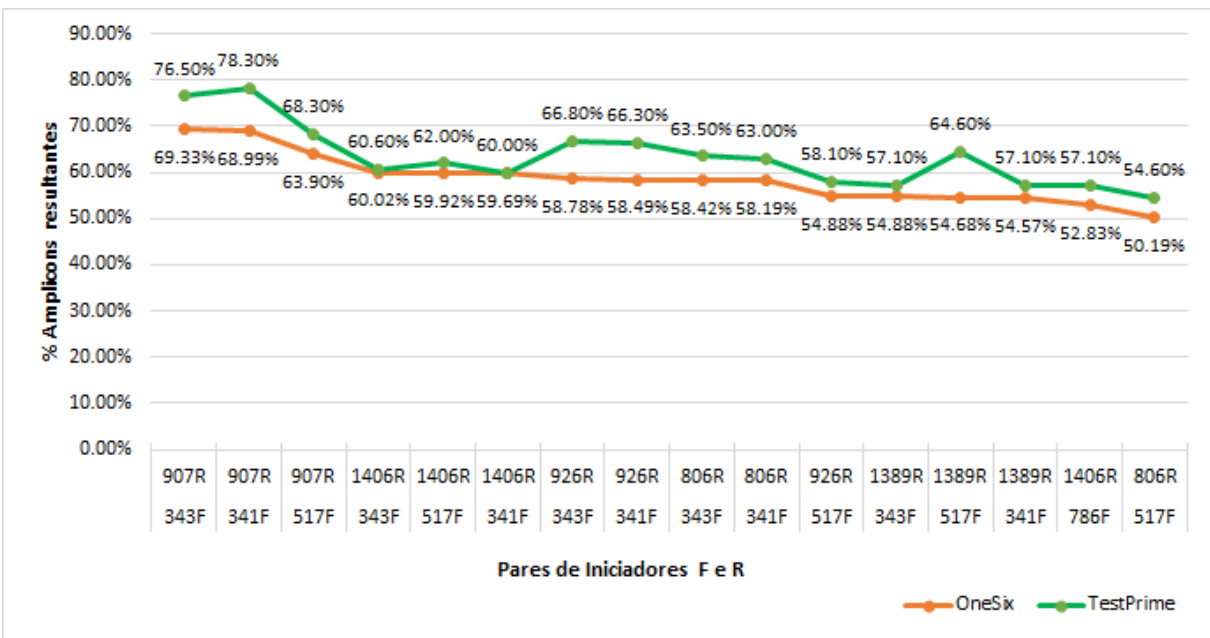


Figura 5. Gráfico de comparação entre os resultados das melhores combinações de *primers* F e R, resultantes do OneSix (após a remoção dos valores duplicados), e os resultados do TestPrime.



A partir da lista de combinações de *primers* com os melhores resultados, foram obtidas as temperaturas de anelamento no sítio probeBase (Tabela 6).

Tabela 6. Temperatura de anelamento dos *primers* selecionados obtidos da PCR in silico.

<i>Primer F</i>	Tm (°C)	<i>Primer R</i>	Tm (°C)
343F	46	907R	47
341F	54	907R	47
517F	54	907R	47
343F	46	1406R	51
517F	54	1406R	51
341F	54	1406R	51
343F	46	926R	47
341F	54	926R	47
343F	46	806R	50
341F	54	806R	50
517F	54	926R	47
343F	46	1389R	53
517F	54	1389R	53
341F	54	1389R	53
786F	42	1406R	51
517F	54	806R	50

Observamos que o *primer* 917F com todas as combinações de *primers* R conseguiu amplificar um total de sequências que varia de 0,23 a 0,57% do total de sequências do banco de dados (Tabela 7). As médias dos tamanhos dos amplicons correspondem às possíveis ampliações por estes *primers* conforme suas posições relativas a *E. coli*.

Tabela 7. Combinações de *primers* F e R com poucos resultados (abaixo de 1% do total de sequências)

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	Total Amplicons	%	Média do Tamanho dos <i>Amplicons</i>
917F	1406R	2613	0.57	488.0115 ± 9.0381
917F	1389R	2138	0.46	488.0674 ± 9.3339
917F	1387R	2106	0.46	470.3628 ± 9.3552
917F	1492R	1062	0.23	591.5320 ± 8.9514

A comparação dessas combinações de *primers* com resultados inferiores a 0,57%, também foi comparada com o TestPrime em mesma data, utilizando valores de antes (Figura 6) e após a remoção de valores duplicados integralmente (Figura 7).

Figura 6. Gráfico de comparação entre as combinações de *primers* F e R, com resultados inferiores a 0,57%, resultantes do OneSix (antes da remoção de valores duplicados), e os resultados do TestPrime.

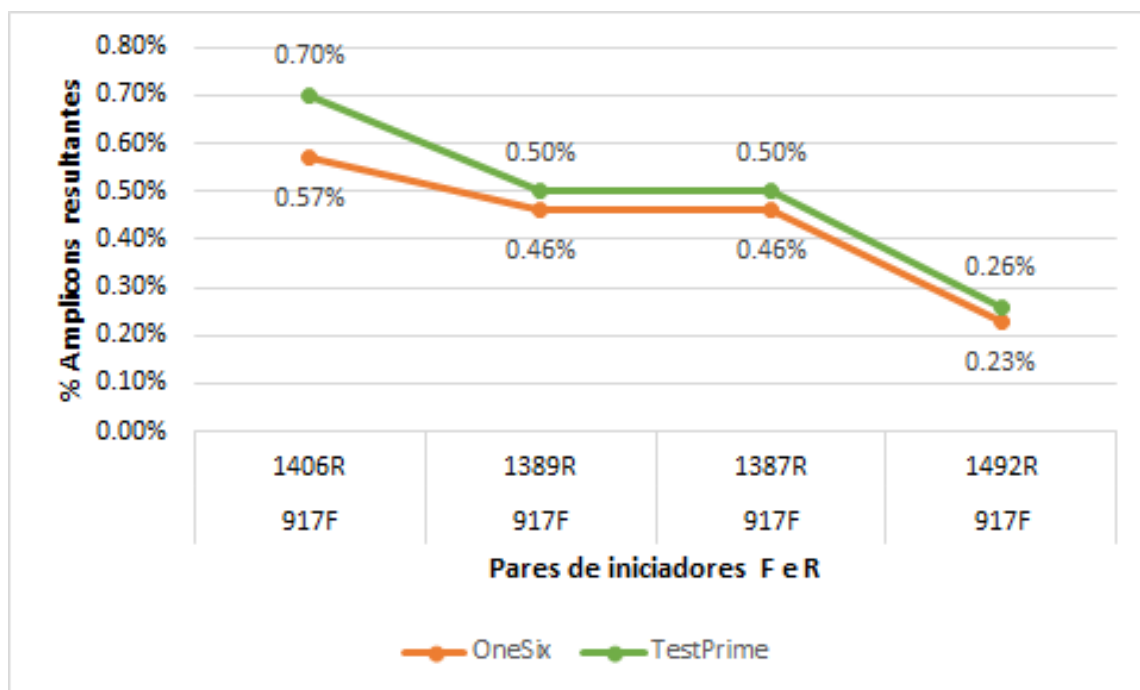
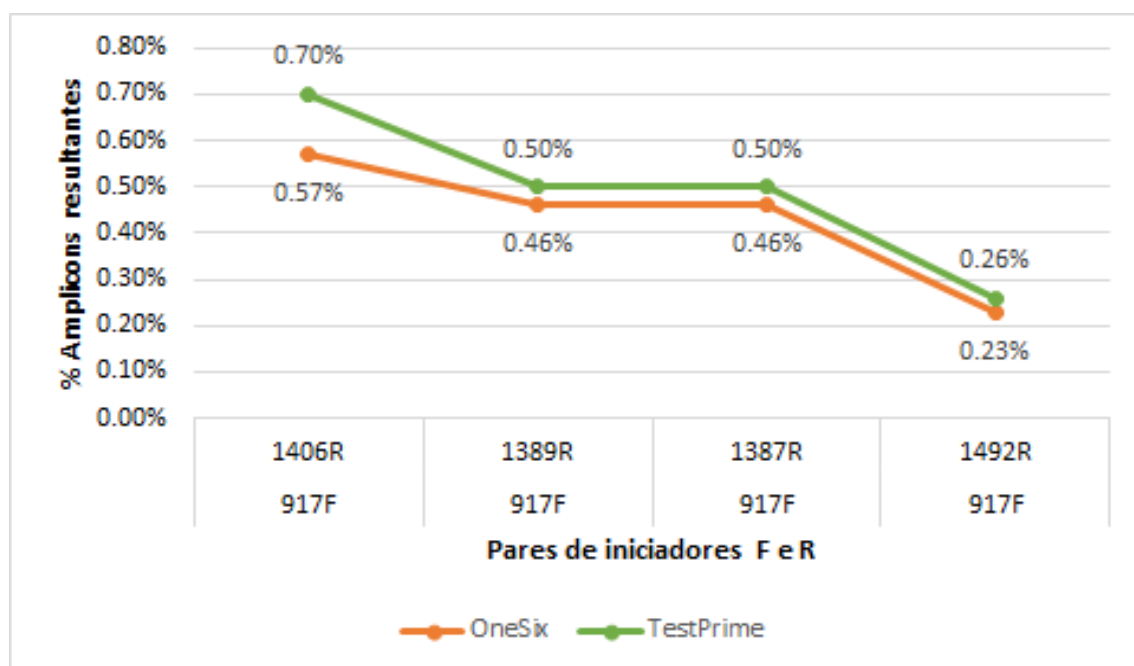


Figura 7. Gráfico de comparação entre as combinações de *primers* F e R, com resultados inferiores a 0,57%, resultantes do OneSix (após a remoção de valores duplicados), e os resultados do TestPrime.



Em cada arquivo, resultado da análise com os *primers* F e R, o campo identificador é obtido a partir do banco de dados SILVA SSU RefNR 122 e sua sintaxe é descrita da seguinte



forma: domínio; filo; classe; ordem; família; gênero; espécie. Como por exemplo: “bacteria; thermotogae; thermotogae; thermotogales; thermotogaceae; fervidobacterium; thermopallium natronophilum”.

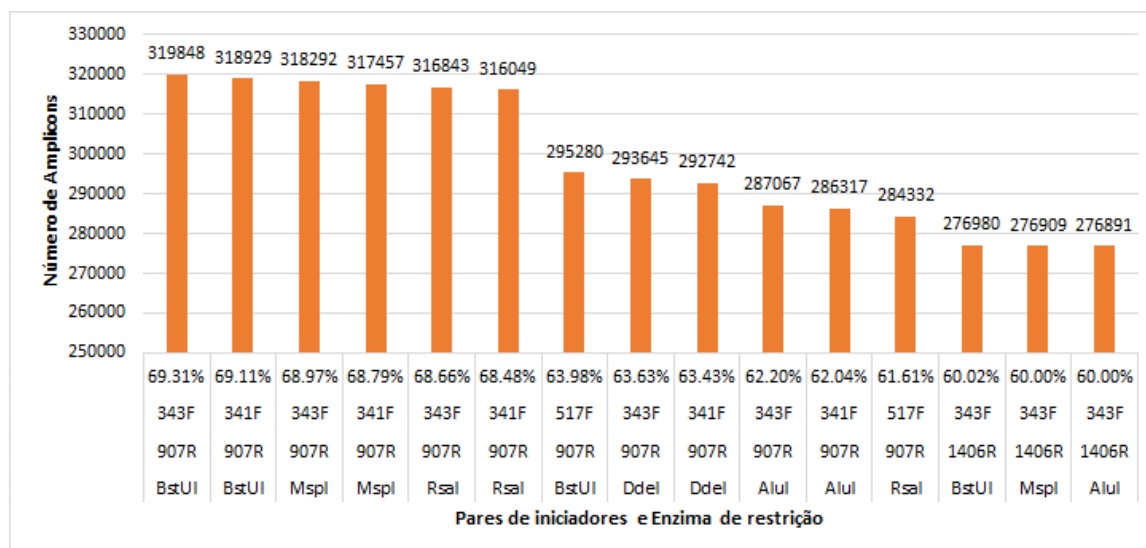
### 3.2 T-RFLP *in silico*

O algoritmo para T-RFLP *in silico* gerou 1053 arquivos (25 Gigabytes), resumidos na no Anexo H. Cada análise foi concluída em tempo médio de 1,5 hora. Cada arquivo, contém o identificador, a sequência e o tamanho do *amplicon* resultante de cada combinação de *primers*, e a partir do arquivo do banco de dados SILVA SSU RefNR 122, a sequência, o tamanho e a massa molecular do fragmento da extremidade 5’; bem como a sequência, o tamanho e a massa molecular do fragmento da extremidade 3’.

Para utilização dos dados contidos nos arquivos resultantes o usuário poderá comparar os resultados *in vivo* com os filtros disponibilizados pelo Excel em cada coluna. Sendo assim, permite a comparação do tamanho e massa molecular de fragmentos da extremidade 5’ e 3’.

Devido à expressiva quantidade de arquivos resultantes, e por questão representativa das melhores combinações, foram selecionados aqueles com pares de *primers* que obtiveram um total de *amplicons* acima de 60% ( $\approx 276.891$ ) do total de sequências (461.491) do banco de dados SILVA SSU RefNR 122 (Figura 8), após tratamento pela macro de remoção do identificador e remoção de valores duplicados.

Figura 8. Gráfico com as melhores combinações de pares de *primers* F e R, com total de *amplicons* resultantes acima de 60%



A partir da lista de combinações de *primers* com os melhores resultados da T-RFLP *in silico*, foram obtidas as temperaturas de anelamento no sitio probeBase (Tabela 8).

Tabela 8. Temperatura de anelamento dos *primers* selecionados obtidos da PCR *in silico*.

<i>Primer</i> F	Tm (°C)	<i>Primer</i> R	Tm (°C)	Enzima de Restrição
343F	46	907R	47	BstUI
341F	54	907R	47	BstUI
343F	46	907R	47	MspI
341F	54	907R	47	MspI
343F	46	907R	47	RsaI
341F	54	907R	47	RsaI
517F	54	907R	47	BstUI
343F	46	907R	47	DdeI
341F	54	907R	47	DdeI
343F	46	907R	47	AluI
341F	54	907R	47	AluI
517F	54	907R	47	RsaI
343F	46	1406R	51	BstUI
343F	46	1406R	51	MspI
343F	46	1406R	51	AluI

Verificamos um tamanho médio de fragmento da extremidade 5' de 10 pb para as análises com a enzima *HhaI* junto com *primer* 1099F e a enzima *Sau961* com o *primer* 917F; e 16pb para as análises com a enzima *DdeI* junto com os *primers* 8F e 27F, todos os resultados com desvio padrão nulo (Tabela 9).

Tabela 9. *Primers* F com tamanho médio do fragmento da extremidade 5' menor que o tamanho do próprio *primer*. E também, apresentando desvio padrão nulo.

<i>Primer</i> F	Enzima de Restrição	Tamanho Fragmento 5' (Média)
1099F	<i>HhaI</i>	10.0000 ± .0000
27F	<i>DdeI</i>	16.0000 ± .0000
8F	<i>DdeI</i>	16.0000 ± .0000
917F	<i>Sau961</i>	10.0000 ± .0000

Também foi observado o tamanho médio do fragmento da extremidade 3' menor que o tamanho do *primer* R relacionado, além do desvio padrão nulo, em todos os *primers* F com as seguintes combinações de *primers* R e enzima de restrição: 1389R-*RsaI*; 939R-*HaeIII*; 1387R – *MspI*; 536R-*BstUI* e 518R-*BstUI* (Tabela 10).

Tabela 10. *Primers R* com tamanho médio do fragmento da extremidade 3' menor que o tamanho do próprio *primer*. E também, apresentando desvio padrão nulo.

<i>Primer</i>	Enzima de Restrição	Tamanho Fragmento 3' (Média)
1389R	RsaI	13.0000 ± .0000
939R	HaeIII	10.0000 ± .0000
1387R	MspI	4.0000 ± .0000
536R	BstUI	9.0000 ± .0000
518R	BstUI	7.0000 ± .0000

Verificamos na PCR *in silico* que o *primer* 917F (Tabela 11) obteve poucos resultados combinados com todos os *primers R*, e no T-RFLP *in silico* este padrão é repetido. No entanto, vale salientar que as enzimas de restrição *HindIII*, *BamHI*, e *EcoRI*, combinadas com todos os *primers R* propostos para 917F, permitiram que estas análises ocupassem as últimas posições de sequências digeridas.

Tabela 11. Combinações de *primers F*, *R* e enzimas com poucos resultados, abaixo de 1% do total de sequências.

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	Enzima de Restrição	Nº de Sequências Digeridas	% de Sequências Digeridas
917F	1406R	HindIII	127	0.03%
917F	1492R	HindIII	76	0.02%
917F	1406R	BamHI	65	0.01%
917F	1406R	EcoRI	59	0.01%
917F	1389R	BamHI	56	0.01%
917F	1389R	EcoRI	54	0.01%
917F	1387R	BamHI	45	0.01%
917F	1389R	HindIII	40	0.01%
917F	1492R	EcoRI	34	0.01%
917F	1492R	BamHI	31	0.01%
917F	1387R	HindIII	23	0.004%
917F	1387R	EcoRI	11	0.002%

Uma comparação taxonômica quantitativa pode ser realizada, tanto para a análise PCR *in silico* (exemplo no Anexo F), quanto para a análise T-RFLP *in silico* (exemplo no Anexo G). Tal procedimento pode ser realizado no programa Microsoft Excel, através da importação de um arquivo de texto contendo somente os dados do campo identificador; esta ação permite a separação em colunas baseados no ponto e vírgula (“;”). Com os dados separados é possível

organizá-los dinamicamente em tabelas que contabilizam a quantidade conforme especificação, seja por espécie, gênero, família, ordem, classe, filo e domínio. No exemplo da tabela (x) e (y), os dados foram quantificados por Filo.

Analizamos o arquivo resultante das análises T-RFLP *in silico* com os fragmentos resultantes do estudo de composição e diversidade de comunidade microbiana de Wu et al. (2015), que utilizou o par de *primers* 27F-907R com as enzimas *MspI*, *HaeIII*, *RsaI* e *AluI*; além de compara com o banco de dados *Ribosomal Database Project*. Devido ao extenso número de resultados de cada enzima no estudo citado, selecionamos aleatoriamente cinco tamanhos de fragmentos com as respectivas identificações dos gêneros dos microrganismos de cada enzima e comparamos com os arquivos das combinações resultados de OneSix: 27F\_907R\_ *MspI*, 27F\_907R\_ *HaeIII*, 27F\_907R\_ *RsaI* e 27F\_907R\_ *AluI*. Selecionamos um gênero para representar os resultados, pois verificamos um mesmo tamanho para vários microrganismos (Tabela 12).

Tabela 12. Gêneros encontrados em Wu et al. (2015) e nos arquivos resultantes da T-RFLP *in silico* com os mesmos tamanhos de fragmentos 5'.

Gênero	<i>MspI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>RsaI</i>	<i>AluI</i>
Lactobacillus	29	67	58/918	271 / 273
Streptococcus	81	309	629	160
Thermomonospora	146	251	468 / 474	253 / 259
Salmonella	495	39	426	75
Nitrospira	612	264	167	245

#### 4 DISCUSSÃO

Embora nenhum par de *primers* sejam universais para todas as bactérias do mesmo gênero, diferentes pares podem ser avaliados e comparados para o estudo da estrutura da comunidade bacteriana (DORAK, 2007). Neste estudo, podemos observar que, a partir de um banco de dados contendo sequências do gene 16S rDNA não reduntantes, abrangendo a maior parte das bactérias identificadas atualmente, foi possível obter pares de *primers* para PCR e T-RFLP que podem ser direcionados para até 70% do total de sequências. E isto permite que o pesquisador possa utilizar as melhores combinações a fim de comparar e inferir o perfil taxonômico dos resultados de suas pesquisas, a partir de uma ampla variedade de resultados pré-analisados pelo OneSix.

A diferença encontrada (min. 0,31% e máx. 9,92%), ao comparar as melhores combinações de *primers* F e R da análise PCR *in silico* com os resultados do TestPrime após a remoção de valores duplicados, mostra a similaridade entre as duas ferramentas, como verificado na tendência das linhas do gráfico (Figura 5). O que pode ser verificado, também, na tendência dos valores antes da remoção de duplicatas, com uma diferença menor (min. 0,85% e máx. 5,76%) (Figura 4). Estas diferenças podem ser influenciadas pelo aumento do número e constante atualização das sequências depositadas no banco de dados SILVA, visto que a coleção de sequências RefNR é atualizada com sequências não redundantes.

Além disso, após a remoção do código identificador da sequência através de um algoritmo no Excel, foram constatados valores duplicados. E isto nos faz questionar se o banco de dados SILVA SSU da coleção RefNR é realmente isento de sequências não redundantes. Provavelmente, diferem-se entre si, apenas nos códigos dos identificadores das sequências.

Em comparação dos *primers* F e R na última posição, também foi observada a similaridade entre os resultados com diferença com valores antes (min. 0,01% e máx. 0,10%) e após a remoção de duplicatas (min. 0,03% e máx. 0,13%). Sendo assim, o comportamento dos algoritmos PCR e T-RFLP *in silico* similar ao de outra ferramenta comumente utilizada, garante a continuidade no aperfeiçoamento do OneSix.

Mesmo com resultados satisfatórios, a inferência da melhor combinação de *primers* pode não ser totalmente adequada para avaliar a adequação destes *primers* para um ambiente específico. Ademais, os pares de *primers* não podem possuir complementariedade em suas bases e devem anelar-se em temperaturas iguais ou próximas, com variação de até  $\pm 5^\circ \text{C}$  (VAN PELT-VERKUIL; VAN BELKUM; HAYS, 2008).

Na PCR *in silico*, os pares de *primers* 343F-907R, 341F-1406R, 517F-1406R, 341F-1406R, 343F-926R, 343F-806R, 341F-806R, 517F-1389R, 341F-1389R e 517F-806R apresentaram diferenças iguais ou inferiores a  $5^\circ \text{C}$  na temperatura de anelamento, logo podem ser caracterizados como possíveis combinações mais abrangentes no domínio Bacteria, dos *primers* F e R testados. Tal achado pode ser comparado com os estudos de Klindworth et al. (2012), quando avaliaram a cobertura de 512 pares de *primers* no banco de dados SILVA SSU RefNR 108 com 376.437 sequências, e concluíram que o par de *primers* SD-Bact-0341-BS-17 e SD-Bact-0785-AA-21 foram os mais promissores. Podemos verificar que o *primer* F SD-Bact-0341-BS-17 possui a mesma posição, no sistema de nomenclatura *Escherichia coli*, que o *primer* F do par 341F-1389R, que está entre os melhores pares deste estudo. No entanto, não era esperado que os resultados corroborassem totalmente, visto que não houve a

reprodutibilidade do estudo destes autores, devido a constante alteração do banco de dados utilizado e lista de *primers* diferentes.

Nos melhores resultados das análises de T-RFLP *in silico*, os pares de *primers* 343F-907R e 343F-1406R apresentaram diferenças iguais ou inferiores a 5° C na temperatura de anelamento. E as enzimas combinadas foram as *BstUI*, *MspI*, *RsaI*, *DdeI* e *AluI* para 343F-907R; e *BstUI*, *MspI* e *AluI* para o par 343F-1406R.

Os resultados de melhores combinações de pares de *primers*, tanto em PCR *in silico* quanto para T-RFLP *in silico*, mostram similaridade com os estudos de Soergel et al. (2012), ao testar 374 combinações de 22 *primers* F e 22 *primers* R em diversas amostras ambientais.

Nas análises de T-RFLP *in silico*, as combinações das enzimas *Sau96I* e *DdeI*; com os *primers* 1389R, 1406R e 1492R, ao final do processamento, apresentavam consumo total de memória RAM do computador. Tal fato foi observado em computadores de baixa, média e alta capacidade de processamento, descartando configurações de hardware. Estima-se que as bases degeneradas contidas nas enzimas *Sau96I* e *DdeI* influenciaram em um crescimento aritmético do consumo de memória, ao exigir muitas possibilidades de pesquisa para restrição dos *amplicons*.

Na tabela 9, verificamos um tamanho de fragmento da extremidade 5' menor (10 pb) que o tamanho do próprio *primer* 1099F (16pb). Como o algoritmo salva o fragmento terminal, percebemos que a enzima de restrição *HhaI* realizou a digestão dentro da sequência do *primer*. O mesmo acontece com o *primer* 917F (15pb) e a enzima *Sau96I*; e com os *primers* 8F e 27F com a enzima *DdeI*. Tal evento não permite a comparação dos fragmentos terminais com os *primers* F marcados, resultados de análises de ensaios experimentais, com os arquivos destas combinações de *primers* e enzimas de restrição.

O tamanho dos fragmentos da extremidade 3' das combinações 1389R– *RsaI*, 939R– *HaeIII*, 1387R – *MspI*, 536R–*BstUI* e 518R–*BstUI*, também, são menores que o comprimento dos *primers* R relacionados. A digestão na sequência do *primer* R por estas enzimas de restrição também ocorre. É importante salientar que a sequência do *primer* R sofreu alteração do método *complement* do Bioruby, para que possa ser pesquisado o reverso-complemento. Sendo assim, a digestão ocorreu no reverso-complemento do *primer* R.

A comparação dos tamanhos dos fragmentos 5' de um ensaio experimental, como o de Wu et al. (2015), com os tamanhos contidos no arquivo resultado da T-RFLP *in silico* deste estudo, verificarmos que o algoritmo para esta técnica pode ser validado como uma ferramenta para análise.

Ao avaliar outras ferramentas disponíveis percebemos suas particularidades positivas e negativas. Por exemplo, a ferramenta MiCA (SHYU et al., 2007) não permite que os usuários insiram as sequências diretamente, e somente aceita dados contidos em arquivos no formato CSV (*comma-separated values*) e TXT (*text*), o que restringe a utilização do formato FASTA, popularmente utilizado entre os profissionais e estudantes da área. Além disso, tal ferramenta exige que seja informado o arquivo contendo os T-RFs da análise *in vitro* para que possam ser comparadas com a análise *in silico*; ademais, os dados podem demorar cerca de trinta minutos para serem processados, e os resultados podem ser muito extensos e de difícil interpretação. O algoritmo do OneSix permite a adaptação em diversos formatos de arquivos de entrada, porém o formato FASTA, por ser amplamente utilizado, configura-se como padrão neste trabalho. Além disso, para a utilização do OneSix não é necessário informar os T-RFs, podendo ser comparados posteriormente.

Já TReFID (ROSCH; BOTHE, 2005) possui um número limitado de sequências, pois as análises foram realizadas até o ano de 2005. Esta ferramenta não é multiplataforma, limitando-se a ser executada apenas no sistema operacional Microsoft Windows XP. Já TRF-CUT (RICKE; KOLB; BRAKER, 2005), restringe-se ao sistema operacional Linux, apesar de existir uma versão experimental para Mac Os, não testada pela equipe de desenvolvedores da ARB; e no ano de 2015 encontra-se indisponível no servidor para download. O algoritmo do OneSix é executado onde puder ser instalado o Ruby, ou seja, em praticamente todos os sistemas operacionais mais utilizados, Windows (todas as versões), Linux e Mac OS.

O software TRiFLe (JUNIER; JUNIER; WITZEL, 2008), escrito em Java, apesar de sua simular T-RFLP e identificar espécies através dos fragmentos, não permitiu a execução em um arquivo FASTA como o testado neste trabalho, além disso vários arquivos foram testados e apresentavam o mesmo erro de leitura.

Por conseguinte, TRF-Pred (FERNANDEZ-GUERRA et al., 2010) requer a instalação da linguagem de programação PERL, o módulo de classes Bioperl, os softwares BLAST e EMBOSS, e sua utilização em ambiente Microsoft Windows necessita de um emulador virtual de Linux, exigindo dos usuários mais atenção e habilidade em informática avançada. Acrescenta-se também, o software TRAMPR (FITZJOHN; DICKIE, 2007), que exige conhecimento da linguagem de programação R, voltada para cálculos estatísticos e gráficos; em seu tutorial verificou-se que tal ferramenta não é intuitiva. Mesmo o OneSix necessitando da instalação da Linguagem Ruby e Bioruby, não há complexidade em sua utilização, bastando configurar os parâmetros para análise.

Apesar da existência de ferramentas com funcionalidades similares ao OneSix, o desenvolvimento de novas ferramentas pode contribuir para melhor compreensão acerca da forma em que os dados são processados, personalização, suporte, atualizações periódicas e constante evolução na construção de novos instrumentos para bioinformática, principalmente no Brasil.

Com o aperfeiçoamento do OneSix e seus resultados, definição de um servidor online para armazenamento dos arquivos resultantes e aumento da lista de *primers* e enzimas, almeja-se que análises PCR e T-RFLP *in silico*, em banco de dados contendo as sequências do gene 16S rDNA, sejam realizadas anualmente. E com o avanço de aplicações web, esperamos que seja possível adaptar o algoritmo para execução online.

Os algoritmos escritos em Ruby são salvos em arquivos com a extensão “.rb” e executador através do interpretador. Logo, pretende-se disponibilizar online o arquivo OneSix.rb – arquivo principal adaptado para argumentos como o nome dos *primers*, do arquivo FASTA a ser analisado, e da enzima de restrição. O arquivo OneSix.rb será invocado pelo interpretador Ruby, com a seguinte sintaxe:

- Ruby OneSix.rb <arquivo\_FASTA> <Primer F> <Primer R> <Enzima de Restrição>.
- Para a análise de PCR, o argumento < Enzima de Restrição> fica em branco.
- Para a análise de T-RFLP, todos os argumentos são obrigatórios.

A documentação de um projeto de software é importante, pois aumenta a chance de ser utilizado por outros desenvolvedores, que podem contribuir com melhorias para as ferramentas computacionais. Sendo assim, o RDoc, que já vem implementado na linguagem Ruby, gera a documentação a partir dos comentários do código-fonte de um algoritmo, sem precisar de sintaxe específica. Esta documentação permitirá a disponibilização em repositórios de código-fonte abertos para a adaptação e melhorias conforme necessidade do bioinformata.

Por conseguinte, pretende-se disponibilizar online todos os arquivos resultantes da primeira análise PCR e T-RFLP *in silico* realizada no banco de dados SILVA SSU RefNR 122.

## CONCLUSÕES

Além das contribuições descritas sobre as possíveis combinações de *primers Forward* e *Reverse*, e enzimas de restrição, pode ser destacada a importância do conhecimento empregado durante o desenvolvimento de uma ferramenta computacional voltada para pesquisadores da área de Biologia Molecular.



O algoritmo desenvolvido para T-RFLP *in silico*, incluindo uma das etapas desta técnica - a PCR *in silico*, permite o tratamento de sequências do gene 16S rDNA dispostas em arquivo no formato FASTA. Tal ferramenta pode ser remodelada conforme necessidade do pesquisador, pois a biblioteca Bioruby oferece uma ampla gama de métodos que trabalham com sequências de DNA.

Os melhores pares de *primers* F e R, para PCR *in silico*, verificados neste trabalho são: 343F-907R, 341F-1406R, 517F-1406R, 341F-1406R, 343F-926R, 343F-806R, 341F-806R, 517F-1389R, 341F-1389R e 517F-806R; e para T-RFLP *in silico*, os par 343F-907R e 343F-1406R. Baseados nestes pares, as melhores enzimas para restrição de uma grande quantidade de *amplicons* são: *Bst*UI, *Msp*I, *Rsa*I, *Dde*I e *Alu*I.

## REFERÊNCIAS

BAKER, G. C.; SMITH, J. J.; COWAN, D. A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. **Journal of microbiological methods**, v. 55, n. 3, p. 541-555, 2003.

COCK, P. J. A. et al. Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1422-1423, 2009.

COLLINGBOURNE, H. **The little book of Ruby**. Dark Neon, 2006. Tradução de Francisco de Oliveira. São Paulo: Sismicro Informática. Disponível em <<http://www.sismicro.com.br>>. Acesso em 20 de agosto de 2013.

DORAK, M. T. **Real-time PCR**. Taylor & Francis, 2007.

EDEL-HERMANN, V. et al. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of ribosomal RNA genes to assess changes in fungal community structure in soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 47, n. 3, p. 397-404, 2004.

ENGBRETSON, J. J.; MOYER, C. L. Fidelity of select restriction endonucleases in determining microbial diversity by terminal-restriction fragment length polymorphism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 4823-4829, 2003.

FERNANDEZ-GUERRA, A. et al. TRFPred: a nucleotide sequence size prediction tool for microbial community description based on terminal-restriction fragment length polymorphism chromatograms. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 262, 2010.

FISHER, M. et al. Diversity of gut bacteria of *Reticulitermes flavipes* as examined by 16S rRNA gene sequencing and amplified rDNA restriction analysis. **Current microbiology**, v. 55, n. 3, p. 254-259, 2007.

FITZJOHN, R. G.; DICKIE, I. A. TRAMP: AN R package for analysis and matching of terminal-restriction fragment length polymorphism (TRFLP) profiles. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 4, p. 583-587, 1 jul. 2007.

FLANAGAN, D.; MATSUMOTO, Y. **The ruby programming language**. Sebastopol: O'Reilly Media, Inc., 2008.

GOTO, N. et al. BioRuby: bioinformatics software for the Ruby programming language. **Bioinformatics**, v. 26, n. 20, p. 2617-2619, 2010.

HARMS, G. et al. Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. **Environmental science & technology**, v. 37, n. 2, p. 343-351, 2003.

HIRAIISHI, A.; IWASAKI, M.; SHINJO, H.. Terminal restriction pattern analysis of 16S rRNA genes for the characterization of bacterial communities of activated sludge. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 90, n. 2, p. 148-156, 2000.

HOLLAND, R. C. G. et al. BioJava: an open-source framework for bioinformatics. **Bioinformatics**, v. 24, n. 18, p. 2096-2097, 2008.

HONGO Y., OHKUMA M., KUDO T. Molecular analysis of bacterial microbiota in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera; Rhinotermitidae). **FEMS microbiology ecology**, v. 44, n. 2, p. 231-242, 2003.

HUWS, S. A. et al. Specificity and sensitivity of eubacterial primers utilized for molecular profiling of bacteria within complex microbial ecosystems. **Journal of microbiological methods**, v. 70, n. 3, p. 565-569, 2007.

JUNIER, P.; JUNIER, T.; WITZEL, K. -P. TRiFLe, a program for in silico terminal restriction fragment length polymorphism analysis with user-defined sequence sets. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 74, n. 20, p. 6452-6456, out. 2008.

KITTS, C. L. Terminal restriction fragment patterns: a tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics. **Biological Sciences**, p. 69, 2001.

KLINDWORTH, A. et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic acids research**, p. gks808, 2012.

LAL, D. et al. Exploring internal features of 16S rRNA gene for identification of clinically relevant species of the genus *Streptococcus*. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 10, n. 28, p. 1-11, 2011.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**, p. 125-175, 1991.

LANE, D. J. et al. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, n. 20, p. 6955-6959, 1985.

LIU, W. T. et al. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4516-4522, 1997.

LUDWIG, W. et al. ARB: a software environment for sequence data. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 4, p. 1363-1371, 2004.

MARCHESI, J. R. et al. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. **Applied and environmental microbiology**, v. 64, n. 2, p. 795-799, 1998.

MÜHLING, M. et al. Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. **The ISME journal**, v. 2, n. 4, p. 379-392, 2008.

MUYZER, G. et al. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in Microb Ecol Molecular. **Microbial Ecology**, v. 35, p. 1-27, 1998.

NOSSA, C. W. et al. Design of 16S rRNA gene primers for 454 pyrosequencing of the human foregut microbiome. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 16, n. 33, p. 4135, 2010.

PRESSMAN, R.S. **Engenharia de Software**. 5ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2002.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic acids research**, p. gks1219, 2012.

REYSENBACH, A. L.; PACE, N. R. Reliable amplification of hyperthermophilic archaeal 16S rRNA genes by the polymerase chain reaction. **Archaea: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, p. 101-107, 1995.

RICKE, P.; KOLB, S.; BRAKER, G. Application of a newly developed ARB software-integrated tool for in silico terminal restriction fragment length polymorphism analysis reveals the dominance of a novel pmoA cluster in a forest soil. **Appl. Environ Microbiol.**, v. 71, n. 3, p. 1671-1673, mar 2005.

ROSCH, C.; BOTHE, H. Improved assessment of denitrifying, N<sub>2</sub>-fixing, and total-community bacteria by terminal restriction fragment length polymorphism analysis using multiple restriction enzymes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 4, p. 2026-2035, abr. 2005.

RUDI, K. et al. Strain characterization and classification of oxyphotobacteria in clone cultures on the basis of 16S rRNA sequences from the variable regions V6, V7, and V8. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2593-2599, 1997.

SEBESTA, Robert W. **Conceitos de linguagens de programação**. Bookman, 2011.

SHYU, C. et al. MiCA: a web-based tool for the analysis of microbial communities based on terminal-restriction fragment length polymorphisms of 16S and 18S rRNA genes. **Microb. Ecol.**, v. 53, n. 4, p. 562-570, mai. 2007.

SOERGEL, D. AW et al. Selection of primers for optimal taxonomic classification of environmental 16S rRNA gene sequences. **The ISME journal**, v. 6, n. 7, p. 1440-1444, 2012.

STADHOUDERS, R. et al. The effect of primer-template mismatches on the detection and quantification of nucleic acids using the 5' nuclease assay. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 12, n. 1, p. 109-117, 2010.

STAJICH, J. E. et al. The Bioperl toolkit: Perl modules for the life sciences. **Genome research**, v. 12, n. 10, p. 1611-1618, 2002.

VAN PELT-VERKUIL, E.; VAN BELKUM, A.; HAYS, J. P. **Principles and technical aspects of PCR amplification**. Springer Science & Business Media, 2008.

WANG, Y.; QIAN, P. Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **PLOS one**, 2009. Doi: 10.1371/journal.pone.0007401

WATANABE, K.; KODAMA, Y.; HARAYAMA, S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. *Journal of Microbiological Methods*, v. 44, n. 3, p. 253-262, 2001.

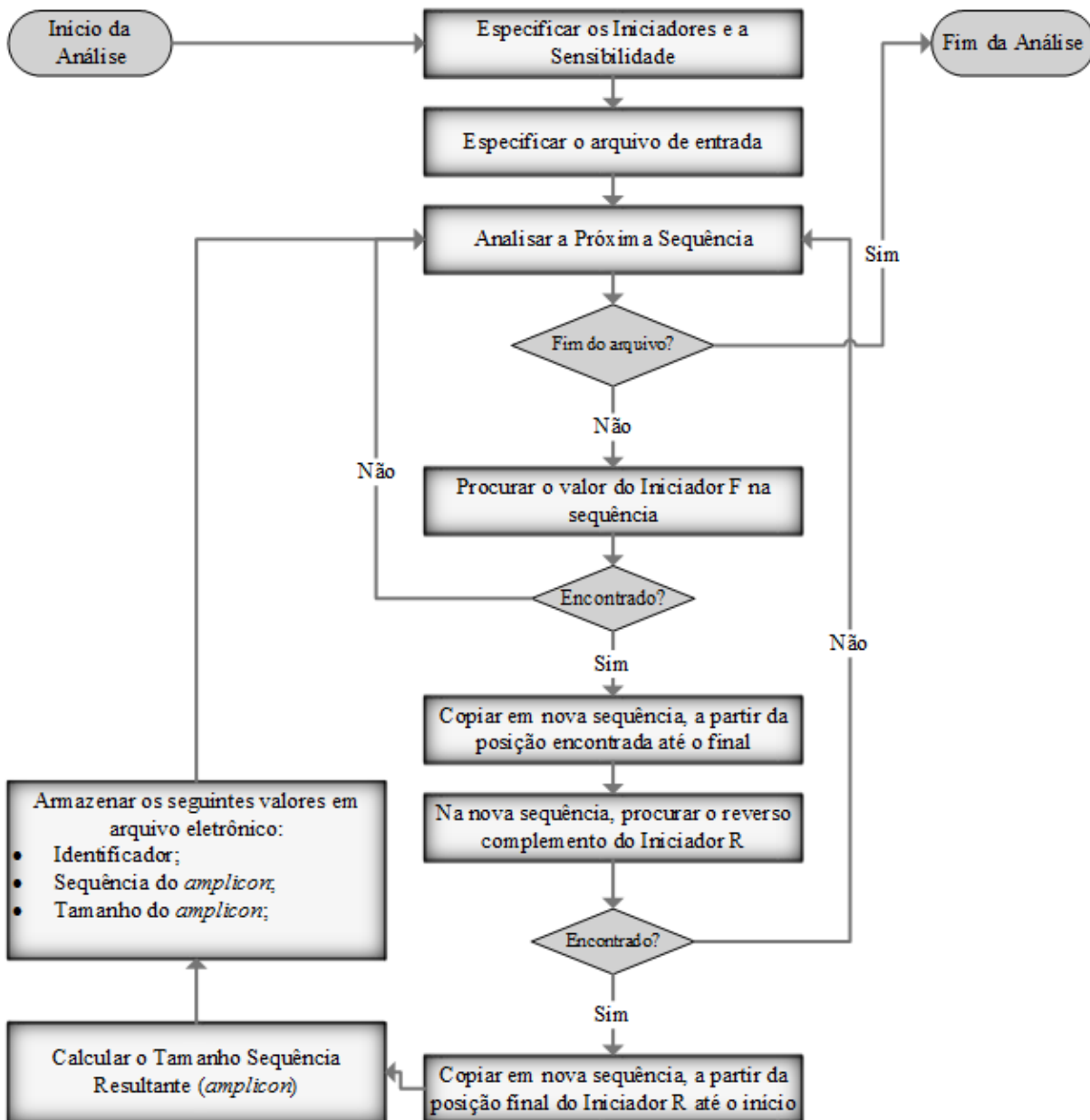
WU, J.; HONG, P.; LIU, W. Quantitative effects of position and type of single mismatch on single base primer extension. **Journal of microbiological methods**, v. 77, n. 3, p. 267-275, 2009.

WU, Z. et al. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Soil Bacterial Communities under Different Vegetation Types in Subtropical Area. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0129397, 2015.

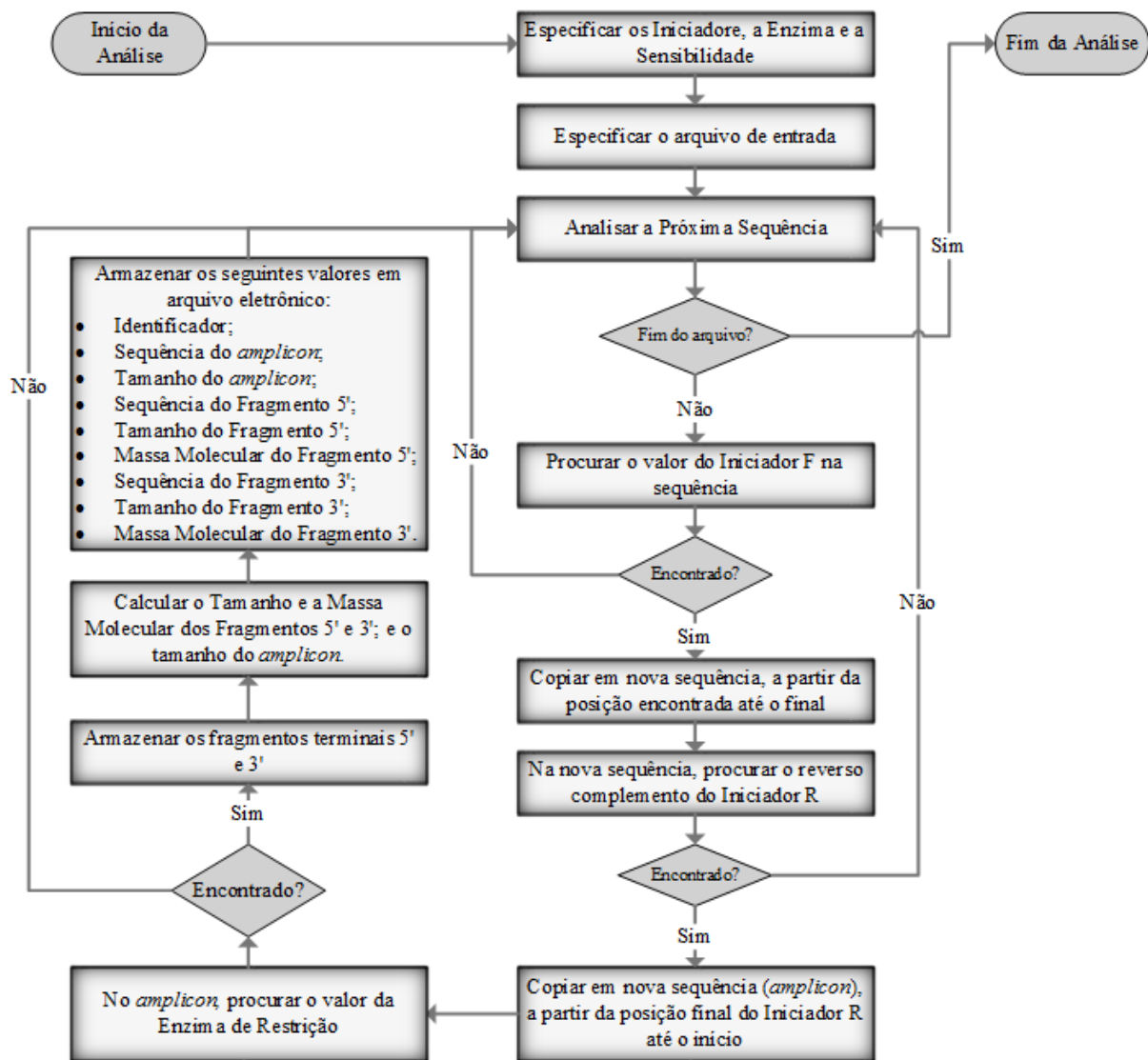
YOON, J. H.; LEE, S. T.; PARK, Y. H. Inter- and intraspecific phylogenetic analysis of the genus *Nocardioides* and related taxa based on 16S rDNA sequences. **International journal of systematic bacteriology**, v. 48, n. 1, p. 187-194, 1998.

ZOETENDAL, E. G. et al. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 7, p. 3401-3407, 2002.

## ANEXOS

ANEXO A - Diagrama de atividades do algoritmo para amplificação por PCR *in silico*

Fonte: Paulo Adrian.

ANEXO B - Diagrama de atividades do algoritmo para digestão *in silico* dos *amplicons*

Fonte: Paulo Adrian

ANEXO C - Algoritmo para análise automática para PCR *in silico*

```

#coding:utf-8
#Programa OneSix.rb
require 'rubygems'
require 'bio'
require 'bio/util/restriction_enzyme'
require 'fileutils'
#CLASSE AnaliseRNA16S CONTENDO MÉTODOS
class AnaliseRNA16s
  def make_open_file(file, id_pf, id_pr) #Método para criação e abertura de arquivo resultante
    d=0
    @name_file = file
    @id_primerf = id_pf
    @id_primerr = id_pr
    @id_enzima = id_enzyme
    dir = sprintf(@name_file+'_PCR', d / 1000)
    FileUtils.mkdir_p dir
    fname = sprintf("#{ @name_file}_#{ @id_primerf}_#{ @id_primerr}.xlsx", d
    d += 1
    filew = "#{dir}/#{fname}"
    dump = File.new(filew, "w")
    puts "\nCreated File: #{file}\n"
    puts("\n***** PCR in silico Started *****")
    dump.write("Identifier\tAmplicon Sequence\tAmplicon Size\n")
    dump.close
    return file
  end

  def make_open_file(file_name) #Método para criação do arquivo para resumo
    d=0
    @filename = file_name
    dir = sprintf(@filename+'_ResumePCR', d / 1000)
    FileUtils.mkdir_p dir
    fname = sprintf("#{ @filename}.xlsx", d
    d += 1
    file = "#{dir}/#{fname}"
    dump = File.new(file, "w")
    puts "\nCreated File: #{file}\n"
    dump.write("Primer Forward\t Primer Reverse\tTotal Amplicons\tAverage Amplicon Size \n")
    dump.close
    return file
  end
end

```

```

end

def analise_primerf(sequence, regexf) #Método para pesquisar a sequência do primer F
  @data_sequence = sequence
  @regex_primerf = regexf
  inicio = 0
  pos = 0
  #cont = 0
  if @data_sequence.index(@regex_primerf) != nil then
    seq_aposf = Array.new()
    pos = @data_sequence.index(@regex_primerf, inicio)
    matches = @data_sequence.scan(@regex_primerf)
    seq_aposf[0] = @data_sequence[pos, @data_sequence.length]
    return seq_aposf[0]
  else
    return false
  end
end #fim do método analise_primerf

def analise_primerr(sequence2, regexr) #Método para pesquisar a sequência do primer R
  @data_sequence2 = sequence2
  @regex_primerr = regexr
  inicio2 = 0
  pos2 = 0
  cont2 = 0
  if @data_sequence2.index(@regex_primerr) != nil then
    sequencia_interesse = Array.new()
    while pos2 != nil
      pos2 = @data_sequence2.index(@regex_primerr, inicio2)
      matches2 = @data_sequence2.scan(@regex_primerr)
      if pos2 != nil then
        inicio2 += pos2 + 1
        sequencia_interesse[cont2] = @data_sequence2[0, pos2.to_i + matches2[0].length]
        cont2 += 1
      end
    end
    return sequencia_interesse.last
    sequencia_interesse.clear
  else
    return false
  end
end #Fim do método analise_primerr

```



```
end #Fim da Classe AnaliseRNA16S
```

```
#VETOR DE PRIMERS F
```

```
primerf = Array.new
primerf[0] = Array.new(["8F", "agagtttgatcctggctcag"])
primerf[1] = Array.new(["27F", "agagtttgatcmtggctcag"])
primerf[2] = Array.new(["63F", "caggcctaacacatgcaagtc"])
primerf[3] = Array.new(["341F", "cctacgggagcagcag"])
primerf[4] = Array.new(["343F", "tacggraggcagcag"])
primerf[5] = Array.new(["517F", "gccagcagccgcggtaa"])
primerf[6] = Array.new(["786F", "gattagataccctgtag"])
primerf[7] = Array.new(["917F", "gaattgacgggrccc"])
primerf[8] = Array.new(["968F", "aacgcaagaacctac"])
primerf[9] = Array.new(["1055F", "atggctgtcgtcagct"])
primerf[10] = Array.new(["1099F", "gyaacgagcgaacct"])
```

```
#VETOR DE PRIMERS R
```

```
primerr = Array.new
primerr[0] = Array.new(["518R", "attaccgcggtgctgg"])
primerr[1] = Array.new(["536R", "gwattaccgcgckgctg"])
primerr[3] = Array.new(["806R", "ggactaccagggtatctaat"])
primerr[4] = Array.new(["907R", "ccgtcaattcmttgagtt"])
primerr[5] = Array.new(["926R", "ccgtcaattcctttragtt"])
primerr[6] = Array.new(["939R", "cttgtcgggccccgtcaattc"])
primerr[7] = Array.new(["1387R", "cccgggaactattaccgc"])
primerr[8] = Array.new(["1389R", "acggcggtgtgtacaag"])
primerr[9] = Array.new(["1406R", "acggcggtgtgtrc"])
primerr[10] = Array.new(["1492R", "gtacctgttacactt"])
```

```
padrao = AnaliseRNA16s.new #Criação de objeto para utilizar os métodos da classe AnaliseRNA16s
```

```
file_fasta = 'arb20150507.fasta' # Definição do arquivo a ser analisado no mesmo diretório do algoritmo
```

```
file_resume = padrao.make_file_resume (file_fasta)
```

```
for contador_primerf in (0..10) do
```

```
  for contador_primerr in (0..10) do
```

```
    sum_resultado = 0
```

```
    count_sequence = 0
```

```
    dump = File.new(file_resume, "a")
```

```
    dump << primerf[contador_primerf].at(0) << "\t"
```

```
    dump << primerr[contador_primerr].at(0) << "\t"
```

```
  dump.close
```

### # VETOR COM PERMUTAÇÃO DE BASES DA EXTREMIDADE 5' PARA O PRIMER F

```
f = Bio::Sequence::NA.new(primerf[contador_primerf].at(1))
array_primersf = Array.new()
array_primersf[0] = f.to_s
contador1 = 0
for y in (0..primerf[contador_primerf].at(1).size-6)
  contador1 += 1
  base_trocada = f[y].chr
  f[y] = "n"
  array_primersf[contador1] = f.to_s
  f[y] = base_trocada
end
```

### # VETOR COM PERMUTAÇÃO DE BASES DA EXTREMIDADE 5' PARA O PRIMER R

```
t = Bio::Sequence::NA.new(primerr[contador_primerr].at(1))
r = t.complement
array_primersr = Array.new()
array_primersr[0] = r.to_s
contador2 = 0
for z in (5..primerr[contador_primerr].at(1).size-1)
  contador2 += 1
  base_trocada2 = r[z].chr
  r[z] = "n"
  array_primersr[contador2] = r.to_s
  r[z] = base_trocada2
end
```

### # ESPECIFICAÇÃO DO ARQUIVO FASTA

```
file = padrao.make_open_file(file_fasta, primerf[contador_primerf].at(0), primerr[contador_primerr].at(0))
amplicon = Array.new()
resultado_r = Array.new()
resultado_f = Array.new()
```

### # INÍCIO DA ANÁLISE

```
Bio::FlatFile.open(File.open(file_fasta)).each_entry do |seq|
  dump = File.new(file, "a")
  sequencia_total = Bio::FastaFormat.new(seq.to_s.downcase)
  sequencia = Bio::Sequence::NA.new(sequencia_total.data.delete "\n")
  for num_padraof in (0..contador1)
    var_conv_re = Bio::Sequence::NA.new(array_primersf[num_padraof])
    regex_primerf = var_conv_re.to_re
    resultado_f = nil
    resultado_r = nil
```

```

resultado_f = padrao.analise_primerf(sequencia.dna, regex_primerf) #Pesquisa do Primer F
if resultado_f != false then
  resultado_f[0,array_primersf[0].size] = array_primersf[0]
  break
end
end
amplicon_encontrado = false
if resultado_f != false then
  for num_padraor in (0..contador2)
    var_conv_re2 = Bio::Sequence::NA.new(array_primersr[num_padraor])
    regex_primer_r = var_conv_re2.to_re
    resultado_r = padrao.analise_primer_r(resultado_f, regex_primer_r) #Pesquisa do Primer R
    if resultado_r != false then #se o resultado for verdadeiro
      resultado_r[resultado_r.size - array_primersr[0].size,array_primersr[0].size] = array_primersr[0]
      amplicon_encontrado = true
      dump << sequencia_total.definition<<"\t"
      dump << resultado_r<<"\t"
      dump << resultado_r.size<<"\n"
      count_sequence = count_sequence + 1
      sum_resultado = sum_resultado + resultado_r.size
      dump.close
    end
    break
  end
end
end
media = sum_resultado.round(2) / count_sequence.round(2)
dump = File.new(file_resume, "a")
dump << count_sequence << "\t"
dump << media.round(2).to_s.gsub(':', ',') << "\n"
dump.close
end #Fim do for contador_primer_r
end #Fim do for contador_primer_f

```

ANEXO D - Algoritmo para análise automática para T-RFLP *in silico*

```

#coding:utf-8
#Programa OneSix.rb
require 'rubygems'
require 'bio'
require 'bio/util/restriction_enzyme'
require 'fileutils'

#CLASSE AnaliseRNA16S CONTENDO MÉTODOS
class AnaliseRNA16s
  def make_open_file(file, id_pf, id_pr) #Método para criação e abertura de arquivo resultante
    d=0
    @name_file = file
    @id_primerf = id_pf
    @id_primerr = id_pr
    @id_enzima = id_enzyme
    dir = sprintf(@name_file+'_PCR', d / 1000)
    FileUtils.mkdir_p dir
    fname = sprintf "#{ @name_file }_#{ @id_primerf }_#{ @id_primerr }.xlsx", d
    d += 1
    filew = "#{dir}/#{fname}"
    dump = File.new(filew, "w")
    puts "\nCreated File: #{file}\n"
    puts("\n***** T-RFLP in silico Started *****")
    dump.write("Identifier\tAmplicon Sequence\tAmplicon Size\n")
    dump.close
    return file
  end

  def make_open_file(file_name) #Método para criação do arquivo para resumo
    d=0
    @filename = file_name
    dir = sprintf(@filename+'_ResumePCR', d / 1000)
    FileUtils.mkdir_p dir
    fname = sprintf "#{ @filename }.xlsx", d
    d += 1
    file = "#{dir}/#{fname}"
    dump = File.new(file, "w")
    puts "\nCreated File: #{file}\n"
    dump.write("Primer Forward\tPrimer Reverse\tTotal Amplicons\tAverage Amplicon Size \n")
    dump.close
  end
end

```

```

return file
end

def analise_primerf(sequence, regexf) #Método para pesquisar a sequência do primer F
  @data_sequence = sequence
  @regex_primerf = regexf
  inicio = 0
  pos = 0
  #cont = 0
  if @data_sequence.index(@regex_primerf) != nil then
    seq_aposf = Array.new()
    pos = @data_sequence.index(@regex_primerf, inicio)
    matches = @data_sequence.scan(@regex_primerf)
    seq_aposf[0] = @data_sequence[pos, @data_sequence.length]
    return seq_aposf[0]
  else
    return false
  end
end #fim do método analise_primerf

def analise_primerR(sequence2, regexr) #Método para pesquisar a sequência do primer R
  @data_sequence2 = sequence2
  @regex_primerR = regexr
  inicio2 = 0
  pos2 = 0
  cont2 = 0
  if @data_sequence2.index(@regex_primerR) != nil then
    sequencia_interesse = Array.new()
    while pos2 != nil
      pos2 = @data_sequence2.index(@regex_primerR, inicio2)
      matches2 = @data_sequence2.scan(@regex_primerR)
      if pos2 != nil then
        inicio2 += pos2 + 1
        sequencia_interesse[cont2] = @data_sequence2[pos2.to_i + matches2[0].length]
        cont2 += 1
      end
    end
    return sequencia_interesse.last
    sequencia_interesse.clear
  else
    return false
  end
end

```

```

end #Fim do método analise_primer

def digestao_enzima(amplicon, enzima) #Método para a digestão in silico pela enzima de restrição
  resultado = nil
  @amplicon_analisado = amplicon
  @enzima_restricao = enzima
  sequencia_amplicon = Bio::Sequence::NA.new(@amplicon_analisado)
  cuts = sequencia_amplicon.cut_with_enzyme(@enzima_restricao)
  unless cuts.to_s == "no_cuts_found"
    terminal_f = Bio::Sequence::NA.new(cuts.first.primary)
    terminal_r = Bio::Sequence::NA.new(cuts.last.primary)
    resultado = Array.new()
    resultado[0] = terminal_f # armazenar o fragmento próximo ao primer F (sequência completa)
    resultado[1] = terminal_f.size #armazenar o tamanho do fragmento próximo ao primer F
    resultado[2] = terminal_f.molecular_weight
    resultado[3]= terminal_r
    resultado[4] = terminal_r.size
    resultado[5] = terminal_r.molecular_weight
    if sequencia_amplicon =~ /[nyrwskmdbhv]/ then
      resultado[6] = "*"
    else
      resultado[6] = ""
    end
  end
  return resultado
end
else
  return resultado
end
end

end #Fim da Classe AnaliseRNA16S

```

---

```

#VETOR DE PRIMERS F

```

```

primerf = Array.new
primerf[0] = Array.new(["8F", "agagtttgatcctggctcag"])
primerf[1] = Array.new(["27F", "agagttgatcmtggctcag"])
primerf[2] = Array.new(["63F", "caggcctaacacatgcaagtc"])
primerf[3] = Array.new(["341F", "cctacgggagcagcag"])
primerf[4] = Array.new(["343F", "tacggraggcagcag"])
primerf[5] = Array.new(["517F", "gccagcagccgcggtaa"])
primerf[6] = Array.new(["786F", "gattagataccctggtag"])
primerf[7] = Array.new(["917F", "gaattgacgggrccc"])

```

```

primerf[8] = Array.new(["968F", "aacgcaagaaccttac"])
primerf[9] = Array.new(["1055F", "atggctgtcgtcagct"])
primerf[10] = Array.new(["1099F", "gyaacgagcgcaaccc"])

#VETOR DE PRIMERS R
primerr = Array.new
primerr[0] = Array.new(["518R", "attaccgcggtgctgg"])
primerr[1] = Array.new(["536R", "gwattaccgcgckgctg"])
primerr[3] = Array.new(["806R", "ggactaccagggtatctaat"])
primerr[4] = Array.new(["907R", "ccgtcaattcmttgagttt"])
primerr[5] = Array.new(["926R", "ccgtcaattcctttragttt"])
primerr[6] = Array.new(["939R", "cttgtcgggcccccgtcaatte"])
primerr[7] = Array.new(["1387R", "cccgggaacgtaccgcg"])
primerr[8] = Array.new(["1389R", "acggcggtgtgtacaag"])
primerr[9] = Array.new(["1406R", "acggcggtgtgtc"])
primerr[10] = Array.new(["1492R", "gtacctgttaccgactt"])

#VETOR DE ENZIMA DE RESTRIÇÃO
enzima_restricao = Array.new
enzima_restricao[0] = Array.new(["AluI", "ag^ct"])
enzima_restricao[1] = Array.new(["BamHI", "g^gatcc"])
enzima_restricao[2] = Array.new(["BfaI", "c^tag"])
enzima_restricao[3] = Array.new(["EcoRI", "g^aatc"])
enzima_restricao[4] = Array.new(["HaeIII", "gg^cc"])
enzima_restricao[5] = Array.new(["HhaI", "gcg^c"])
enzima_restricao[6] = Array.new(["HindIII", "a^agctt"])
enzima_restricao[7] = Array.new(["MspI", "c^cgg"])
enzima_restricao[8] = Array.new(["TaqI", "t^cga"])
enzima_restricao[9] = Array.new(["RsaI", "gt^ac"])
enzima_restricao[10] = Array.new(["BstUI", "cg^cg"])
enzima_restricao[11] = Array.new(["DdeI", "c^tnag"])
enzima_restricao[12] = Array.new(["Sau961", "g^gncc"])

padrao = AnaliseRNA16s.new #Criação de objeto para utilizar os métodos da classe AnaliseRNA16s
file_fasta = 'arb20150507.fasta' # Definição do arquivo a ser analisado no mesmo diretório do algoritmo
file_resume = padrao.make_file_resume (file_fasta)

for contador_primerf in (0..10) do
  for contador_primerr in (0..10) do
    for contador_enzima_restricao in (0..12) do

```

```

sum_resultado = 0
count_sequence = 0
dump = File.new(file_resume, "a")
dump << primerf[contador_primerf].at(0) << "\t"
dump << primerr[contador_primerr].at(0) << "\t"
dump << primerr[contador_enzima_restricao].at(0) << "\t"
dump.close

# VETOR COM PERMUTAÇÃO DE BASES DA EXTREMIDADE 5' PARA O PRIMER F
f = Bio::Sequence::NA.new(primerf[contador_primerf].at(1))
array_primersf = Array.new()
array_primersf[0] = f.to_s
contador1 = 0
for y in (0..primerf[contador_primerf].at(1).size-6)
  contador1 += 1
  base_trocada = f[y].chr
  f[y] = "n"
  array_primersf[contador1] = f.to_s
  f[y] = base_trocada
end

# VETOR COM PERMUTAÇÃO DE BASES DA EXTREMIDADE 5' PARA O PRIMER F
t = Bio::Sequence::NA.new(primerr[contador_primerr].at(1))
r = t.complement
array_primersr = Array.new()
array_primersr[0] = r.to_s
contador2 = 0
for z in (5..primerr[contador_primerr].at(1).size-1)
  contador2 += 1
  base_trocada2 = r[z].chr
  r[z] = "n"
  array_primersr[contador2] = r.to_s
  r[z] = base_trocada2
end

# ESPECIFICAÇÃO DO ARQUIVO FASTA
file = padrao.make_open_file(arquivo_fasta, primerf[contador_primerf].at(0), primerr[contador_primerr].at(0),
enzima_restricao[contador_enzima_restricao].at(0))

amplicon = Array.new()
resultado_r = Array.new()
resultado_f = Array.new()
resultado_digestao = Array.new()

# INÍCIO DA ANÁLISE

```



```

Bio::FlatFile.open(File.open(file_fasta)).each_entry do |seq|
  dump = File.new(file, "a")
  sequencia_total = Bio::FastaFormat.new(seq.to_s.downcase)
  sequencia = Bio::Sequence::NA.new(sequencia_total.data.delete "\n")
  for num_padraof in (0..contador1)
    var_conv_re = Bio::Sequence::NA.new(array_primersf[num_padraof])
    regex_primerf = var_conv_re.to_re
    resultado_f = nil
    resultado_r = nil
    resultado_f = padrao.analise_primerf(sequencia.dna, regex_primerf) #Pesquisa do Primer F
    if resultado_f != false then
      resultado_f[0,array_primersf[0].size] = array_primersf[0]
      break
    end
  end
  amplicon_encontrado = false
  if resultado_f != false then
    for num_padraor in (0..contador2)
      var_conv_re2 = Bio::Sequence::NA.new(array_primersr[num_padraor])
      regex_primer2 = var_conv_re2.to_re
      resultado_r = padrao.analise_primer2(resultado_f, regex_primer2) #Pesquisa do Primer R
      if resultado_r != false then #se o resultado for verdadeiro
        resultado_r[resultado_r.size - array_primersr[0].size,array_primersr[0].size] = array_primersr[0]
        amplicon_encontrado = true
        resultado_digestao = nil
        amplicon = Bio::Sequence::NA.new(resultado_r)
        resultado_digestao = padrao.digestao_enzima(amplicon, enzima_restricao[contador_enzima_restricao].at(1))
        unless resultado_digestao == nil then
          dump << sequencia_total.definition<<"\t"
          dump << amplicon<<"\t"
          dump << resultado_r.size<<"\t"
          dump << resultado_digestao[0]<<"\t"
          dump << resultado_digestao[1]<<"\t"
          dump << resultado_digestao[2]<<"\t"
          dump << resultado_digestao[3]<<"\t"
          dump << resultado_digestao[4]<<"\t"
          dump << resultado_digestao[5]<<"\t"
          dump << resultado_digestao[6]<<"\n"
          dump.close
        end
      end
    end
  end
  dump.close
end

```

```
end #Fim unless resultado_digestao == nil then
end #Fim if resultado_r != false then
end #Fim if resultado_f != false then
    end #Fim do for contador_enzima_restricao
end #Fim do for contador_primerr
end #Fim do for contador_primerf
```

ANEXO E – Resultados do PCR *in silico*

<b>Primer F</b>	<b>Primer R</b>	<b>Total Amplicons</b>	<b>%</b>	<b>Média do Tamanho dos Amplicons</b>
343F	907R	319969	69.33	573.3753 ± 15.0412
341F	907R	318383	68.99	575.3879 ± 15.0460
517F	907R	294907	63.90	410.1223 ± 10.2693
343F	1406R	276992	60.02	1053.0939 ± 18.0550
517F	1406R	276525	59.92	890.1394 ± 16.4027
341F	1406R	275442	59.69	1055.1252 ± 17.9385
343F	926R	271278	58.78	571.7554 ± 14.5251
341F	926R	269927	58.49	573.7705 ± 14.5358
343F	806R	269607	58.42	453.9018 ± 15.4811
341F	806R	268561	58.19	455.9005 ± 15.4845
517F	926R	253275	54.88	410.0804 ± 9.6188
343F	1389R	253256	54.88	1053.4279 ± 18.2944
517F	1389R	252356	54.68	889.9444 ± 13.3989
341F	1389R	251835	54.57	1055.4631 ± 18.1851
786F	1406R	243817	52.83	621.2134 ± 16.4794
517F	806R	231608	50.19	290.2544 ± 11.3357
343F	939R	228739	49.57	587.4209 ± 14.9306
343F	1387R	228089	49.42	1033.3418 ± 16.8198
341F	939R	227832	49.37	589.4328 ± 14.9397
341F	1387R	227427	49.28	1035.3527 ± 16.8062
1055F	1406R	225221	48.80	351.5783 ± 16.0998
786F	1389R	222752	48.27	620.9531 ± 12.9982
517F	1387R	219911	47.65	870.4959 ± 11.6829
1099F	1406R	219576	47.58	307.2622 ± 12.0287
343F	536R	214222	46.42	184.7329 ± 15.7999
343F	518R	214118	46.40	182.7361 ± 15.9343
341F	536R	213108	46.18	186.7480 ± 15.8188
341F	518R	213001	46.15	184.7512 ± 15.9538
517F	939R	208298	45.14	423.2139 ± 10.4659
1055F	1389R	205657	44.56	351.2683 ± 11.8528
968F	1406R	205104	44.44	438.8170 ± 12.2437
1099F	1389R	200542	43.46	307.2789 ± 12.3389
786F	1387R	195920	42.45	601.5478 ± 11.5645
968F	1389R	189237	41.01	438.8437 ± 12.4573
786F	907R	182348	39.51	141.0877 ± 11.7625
1055F	1387R	167118	36.21	332.1122 ± 10.5894
1099F	1387R	165157	35.79	288.1520 ± 10.2064
968F	1387R	159494	34.56	419.4573 ± 11.1203
786F	926R	155795	33.76	141.0434 ± 11.5448
786F	939R	132841	28.79	154.1343 ± 11.6284
27F	907R	116393	25.22	906.0211 ± 22.7615
8F	907R	113485	24.59	906.2668 ± 22.5751
517F	1492R	111548	24.17	992.9712 ± 22.9493

343F	1492R	110860	24.02	1155.2902	± 21.4502
341F	1492R	110160	23.87	1157.3307	± 21.8723
27F	1406R	108805	23.58	1385.7279	± 27.7170
27F	518R	106806	23.14	514.8926	± 22.1179
27F	536R	106711	23.12	516.8924	± 22.1140
8F	1406R	105753	22.92	1386.0264	± 27.6359
8F	518R	104332	22.61	515.0763	± 21.9752
8F	536R	104235	22.59	517.0782	± 21.9706
27F	806R	101766	22.05	787.7647	± 21.2531
27F	926R	99705	21.60	905.6761	± 23.0007
1055F	1492R	99632	21.59	454.3350	± 22.9133
8F	806R	99631	21.59	787.8427	± 21.1979
786F	1492R	98999	21.45	724.2616	± 23.8687
8F	926R	97634	21.16	905.7860	± 22.9230
1099F	1492R	97404	21.11	409.7063	± 15.9102
27F	1389R	95601	20.72	1385.1554	± 26.7079
8F	1389R	92661	20.08	1385.4771	± 26.5812
63F	907R	89378	19.37	866.2842	± 25.5050
968F	1492R	87473	18.95	542.3839	± 16.2422
8F	939R	84486	18.31	919.9472	± 23.8574
63F	806R	83043	17.99	747.4899	± 25.0862
63F	939R	80423	17.43	881.4295	± 24.5907
63F	518R	79811	17.29	474.7465	± 25.7110
63F	536R	79789	17.29	476.7539	± 25.6491
27F	1387R	79190	17.16	1367.4320	± 24.8540
27F	939R	78221	16.95	920.0749	± 23.8150
8F	1387R	77420	16.78	1367.6833	± 24.6590
27F	1492R	73638	15.96	1486.5674	± 43.0083
63F	1406R	72345	15.68	1343.4831	± 29.7845
8F	1492R	71824	15.56	1486.7594	± 43.5821
63F	1389R	68652	14.88	1343.0047	± 30.0791
63F	1387R	54207	11.75	1323.5385	± 29.3523
63F	926R	52927	11.47	858.7248	± 27.2685
63F	1492R	37389	8.10	1441.8251	± 32.6817
917F	1406R	2613	0.57	488.0115	± 9.0381
917F	1389R	2138	0.46	488.0674	± 9.3339
917F	1387R	2106	0.46	470.3628	± 9.3552
917F	1492R	1062	0.23	591.5320	± 8.9514

ANEXO F – Exemplo de classificação taxonômica por Filo das sequências dos *amplicons* resultantes da análise PCR *in silico* com os *primers* 343F e 907R.

<b>Filo</b>	<b>Total Amplicons (319969)</b>
Proteobacteria	125817
Firmicutes	86519
Bacteroidetes	35186
Actinobacteria	31154
Acidobacteria	10873
Cyanobacteria	7705
Chloroflexi	5952
Spirochaetae	3180
Gemmatimonadetes	1625
Nitrospirae	1343
Fusobacteria	1324
Tenericutes	988
Synergistetes	849
Chlorobi	820
Deferribacteres	785
Verrucomicrobia	713
Deinococcus-Thermus	653
Fibrobacteres	527
Candidate Division Ws3	420
Candidate Division Brc1	413
Candidate Division Op8	351
Thermotogae	292
Tm6	284
Elusimicrobia	270
Candidate Division Js1	247
Planctomycetes	202
Ta06	201
Armatimonadetes	181
Aquificae	122
Sha-109	109
Wd272	107
Npl-Upa2	89
Caldiserica	81
Candidate Division Tm7	78
Wchb1-60	63
Candidate Division Op9	58
Bhi80-139	56
Thermodesulfobacteria	48
Sm2F11	46

<b>Filo</b>	<b>Total Amplicons (319969)</b>
Candidate Division Od1	40
Hyd24-12	31
Jl-Etnp-Z39	30
Gouta4	28
Lentisphaerae	23
Dictyoglomi	17
Ckc4	15
Gal08	10
Aquifer1	6
Chrysiogenetes	5
Bd1-5	5
Candidate Division Op3	4
Rsahf231	4
Candidate Division Op11	4
Oc31	4
Sbyg-2791	3
S2R-29	3
Candidate Division Sr1	3
Aquifer2	3

ANEXO G – Exemplo de classificação taxonômica por Filo das sequências dos *amplicons* resultantes da análise T-RFLP *in silico* com os *primers* 343F e 907R e enzima *BstUI*.

<b>Filo</b>	<b>Total Amplicons (319848)</b>
Proteobacteria	125805
Firmicutes	86481
Bacteroidetes	35138
Actinobacteria	31144
Acidobacteria	10871
Cyanobacteria	7703
Chloroflexi	5951
Spirochaetae	3180
Gemmatimonadetes	1625
Nitrospirae	1343
Fusobacteria	1322
Tenericutes	983
Synergistetes	849
Chlorobi	820
Deferribacteres	785
Verrucomicrobia	713
Deinococcus-Thermus	653
Fibrobacteres	526
Candidate Division Ws3	420
Candidate Division Brc1	413
Candidate Division Op8	351
Thermotogae	292
Tm6	284
Elusimicrobia	270
Candidate Division Js1	247
Planctomycetes	202
Ta06	201
Armatimonadetes	181
Aquificae	122
Sha-109	109
Wd272	107
Npl-Upa2	89
Caldiserica	81
Candidate Division Tm7	78
Wchb1-60	63
Candidate Division Op9	58
Bhi80-139	56
Thermodesulfobacteria	48
Sm2F11	46
Candidate Division Od1	40

Hyd24-12	31
Jl-Etnp-Z39	30
Gouta4	28
Lentisphaerae	23
Dictyoglomi	17
Ckc4	15
Gal08	10
Aquifer1	6
Chrysiogenetes	5
Bd1-5	5
Candidate Division Op3	4
Rsahf231	4
Candidate Division Op11	4
Oc31	4
Sbyg-2791	3
S2R-29	3
Candidate Division Sr1	3
Aquifer2	3



ANEXO H – Resumo dos resultados das análises T-RFLP *in silico* com OneSix, classificados pelo número de sequências digeridas, por ordem decrescente.

<b>Primer F</b>	<b>Primer R</b>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>Nº de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
343F	907R	BstUI	319848	69.31%	573.3750 ± 15.0426	65.1692 ± 25.2762	242.7522 ± 149.4484
341F	907R	BstUI	318929	69.11%	575.3860 ± 15.0414	67.1538 ± 25.2371	242.8025 ± 149.3920
343F	907R	MspI	318292	68.97%	573.3755 ± 15.0532	157.9290 ± 36.6268	248.2404 ± 118.5162
341F	907R	MspI	317457	68.79%	575.3846 ± 15.0520	159.5930 ± 37.0117	248.1206 ± 118.5094
343F	907R	RsaI	316843	68.66%	573.3356 ± 15.0659	207.6759 ± 154.4355	45.1728 ± 60.0015
341F	907R	RsaI	316049	68.48%	575.3490 ± 15.0696	209.6140 ± 154.4514	45.0128 ± 59.5493
517F	907R	BstUI	295280	63.98%	410.1202 ± 10.2617	11.6490 ± 13.5335	243.3349 ± 148.6905
343F	907R	DdeI	293645	63.63%	573.1045 ± 15.2904	316.2077 ± 138.9133	162.6841 ± 84.7591
341F	907R	DdeI	292742	63.43%	575.1163 ± 15.2898	318.3540 ± 138.9297	162.7434 ± 84.8283
343F	907R	AluI	287067	62.20%	573.9256 ± 15.3024	253.8227 ± 162.4982	138.2546 ± 132.8764
341F	907R	AluI	286317	62.04%	575.9337 ± 15.3002	255.9345 ± 162.5334	138.3586 ± 133.0013
517F	907R	RsaI	284332	61.61%	410.1117 ± 10.4204	304.7631 ± 107.4331	38.2423 ± 26.8126
343F	1406R	BstUI	276980	60.02%	1053.0944 ± 18.0547	65.1596 ± 26.4431	144.5728 ± 151.7035
343F	1406R	MspI	276909	60.00%	1053.0944 ± 18.0548	161.0046 ± 59.1262	39.3337 ± 88.8179
343F	1406R	AluI	276891	60.00%	1053.0959 ± 18.0554	296.7843 ± 204.5239	203.2120 ± 119.1595
343F	1406R	BfaI	276677	59.95%	1053.0843 ± 18.0608	395.1796 ± 240.4480	65.2414 ± 37.6630
517F	1406R	BstUI	276650	59.95%	890.1405 ± 16.3974	12.3360 ± 22.5865	142.9946 ± 150.7077
517F	1406R	AluI	276492	59.91%	890.1400 ± 16.3985	277.4511 ± 168.5332	202.4210 ± 119.2525
343F	1406R	RsaI	276475	59.91%	1053.1085 ± 17.9653	215.1003 ± 165.6951	289.9403 ± 177.2820
517F	1406R	BfaI	276370	59.89%	890.1384 ± 16.4063	258.1213 ± 224.7199	65.5139 ± 38.7874
517F	1406R	MspI	276326	59.88%	890.1375 ± 16.3820	127.3771 ± 169.2217	41.2025 ± 87.6437
343F	1406R	TaqI	276154	59.84%	1053.0996 ± 18.0558	447.7831 ± 173.6157	194.1149 ± 164.1316
517F	1406R	TaqI	275677	59.74%	890.1376 ± 16.4199	324.7056 ± 133.8638	198.0773 ± 165.5776
341F	1406R	BstUI	275579	59.71%	1055.1258 ± 17.9361	67.1429 ± 26.3799	144.3364 ± 151.3623
341F	1406R	MspI	275520	59.70%	1055.1254 ± 17.9362	162.6021 ± 58.8449	39.0911 ± 87.8706

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>Nº de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
341F	1406R	AluI	275490	59.70%	1055.1274 ± 17.9367	298.6931 ± 204.4314	203.2580 ± 119.1262
517F	1406R	HhaI	275451	59.69%	890.1290 ± 16.4098	225.7152 ± 222.8771	246.6180 ± 114.6242
341F	1406R	BfaI	275278	59.65%	1055.1158 ± 17.9420	397.4266 ± 240.6673	65.2253 ± 37.5730
341F	1406R	RsaI	275153	59.62%	1055.1373 ± 17.9320	216.9514 ± 165.5431	289.9695 ± 177.2073
517F	1406R	Sau96I	274806	59.55%	890.1395 ± 16.4294	297.4632 ± 134.3311	293.8936 ± 144.5231
341F	1406R	Sau96I	274805	59.55%	1055.1461 ± 17.9479	410.2422 ± 182.9773	294.2050 ± 142.6391
341F	1406R	TaqI	274769	59.54%	1055.1298 ± 17.9375	449.6396 ± 173.5890	193.8704 ± 163.9878
517F	1406R	RsaI	273579	59.28%	890.1560 ± 16.4466	316.1840 ± 121.7261	285.6238 ± 170.7821
343F	926R	BstUI	271163	58.76%	571.7548 ± 14.5265	66.0073 ± 27.0062	251.4139 ± 146.7019
341F	926R	BstUI	270355	58.58%	573.7672 ± 14.5321	67.9918 ± 26.9673	251.5114 ± 146.6199
517F	907R	MspI	269725	58.45%	410.1746 ± 10.6352	74.5628 ± 53.9993	229.5466 ± 110.1944
343F	926R	MspI	269632	58.43%	571.7459 ± 14.5382	158.0201 ± 39.3294	247.5428 ± 116.4223
343F	806R	BstUI	269453	58.39%	453.8995 ± 15.4830	65.2986 ± 24.9702	216.7012 ± 91.2819
341F	806R	BstUI	269275	58.35%	455.8931 ± 15.4757	67.2814 ± 24.9429	216.6553 ± 91.2794
341F	926R	MspI	268911	58.27%	573.7566 ± 14.5436	159.6455 ± 39.7043	247.5002 ± 116.4321
343F	1406R	DdeI	268828	58.25%	1052.9531 ± 18.1749	342.3424 ± 176.2194	233.5467 ± 196.9741
343F	926R	RsaI	268278	58.13%	571.7019 ± 14.5548	185.4050 ± 135.0074	47.0251 ± 65.1074
343F	806R	MspI	267805	58.03%	453.8871 ± 15.5046	156.2498 ± 34.8049	180.4831 ± 73.7067
341F	806R	MspI	267659	58.00%	455.8812 ± 15.4966	158.0982 ± 35.0699	180.4282 ± 73.6641
341F	926R	RsaI	267558	57.98%	573.7125 ± 14.5597	187.2894 ± 134.9413	46.8488 ± 64.6495
341F	1406R	DdeI	267442	57.95%	1054.9847 ± 18.0542	344.4995 ± 176.1453	233.4677 ± 196.7897
343F	907R	BfaI	266841	57.82%	572.0548 ± 15.6358	307.9793 ± 114.6975	143.4780 ± 86.3160
517F	1406R	DdeI	266789	57.81%	890.1914 ± 16.6151	265.2630 ± 141.1322	224.7752 ± 189.5778
341F	907R	BfaI	265960	57.63%	574.0621 ± 15.6371	309.9522 ± 114.7027	143.5397 ± 86.3867
343F	1406R	HaeIII	265840	57.60%	1053.4422 ± 18.2196	231.1188 ± 226.3798	76.9174 ± 139.7264
341F	1406R	HaeIII	264460	57.31%	1055.4763 ± 18.0972	233.1175 ± 226.3431	76.3104 ± 138.2518
517F	1406R	HaeIII	263782	57.16%	890.1621 ± 16.7397	312.9894 ± 155.9555	72.5975 ± 118.8668
343F	907R	HhaI	261704	56.71%	574.4876 ± 15.5431	160.7426 ± 127.2351	243.4520 ± 150.3697

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>Nº de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
341F	907R	HhaI	261131	56.58%	576.5068 ± 15.5458	162.6933 ± 127.2075	243.3831 ± 150.3812
343F	907R	HaeIII	259884	56.31%	574.0669 ± 15.5059	163.2870 ± 157.7914	165.5922 ± 176.8652
341F	907R	HaeIII	259073	56.14%	576.0826 ± 15.5036	165.2574 ± 157.7941	165.1032 ± 176.6151
517F	907R	DdeI	256074	55.49%	410.1143 ± 10.8675	225.3806 ± 57.1389	145.7710 ± 50.5338
517F	926R	BstUI	253500	54.93%	410.0789 ± 9.6130	11.6591 ± 13.5475	250.9565 ± 146.1843
343F	1389R	RsaI	253256	54.88%	1053.4279 ± 18.2944	218.5704 ± 169.5798	13.0000 ± .0000
343F	1389R	BstUI	253245	54.88%	1053.4283 ± 18.2942	64.9265 ± 25.6970	145.5390 ± 151.1963
343F	1389R	MspI	253178	54.86%	1053.4285 ± 18.2942	160.4845 ± 58.1989	37.7197 ± 82.7681
343F	1389R	AluI	253172	54.86%	1053.4297 ± 18.2948	294.0276 ± 201.5682	205.0395 ± 118.6236
343F	1389R	BfaI	253003	54.82%	1053.4198 ± 18.3000	393.2133 ± 241.1420	64.9300 ± 35.3141
343F	1389R	Sau96I	252996	54.82%	1053.4327 ± 18.2976	408.1931 ± 181.9543	291.7576 ± 139.5127
343F	1389R	TaqI	252640	54.74%	1053.4272 ± 18.2958	448.3075 ± 175.0523	188.1799 ± 161.0912
517F	1389R	RsaI	252524	54.72%	889.9436 ± 13.3951	321.5341 ± 133.0031	13.0000 ± .0000
517F	1389R	BstUI	252491	54.71%	889.9449 ± 13.3946	12.1981 ± 20.8986	144.0093 ± 150.3298
517F	1389R	AluI	252345	54.68%	889.9451 ± 13.3934	273.7245 ± 166.5801	203.9384 ± 118.4705
517F	1389R	BfaI	252258	54.66%	889.9437 ± 13.4004	255.8248 ± 224.6480	65.2328 ± 36.8471
517F	1389R	MspI	252178	54.64%	889.9408 ± 13.3886	131.7210 ± 171.9888	39.5294 ± 81.3322
341F	1389R	RsaI	251977	54.60%	1055.4632 ± 18.1827	220.2256 ± 168.9620	13.0000 ± .0000
341F	1389R	BstUI	251966	54.60%	1055.4636 ± 18.1825	66.9073 ± 25.6276	145.2981 ± 150.8492
341F	1389R	MspI	251909	54.59%	1055.4632 ± 18.1825	162.0592 ± 57.8745	37.4599 ± 81.6312
341F	1389R	AluI	251893	54.58%	1055.4649 ± 18.1831	295.9061 ± 201.4488	205.0907 ± 118.5871
517F	1389R	TaqI	251760	54.55%	889.9415 ± 13.4062	325.6755 ± 134.7817	192.3988 ± 162.9629
341F	1389R	BfaI	251726	54.55%	1055.4550 ± 18.1881	395.4555 ± 241.3617	64.9172 ± 35.2402
517F	1389R	HhaI	251472	54.49%	889.9313 ± 13.3942	218.3624 ± 219.7737	246.8260 ± 114.6191
341F	1389R	TaqI	251375	54.47%	1055.4611 ± 18.1846	450.1536 ± 175.0426	187.9319 ± 160.9638
517F	1389R	Sau96I	251284	54.45%	889.9239 ± 13.4077	295.7986 ± 133.6509	291.7233 ± 141.5109
343F	926R	DdeI	249051	53.97%	571.4488 ± 14.7077	308.6206 ± 141.6128	165.4160 ± 87.9832
341F	926R	DdeI	248261	53.80%	573.4620 ± 14.7142	310.7426 ± 141.6565	165.5112 ± 88.0590

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>Nº de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
343F	1389R	DdeI	245762	53.25%	1053.2721 ± 18.4212	343.9785 ± 174.9435	233.5677 ± 195.4304
341F	1389R	DdeI	244496	52.98%	1055.3075 ± 18.3077	346.1582 ± 174.8975	233.4785 ± 195.2229
343F	1389R	HaeIII	244254	52.93%	1053.7259 ± 18.4355	223.5309 ± 221.5117	69.6006 ± 130.7098
517F	907R	BfaI	244126	52.90%	410.2236 ± 10.9617	168.6673 ± 89.3215	137.1439 ± 75.1219
786F	1406R	AluI	243981	52.87%	621.2116 ± 16.4723	142.8152 ± 100.5002	205.1053 ± 118.7956
786F	1406R	BfaI	243732	52.81%	621.2120 ± 16.4818	179.3711 ± 209.1116	64.9096 ± 33.0292
517F	1389R	DdeI	243717	52.81%	889.9930 ± 13.5247	262.5248 ± 136.3607	225.6168 ± 189.4394
786F	1406R	BstUI	243679	52.80%	621.2118 ± 16.4731	152.8195 ± 62.4448	138.7104 ± 146.2380
341F	1389R	HaeIII	242993	52.65%	1055.7634 ± 18.3206	225.5050 ± 221.4639	68.9697 ± 128.9754
517F	926R	RsaI	242604	52.57%	410.0792 ± 9.7919	305.5770 ± 106.7956	38.7118 ± 28.7036
786F	1406R	TaqI	242434	52.53%	621.2030 ± 16.5207	153.0174 ± 61.6546	190.5732 ± 160.7607
786F	1406R	MspI	242098	52.46%	621.2253 ± 16.4811	275.0970 ± 163.0422	34.2102 ± 50.1838
517F	1389R	HaeIII	242034	52.45%	889.9488 ± 13.6226	311.6961 ± 152.9173	65.7989 ± 109.8656
786F	1406R	RsaI	241714	52.38%	621.1879 ± 16.5276	109.7856 ± 56.4624	284.7393 ± 168.9468
786F	1406R	Sau96I	241579	52.35%	621.1823 ± 16.5256	135.3849 ± 43.2108	289.6692 ± 142.1895
786F	1406R	HhaI	241460	52.32%	621.1537 ± 16.5203	252.8934 ± 109.7016	255.5357 ± 86.0494
343F	907R	EcoRI	240696	52.16%	572.7657 ± 15.4723	319.3320 ± 19.4940	251.9021 ± 12.4636
341F	907R	EcoRI	240194	52.05%	574.7850 ± 15.4749	321.3669 ± 19.4011	251.8897 ± 12.3679
343F	926R	AluI	239838	51.97%	572.2722 ± 14.8357	239.7043 ± 159.2070	149.7357 ± 140.6420
341F	926R	AluI	239200	51.83%	574.2820 ± 14.8403	241.7266 ± 159.2726	149.8763 ± 140.7781
517F	926R	MspI	236604	51.27%	410.1152 ± 9.8833	69.9329 ± 54.2096	232.2158 ± 110.4072
517F	907R	AluI	235644	51.06%	410.1462 ± 11.3318	213.3173 ± 114.4348	99.9580 ± 71.3488
517F	806R	BstUI	232103	50.29%	290.2533 ± 11.3234	11.3021 ± 7.0907	214.3245 ± 91.8263
786F	1406R	HaeIII	230467	49.94%	621.2090 ± 16.9079	144.4517 ± 95.2272	64.5609 ± 97.6127
343F	806R	DdeI	229562	49.74%	452.8974 ± 16.0966	304.4013 ± 134.7578	74.5966 ± 71.5757
341F	806R	DdeI	229327	49.69%	454.8875 ± 16.0895	306.4389 ± 134.7732	74.6856 ± 71.7133
343F	939R	HaeIII	228739	49.57%	587.4209 ± 14.9306	227.2710 ± 209.4568	10.0000 ± .0000
343F	939R	Sau96I	228739	49.57%	587.4209 ± 14.9306	402.2205 ± 181.8660	14.0736 ± 23.6726

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>Nº de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
343F	939R	BstUI	228662	49.55%	587.4202 ± 14.9321	65.8073 ± 26.7710	253.4535 ± 146.7396
341F	939R	Sau96I	228269	49.46%	589.4337 ± 14.9330	404.3528 ± 181.7966	14.0782 ± 23.7096
341F	939R	BstUI	228192	49.45%	589.4330 ± 14.9345	67.8023 ± 26.7584	253.6523 ± 146.6843
343F	1387R	MspI	228089	49.42%	1033.3418 ± 16.8198	158.0667 ± 51.2686	4.0000 ± .0000
343F	1387R	BstUI	228087	49.42%	1033.3419 ± 16.8198	65.7202 ± 27.9066	96.0499 ± 143.2006
343F	1387R	AluI	228006	49.41%	1033.3439 ± 16.8195	291.7265 ± 208.0913	178.2264 ± 118.9482
343F	1387R	BfaI	227849	49.37%	1033.3346 ± 16.8244	396.3679 ± 236.0287	45.9912 ± 35.8686
343F	939R	MspI	227826	49.37%	587.4263 ± 14.9403	160.9335 ± 37.5102	249.8459 ± 121.5424
343F	1387R	RsaI	227816	49.37%	1033.3470 ± 16.8119	216.5467 ± 164.9637	262.7379 ± 170.8380
341F	1387R	MspI	227610	49.32%	1035.3522 ± 16.8041	159.9128 ± 51.3556	4.0000 ± .0000
341F	1387R	BstUI	227608	49.32%	1035.3523 ± 16.8041	67.7020 ± 27.8653	96.0730 ± 143.1895
341F	1387R	AluI	227527	49.30%	1035.3542 ± 16.8039	293.6916 ± 208.1071	178.2548 ± 118.9362
341F	939R	MspI	227398	49.27%	589.4365 ± 14.9430	162.5726 ± 37.9946	249.7417 ± 121.5442
341F	1387R	BfaI	227372	49.27%	1035.3450 ± 16.8087	398.4608 ± 236.0078	45.9789 ± 35.7984
341F	1387R	RsaI	227347	49.26%	1035.3575 ± 16.7962	218.4912 ± 164.9165	262.7392 ± 170.8003
343F	1387R	TaqI	227262	49.25%	1033.3448 ± 16.8195	441.7697 ± 166.3080	188.2100 ± 169.7758
341F	1387R	TaqI	226790	49.14%	1035.3547 ± 16.8041	443.7566 ± 166.2774	188.2231 ± 169.7625
343F	939R	RsaI	226048	48.98%	587.3799 ± 14.9712	226.5444 ± 165.2870	58.4944 ± 60.7024
1055F	1406R	AluI	225744	48.92%	351.5755 ± 16.0832	13.9967 ± .1810	203.4313 ± 118.1008
341F	939R	RsaI	225655	48.90%	589.3898 ± 14.9730	228.5601 ± 165.3539	58.2908 ± 60.1156
1055F	1406R	BfaI	223960	48.53%	351.5818 ± 16.1378	227.8684 ± 91.6590	62.8727 ± 10.5352
343F	926R	BfaI	223801	48.50%	570.1171 ± 14.9512	314.3797 ± 119.4987	138.7058 ± 85.6096
343F	806R	RsaI	223293	48.39%	453.3393 ± 16.0656	146.2764 ± 65.1118	252.0529 ± 104.1189
341F	806R	RsaI	223205	48.37%	455.3327 ± 16.0557	148.2255 ± 65.1706	252.0299 ± 104.1601
786F	1389R	RsaI	223170	48.36%	620.9508 ± 12.9884	114.3108 ± 73.7879	13.0000 ± .0000
341F	926R	BfaI	223039	48.33%	572.1253 ± 14.9601	316.3238 ± 119.5289	138.7447 ± 85.6748
786F	1389R	AluI	222930	48.31%	620.9517 ± 12.9915	138.7025 ± 99.1461	206.9221 ± 117.9205
786F	1389R	BfaI	222733	48.26%	620.9519 ± 12.9987	180.0942 ± 209.2991	64.7268 ± 31.6802

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>Nº de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
786F	1389R	BstUI	222698	48.26%	620.9538 ± 12.9871	151.4096 ± 60.0977	140.1246 ± 146.4079
1055F	1406R	MspI	222321	48.17%	351.6111 ± 16.1553	140.2649 ± 80.5966	33.3871 ± 42.2959
786F	1389R	TaqI	221864	48.08%	620.9446 ± 13.0185	152.5917 ± 61.3746	184.8817 ± 158.1439
1055F	1406R	HhaI	221743	48.05%	351.5467 ± 16.1494	55.5876 ± 15.7899	253.7698 ± 85.5453
786F	1389R	MspI	221534	48.00%	620.9590 ± 13.0095	274.4391 ± 160.0172	33.8537 ± 48.9705
786F	1389R	Sau96I	221304	47.95%	620.9016 ± 13.0078	135.3995 ± 42.6868	287.8612 ± 139.4627
786F	1389R	HhaI	220701	47.82%	620.8896 ± 13.0069	250.6854 ± 110.7055	256.3705 ± 84.6537
517F	1387R	MspI	220119	47.70%	870.4948 ± 11.6787	120.2892 ± 174.0656	4.0000 ± .0000
517F	1387R	BstUI	220115	47.70%	870.4950 ± 11.6787	11.8536 ± 18.1241	94.0818 ± 141.3668
517F	1387R	AluI	219952	47.66%	870.4960 ± 11.6776	290.1252 ± 174.2031	177.1993 ± 118.0090
517F	1387R	HhaI	219878	47.65%	870.4942 ± 11.6658	232.9359 ± 226.3426	226.8388 ± 111.2566
517F	1387R	BfaI	219874	47.64%	870.4956 ± 11.6836	260.8755 ± 220.5236	46.0509 ± 36.0237
517F	1387R	Sau96I	219582	47.58%	870.4977 ± 11.6883	303.9136 ± 132.0329	310.0453 ± 136.0045
1099F	1406R	HhaI	219576	47.58%	307.2622 ± 12.0287	10.0000 ± .0000	254.9057 ± 84.6186
517F	1387R	TaqI	219196	47.50%	870.4900 ± 11.6924	317.2571 ± 131.2128	188.5213 ± 169.4929
343F	1387R	DdeI	218924	47.44%	1033.1689 ± 16.9685	341.7679 ± 186.2664	206.0762 ± 198.3741
517F	1387R	RsaI	218822	47.42%	870.4980 ± 11.6846	314.2207 ± 117.2109	261.5828 ± 166.5091
517F	926R	DdeI	218445	47.33%	410.0473 ± 10.2104	224.7104 ± 59.2524	146.6106 ± 51.1714
341F	1387R	DdeI	218444	47.33%	1035.1792 ± 16.9529	343.7236 ± 186.2637	206.1498 ± 198.4064
343F	926R	HhaI	218037	47.25%	572.6221 ± 15.1826	161.0872 ± 124.6536	234.1600 ± 154.6049
1099F	1406R	BfaI	217610	47.15%	307.2647 ± 12.0709	184.9490 ± 90.8421	62.9003 ± 10.7349
341F	926R	HhaI	217510	47.13%	574.6413 ± 15.1872	163.0251 ± 124.5820	234.0567 ± 154.6073
1099F	1406R	MspI	216380	46.89%	307.2967 ± 12.0487	102.5680 ± 82.1261	31.1569 ± 37.6525
517F	907R	EcoRI	216255	46.86%	410.3834 ± 10.8218	157.8814 ± 5.8455	251.6830 ± 10.4301
343F	1387R	HaeIII	216037	46.81%	1033.9356 ± 17.0016	241.6963 ± 229.6489	232.2547 ± 139.4320
517F	907R	HhaI	215922	46.79%	410.4268 ± 11.6256	101.0443 ± 80.9370	209.4723 ± 120.7634
341F	1387R	HaeIII	215550	46.71%	1035.9487 ± 16.9853	243.7075 ± 229.6503	232.3518 ± 139.4508
341F	536R	BstUI	214870	46.56%	186.7273 ± 15.7894	67.0236 ± 24.1477	9.0000 ± .0000

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>Nº de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
341F	518R	BstUI	214764	46.54%	184.7304 ± 15.9235	67.0315 ± 24.1640	7.0000 ± .0000
343F	939R	DdeI	214421	46.46%	587.3908 ± 15.1316	326.0095 ± 129.2974	165.8640 ± 60.7379
343F	536R	BstUI	214222	46.42%	184.7329 ± 15.7999	65.0409 ± 24.1726	9.0000 ± .0000
343F	518R	BstUI	214118	46.40%	182.7361 ± 15.9343	65.0482 ± 24.1881	7.0000 ± .0000
343F	926R	EcoRI	214034	46.38%	571.4207 ± 14.7148	317.8749 ± 20.0072	251.8723 ± 13.1029
341F	939R	DdeI	213995	46.37%	589.4033 ± 15.1341	328.1075 ± 129.2874	165.8887 ± 60.7232
341F	926R	EcoRI	213521	46.27%	573.4388 ± 14.7202	319.9094 ± 19.9097	251.8592 ± 13.0035
343F	806R	HhaI	213254	46.21%	454.7074 ± 16.2325	143.6616 ± 106.6869	187.5149 ± 112.7816
341F	806R	HhaI	213214	46.20%	456.7084 ± 16.2188	145.6815 ± 106.7088	187.4494 ± 112.7802
786F	1389R	HaeIII	212132	45.97%	620.9298 ± 13.2708	142.3095 ± 91.9577	59.0165 ± 90.5911
786F	1406R	DdeI	211340	45.80%	621.2983 ± 17.5479	301.3538 ± 187.2152	179.1519 ± 132.3335
343F	926R	HaeIII	211093	45.74%	572.1680 ± 15.0632	161.2205 ± 149.8234	186.6275 ± 181.9670
341F	926R	HaeIII	210388	45.59%	574.1849 ± 15.0690	163.1462 ± 149.7771	186.1645 ± 181.8028
517F	939R	HaeIII	208872	45.26%	423.2126 ± 10.4518	288.1970 ± 120.8749	10.0000 ± .0000
517F	1387R	DdeI	208868	45.26%	870.5509 ± 11.8600	283.5401 ± 163.2192	197.7370 ± 184.6469
517F	939R	Sau96I	208868	45.26%	423.2127 ± 10.4519	290.2432 ± 131.8163	13.8447 ± 21.0489
517F	939R	BstUI	208596	45.20%	423.2133 ± 10.4580	11.5715 ± 12.2378	252.6228 ± 146.0640
1055F	1406R	HaeIII	208439	45.17%	351.5818 ± 16.7119	175.7594 ± 70.8730	54.2901 ± 69.7958
343F	1406R	EcoRI	207778	45.02%	1052.5659 ± 18.2630	325.3739 ± 60.9623	712.9035 ± 100.0836
517F	1387R	HaeIII	207628	44.99%	870.4350 ± 11.9832	317.5781 ± 155.0321	228.3185 ± 132.8928
517F	926R	BfaI	207104	44.88%	410.2015 ± 10.3279	175.8229 ± 93.4218	132.2144 ± 72.2415
341F	1406R	EcoRI	206835	44.82%	1054.6049 ± 18.2354	327.4086 ± 60.8977	712.9068 ± 100.0672
517F	806R	MspI	206610	44.77%	290.2661 ± 11.8953	70.8404 ± 43.3780	165.3222 ± 64.4870
1055F	1389R	AluI	206137	44.67%	351.2659 ± 11.8419	13.9966 ± .1842	204.8406 ± 117.2450
1055F	1389R	RsaI	206137	44.67%	351.2659 ± 11.8419	243.0868 ± 73.0463	13.0000 ± .0000
968F	1406R	AluI	204938	44.41%	438.8169 ± 12.2437	96.2696 ± 24.3807	215.3701 ± 115.9298
968F	1406R	BstUI	204810	44.38%	438.8260 ± 12.2431	6.2166 ± 25.7893	144.3926 ± 146.3172
1055F	1389R	BfaI	204708	44.36%	351.2679 ± 11.8724	228.6692 ± 90.9904	62.8463 ± 10.0478

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>Nº de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
968F	1406R	BfaI	204658	44.35%	438.8151 ± 12.2511	265.7231 ± 137.6422	63.1382 ± 15.4361
343F	1406R	Sau961	203822	44.17%	1052.7109 ± 18.1262	410.3114 ± 182.0717	299.0594 ± 143.1578
968F	1406R	MspI	203767	44.15%	438.8158 ± 12.2665	174.0045 ± 104.5470	32.4318 ± 42.1669
343F	939R	AluI	203649	44.13%	587.9807 ± 15.1799	262.1330 ± 158.8593	142.8459 ± 124.8813
1055F	1389R	MspI	203518	44.10%	351.3030 ± 11.8860	137.1847 ± 77.5937	33.1484 ± 41.9377
968F	1406R	HhaI	203454	44.09%	438.7826 ± 12.2610	119.5901 ± 50.2736	272.7500 ± 61.3092
341F	939R	AluI	203189	44.03%	589.9972 ± 15.1822	264.1453 ± 158.8927	142.9354 ± 124.9766
517F	1406R	EcoRI	203090	44.01%	889.9976 ± 13.7673	163.9931 ± 59.4341	712.3780 ± 100.6367
1055F	1389R	HhaI	202524	43.88%	351.2428 ± 11.9207	55.5458 ± 15.5817	254.6044 ± 84.2324
1099F	1406R	HaeIII	201913	43.75%	307.2487 ± 12.4903	135.7062 ± 67.9096	51.3295 ± 67.2332
517F	939R	RsaI	201782	43.72%	423.2152 ± 10.5980	306.3721 ± 105.2986	50.7049 ± 23.4902
341F	806R	EcoRI	201114	43.58%	454.9560 ± 16.1700	321.8009 ± 18.3521	132.4598 ± 9.5750
343F	806R	EcoRI	201066	43.57%	452.9554 ± 16.1845	319.7899 ± 18.3972	132.4705 ± 9.6985
1099F	1389R	HhaI	200542	43.46%	307.2789 ± 12.3389	10.0000 ± .0000	255.8650 ± 83.4792
1099F	1389R	RsaI	200542	43.46%	307.2789 ± 12.3389	198.7816 ± 72.5292	13.0000 ± .0000
1099F	1389R	BfaI	198958	43.11%	307.2797 ± 12.3779	186.0098 ± 90.3312	62.8713 ± 10.2611
343F	939R	HhaI	198136	42.93%	587.5213 ± 15.4831	150.9261 ± 128.4761	252.1915 ± 155.3934
1099F	1389R	MspI	198092	42.92%	307.3184 ± 12.3831	99.7150 ± 79.5622	30.8650 ± 37.1134
341F	939R	HhaI	197842	42.87%	589.5326 ± 15.4843	152.8706 ± 128.4195	252.1794 ± 155.4261
786F	1387R	MspI	196480	42.58%	601.5443 ± 11.5522	282.3125 ± 156.7838	4.0000 ± .0000
786F	1387R	AluI	196253	42.53%	601.5456 ± 11.5542	150.8501 ± 102.2429	179.3522 ± 117.8702
1055F	1406R	Sau961	196153	42.50%	351.6049 ± 17.1914	210.0404 ± 86.9952	48.5492 ± 62.8872
786F	1387R	BstUI	196099	42.49%	601.5324 ± 11.3817	157.7516 ± 60.1687	94.9659 ± 141.2902
786F	1387R	BfaI	196066	42.49%	601.5460 ± 11.5618	168.4114 ± 203.7010	45.6059 ± 30.7987
786F	1387R	HhaI	195819	42.43%	601.5406 ± 11.5440	255.7993 ± 106.4746	237.4693 ± 87.2209
786F	1387R	Sau961	195719	42.41%	601.5510 ± 11.5678	131.1785 ± 34.3085	310.4184 ± 136.4355
517F	907R	HaeIII	195695	42.40%	410.3600 ± 12.1748	235.9335 ± 108.6174	91.5137 ± 89.9872
517F	926R	AluI	195366	42.33%	410.1048 ± 10.7608	210.6594 ± 114.4177	104.4057 ± 74.6675



<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>N° de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
786F	1387R	RsaI	195207	42.30%	601.5400 ± 11.5745	106.6759 ± 44.6473	262.2777 ± 165.6976
341F	1387R	Sau96I	194637	42.18%	1035.0175 ± 16.4548	424.9831 ± 177.9145	313.4278 ± 135.9071
786F	1387R	TaqI	194290	42.10%	601.5250 ± 11.6066	160.0903 ± 55.8327	181.8807 ± 164.6478
517F	926R	EcoRI	194021	42.04%	410.3537 ± 9.6857	157.8699 ± 5.8763	251.6259 ± 10.9371
786F	1389R	DdeI	193652	41.96%	620.9862 ± 13.7475	299.0856 ± 187.1899	181.2795 ± 133.9366
1055F	1389R	HaeIII	192921	41.80%	351.2465 ± 12.2132	175.3028 ± 70.0068	50.9806 ± 67.1470
517F	939R	DdeI	192796	41.78%	423.2318 ± 10.7732	220.3978 ± 52.0635	161.0986 ± 48.7593
1099F	1406R	Sau96I	192239	41.66%	307.2619 ± 12.7638	167.0162 ± 86.7248	47.3269 ± 61.7437
343F	806R	HaeIII	190602	41.30%	454.4182 ± 16.6480	110.7182 ± 87.6635	210.7644 ± 143.2798
341F	806R	HaeIII	190413	41.26%	456.4198 ± 16.6378	112.7518 ± 87.6878	210.4769 ± 143.2573
343F	1389R	EcoRI	189872	41.14%	1053.0272 ± 18.6055	326.2466 ± 62.4619	712.0145 ± 102.2463
968F	1389R	RsaI	189702	41.11%	438.8438 ± 12.4430	303.1487 ± 112.8560	13.0000 ± .0000
517F	939R	MspI	189412	41.04%	423.2649 ± 10.8833	74.4126 ± 52.1409	232.7921 ± 111.0969
343F	939R	BfaI	189229	41.00%	586.3152 ± 15.6334	312.2814 ± 122.5273	158.6548 ± 90.5340
968F	1389R	AluI	189068	40.97%	438.8442 ± 12.4575	96.3010 ± 23.9025	216.5555 ± 115.2702
341F	1389R	EcoRI	189016	40.96%	1055.0695 ± 18.5766	328.2824 ± 62.3979	712.0152 ± 102.2415
968F	1389R	BstUI	188999	40.95%	438.8557 ± 12.4565	5.8866 ± 23.6010	145.9928 ± 146.5268
968F	1389R	BfaI	188884	40.93%	438.8430 ± 12.4637	265.9374 ± 137.9361	63.1026 ± 14.9742
968F	1406R	HaeIII	188807	40.91%	438.7541 ± 12.7199	225.9311 ± 117.7799	53.0607 ± 73.2527
341F	939R	BfaI	188794	40.91%	588.3272 ± 15.6377	314.2632 ± 122.5811	158.7365 ± 90.6254
343F	806R	AluI	188569	40.86%	453.2058 ± 16.7511	182.9142 ± 104.7417	222.7188 ± 109.4881
341F	806R	AluI	188424	40.83%	455.1917 ± 16.7411	184.9650 ± 104.7097	222.8269 ± 109.4532
968F	1389R	MspI	188190	40.78%	438.8429 ± 12.4760	172.5922 ± 101.5305	32.1843 ± 41.4971
968F	1389R	HhaI	187775	40.69%	438.8110 ± 12.4731	118.5875 ± 51.1235	272.7507 ± 60.9996
343F	907R	TaqI	187073	40.54%	573.0928 ± 16.7509	337.9413 ± 128.5770	182.7294 ± 115.4166
1099F	1389R	HaeIII	187002	40.52%	307.2634 ± 12.7325	135.3737 ± 67.4266	47.9213 ± 64.2764
341F	907R	TaqI	186726	40.46%	575.0994 ± 16.7541	340.0235 ± 128.4862	182.7093 ± 115.3499
517F	806R	DdeI	186474	40.41%	290.2707 ± 12.5008	218.3389 ± 47.9738	56.3129 ± 25.1989

<b>Primer F</b>	<b>Primer R</b>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>Nº de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
517F	1389R	EcoRI	185397	40.17%	890.0464 ± 13.8952	164.3326 ± 61.0100	711.6354 ± 102.8144
1055F	1389R	Sau961	183317	39.72%	351.2328 ± 12.4925	208.8743 ± 86.1974	47.3297 ± 61.7493
786F	1387R	HaeIII	182920	39.64%	601.4661 ± 11.9276	142.9281 ± 91.2569	220.2100 ± 119.4848
1055F	1406R	BstUI	182433	39.53%	351.3828 ± 17.6709	222.3972 ± 60.9836	77.6270 ± 58.5949
343F	1387R	EcoRI	181796	39.39%	1032.6671 ± 17.0092	319.9459 ± 25.5043	705.7179 ± 50.4009
341F	1387R	EcoRI	181496	39.33%	1034.6798 ± 16.9876	321.9530 ± 25.4852	705.7162 ± 50.4213
517F	926R	HhaI	180842	39.19%	410.4052 ± 10.9718	102.5098 ± 79.3416	197.2562 ± 120.5057
968F	1406R	Sau961	180294	39.07%	438.7119 ± 12.9884	257.1406 ± 127.3987	56.5742 ± 79.2996
1099F	1389R	Sau961	179801	38.96%	307.2637 ± 12.9593	166.0574 ± 86.4331	46.0797 ± 60.5599
343F	907R	Sau961	178946	38.78%	574.1267 ± 16.8299	281.8166 ± 142.6224	230.8137 ± 122.4256
341F	907R	Sau961	178392	38.66%	576.1478 ± 16.8388	283.9100 ± 142.5392	230.6938 ± 122.2805
343F	806R	BfaI	177245	38.41%	451.9493 ± 17.3254	260.5264 ± 84.4965	160.4386 ± 58.5572
341F	806R	BfaI	177121	38.38%	453.9337 ± 17.3138	262.5250 ± 84.4707	160.4619 ± 58.5147
786F	907R	RsaI	176611	38.27%	141.0727 ± 11.9328	100.8345 ± 17.2128	35.3190 ± 3.3415
1099F	1406R	BstUI	176525	38.25%	306.9885 ± 13.1532	180.5023 ± 57.1314	77.5287 ± 58.0596
968F	1389R	HaeIII	176508	38.25%	438.7816 ± 12.8646	225.7328 ± 116.7472	49.7950 ± 69.6980
517F	1387R	EcoRI	174922	37.90%	870.7278 ± 11.9223	158.7835 ± 19.0857	705.4892 ± 50.5528
517F	806R	EcoRI	170897	37.03%	290.2599 ± 12.2581	157.8942 ± 4.3850	132.0799 ± 2.9690
1055F	1406R	DdeI	170850	37.02%	351.7533 ± 18.3352	171.2559 ± 84.2108	130.8340 ± 57.3703
517F	939R	BfaI	170338	36.91%	423.3460 ± 11.1665	174.3658 ± 93.0423	151.8342 ± 78.4791
968F	1389R	Sau961	169996	36.84%	438.7323 ± 13.0870	256.4885 ± 126.5127	54.4946 ± 76.3688
517F	939R	AluI	169382	36.70%	423.2638 ± 11.4571	211.5517 ± 114.1935	110.1268 ± 69.0653
786F	1387R	DdeI	168566	36.53%	601.6007 ± 12.2666	317.3332 ± 186.0535	151.4874 ± 122.7265
341F	536R	MspI	167943	36.39%	186.5126 ± 17.0042	144.9574 ± 21.7973	34.3779 ± 9.7012
341F	518R	MspI	167890	36.38%	184.5184 ± 17.1623	144.9610 ± 21.7870	32.3760 ± 9.6877
1055F	1387R	AluI	167665	36.33%	332.1076 ± 10.5783	13.9973 ± .1638	182.0826 ± 117.1022
1055F	1387R	MspI	167664	36.33%	332.1076 ± 10.5784	143.0179 ± 82.2769	4.0000 ± .0000
343F	536R	MspI	167125	36.21%	184.5382 ± 17.0231	143.1934 ± 21.0788	34.2639 ± 8.8113

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>Nº de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
343F	518R	MspI	167074	36.20%	182.5440 ± 17.1817	143.1943 ± 21.0777	32.2637 ± 8.8088
1055F	1387R	HhaI	166742	36.13%	332.1087 ± 10.5815	54.2614 ± 7.7321	235.8110 ± 87.8264
968F	1406R	DdeI	166587	36.10%	438.8733 ± 13.3824	217.0804 ± 110.3654	154.7542 ± 86.8049
1055F	1387R	BfaI	166493	36.08%	332.1061 ± 10.6070	229.9055 ± 90.6766	43.9101 ± 10.6614
1055F	1389R	BstUI	166238	36.02%	350.9847 ± 12.9112	221.2561 ± 59.7974	78.6206 ± 58.8907
1099F	1406R	DdeI	165399	35.84%	307.3186 ± 13.6854	126.5868 ± 82.8293	132.9937 ± 55.3298
1099F	1387R	HhaI	165157	35.79%	288.1520 ± 10.2064	10.0000 ± .0000	236.1968 ± 87.4846
1099F	1387R	MspI	165157	35.79%	288.1520 ± 10.2064	105.6486 ± 83.6927	4.0000 ± .0000
343F	939R	EcoRI	164208	35.58%	586.7134 ± 15.4578	320.0537 ± 19.4880	265.2602 ± 10.2260
341F	939R	EcoRI	163902	35.52%	588.7339 ± 15.4611	322.0899 ± 19.4002	265.2460 ± 10.0666
1099F	1387R	BfaI	163866	35.51%	288.1505 ± 10.2378	185.6823 ± 90.8222	43.9497 ± 10.9644
517F	806R	HhaI	161196	34.93%	290.3050 ± 13.3542	82.5570 ± 52.4244	155.4056 ± 82.4554
1099F	1389R	BstUI	160883	34.86%	306.9901 ± 13.5244	179.5667 ± 56.4685	78.4707 ± 58.3437
343F	1406R	HhaI	160722	34.83%	1052.5262 ± 18.5433	269.5192 ± 252.5661	246.2163 ± 107.7444
968F	1387R	MspI	160144	34.70%	419.4582 ± 11.0993	171.5806 ± 110.7352	4.0000 ± .0000
341F	1406R	HhaI	159952	34.66%	1054.5556 ± 18.5062	271.1743 ± 252.4858	246.0803 ± 107.7478
968F	1387R	BstUI	159682	34.60%	419.4602 ± 11.1119	5.6226 ± 22.6808	102.2594 ± 144.7815
968F	1387R	AluI	159600	34.58%	419.4589 ± 11.1108	96.8996 ± 22.2467	192.5267 ± 115.8121
968F	1387R	BfaI	159394	34.54%	419.4561 ± 11.1198	263.9114 ± 138.3233	44.2251 ± 16.0723
968F	1387R	HhaI	159377	34.54%	419.4512 ± 11.1009	121.6027 ± 46.1278	260.4030 ± 53.1323
517F	939R	HhaI	159286	34.52%	423.5321 ± 11.6313	103.4730 ± 82.2525	211.7539 ± 119.7736
341F	536R	RsaI	159191	34.49%	185.7648 ± 17.0995	128.7436 ± 16.5277	53.0592 ± 12.7119
341F	518R	RsaI	159128	34.48%	183.7734 ± 17.2950	128.7513 ± 16.6585	51.0635 ± 12.7186
517F	907R	TaqI	158748	34.40%	410.3811 ± 13.2911	218.6458 ± 86.2228	159.6927 ± 84.0496
343F	536R	RsaI	158584	34.36%	183.7752 ± 17.1161	126.8136 ± 16.3692	53.0344 ± 12.6362
343F	518R	RsaI	158520	34.35%	181.7838 ± 17.3122	126.8221 ± 16.4988	51.0388 ± 12.6429
343F	926R	TaqI	157313	34.09%	571.0030 ± 16.0134	331.4326 ± 129.8768	193.1004 ± 113.7515
341F	926R	TaqI	156935	34.01%	573.0045 ± 16.0207	333.4968 ± 129.7724	193.1435 ± 113.6765

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>Nº de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
517F	926R	HaeIII	156586	33.93%	410.3529 ± 11.6771	225.7995 ± 110.9588	102.9092 ± 95.5063
1055F	1406R	TaqI	155921	33.79%	352.0593 ± 18.8945	255.9447 ± 37.8826	88.9951 ± 24.5186
1055F	1389R	DdeI	155682	33.73%	351.3314 ± 13.4233	170.0906 ± 84.5221	131.0405 ± 57.4765
968F	1389R	DdeI	154217	33.42%	438.8946 ± 13.5984	215.3434 ± 110.4996	155.5339 ± 87.6046
1099F	1406R	TaqI	152581	33.06%	307.6329 ± 13.9979	212.8183 ± 35.5745	88.3702 ± 21.0179
1099F	1389R	DdeI	150772	32.67%	307.3253 ± 14.0636	125.2701 ± 83.1374	133.2757 ± 55.3968
968F	1406R	TaqI	150035	32.51%	438.9869 ± 13.4478	298.8212 ± 113.3480	101.0533 ± 64.6942
786F	926R	RsaI	149857	32.47%	141.0410 ± 11.7543	100.0206 ± 18.3608	35.3639 ± 3.6015
517F	907R	Sau96I	149152	32.32%	410.3332 ± 13.8051	182.6732 ± 90.1750	198.8380 ± 88.0916
517F	939R	EcoRI	149073	32.30%	423.5303 ± 10.9675	157.8173 ± 5.6928	265.1041 ± 7.8353
343F	926R	Sau96I	148491	32.18%	572.5085 ± 16.1553	267.2832 ± 140.8026	236.4930 ± 125.6709
341F	926R	Sau96I	148006	32.07%	574.5252 ± 16.1664	269.2070 ± 140.7284	236.4669 ± 125.5647
517F	806R	BfaI	147616	31.99%	290.3023 ± 13.8283	122.5005 ± 49.5313	152.7970 ± 46.1991
1055F	1389R	TaqI	145175	31.46%	351.5857 ± 13.7177	256.2256 ± 37.2941	88.4724 ± 21.6938
343F	1389R	HhaI	144284	31.26%	1053.1531 ± 18.8934	254.2175 ± 244.0513	246.4548 ± 108.0715
341F	1389R	HhaI	143557	31.11%	1055.1855 ± 18.8548	255.7935 ± 243.9101	246.3044 ± 108.0760
1055F	1406R	RsaI	142676	30.92%	352.6302 ± 19.5380	189.9579 ± 24.6822	158.0282 ± 24.3568
1099F	1389R	TaqI	142346	30.84%	307.6119 ± 14.2428	212.9799 ± 35.3014	88.1974 ± 20.5566
343F	939R	TaqI	142113	30.79%	587.7091 ± 16.5690	330.6717 ± 133.4064	196.7368 ± 121.5100
1055F	1387R	BstUI	142015	30.77%	331.6420 ± 11.0282	232.4231 ± 60.5580	41.5916 ± 51.3473
341F	939R	TaqI	141870	30.74%	589.7264 ± 16.5724	332.6461 ± 133.3981	196.7916 ± 121.5439
968F	1389R	TaqI	141114	30.58%	438.9931 ± 13.5901	299.3086 ± 112.9393	100.2031 ± 63.0007
1099F	1387R	BstUI	139812	30.30%	287.6862 ± 10.6241	189.9199 ± 57.8131	41.4687 ± 50.7712
1099F	1406R	RsaI	139340	30.19%	308.1602 ± 14.1945	146.0741 ± 22.6528	158.0454 ± 23.0677
341F	1389R	Sau96I	138335	29.98%	1055.1121 ± 18.8134	408.6423 ± 182.3165	293.6909 ± 139.5980
343F	1387R	HhaI	137723	29.84%	1032.3184 ± 16.9253	290.0962 ± 258.2153	226.5082 ± 109.9734
341F	1387R	HhaI	137462	29.79%	1034.3270 ± 16.9046	292.0718 ± 258.2169	226.4354 ± 109.9265
343F	806R	Sau96I	135045	29.26%	454.9434 ± 18.1568	260.2328 ± 135.4534	148.1652 ± 114.8998

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>Nº de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
341F	806R	Sau961	134976	29.25%	456.9370 ± 18.1428	262.4532 ± 135.4158	147.9777 ± 114.7882
786F	939R	HaeIII	134518	29.15%	154.1282 ± 11.5573	117.4638 ± 29.3206	10.0000 ± .0000
786F	939R	Sau961	134518	29.15%	154.1282 ± 11.5573	133.1746 ± 28.4683	12.3198 ± 5.0444
517F	926R	TaqI	133736	28.98%	410.3613 ± 12.4421	218.3913 ± 85.1267	165.7042 ± 77.8230
968F	1406R	RsaI	133026	28.83%	439.6061 ± 14.2577	238.7371 ± 86.4369	167.1499 ± 46.8275
1055F	1387R	DdeI	131036	28.39%	332.3193 ± 11.7342	169.7848 ± 83.0876	115.7969 ± 56.0245
341F	518R	HaeIII	130858	28.36%	185.4298 ± 17.7092	77.8224 ± 12.8349	102.1859 ± 22.3049
341F	536R	HaeIII	130851	28.35%	187.4255 ± 17.5146	77.8241 ± 12.8295	104.1887 ± 22.2959
343F	518R	HaeIII	130495	28.28%	183.4182 ± 17.7265	75.8413 ± 12.8858	102.1641 ± 22.3207
343F	536R	HaeIII	130490	28.28%	185.4138 ± 17.5314	75.8430 ± 12.8804	104.1669 ± 22.3116
786F	939R	RsaI	129654	28.09%	154.1265 ± 11.7603	101.4185 ± 16.4805	48.2725 ± 3.1829
1099F	1387R	DdeI	129374	28.03%	288.3496 ± 11.3475	126.6382 ± 82.8324	115.4389 ± 55.6183
968F	1387R	DdeI	129262	28.01%	419.5310 ± 12.1426	228.0394 ± 104.6449	127.2700 ± 73.8558
1099F	1406R	AluI	128413	27.83%	307.7065 ± 14.8855	172.3590 ± 57.6932	109.0991 ± 45.3350
1055F	1387R	HaeIII	127792	27.69%	332.0377 ± 11.9673	152.5210 ± 35.8605	161.9892 ± 28.7512
341F	939R	HaeIII	127161	27.55%	588.5573 ± 15.2154	231.3350 ± 208.4115	10.0000 ± .0000
1099F	1387R	HaeIII	124626	27.01%	288.1027 ± 11.5996	111.8707 ± 28.0362	161.5672 ± 28.0446
517F	926R	Sau961	124498	26.98%	410.3069 ± 13.0108	176.7469 ± 89.9285	200.7302 ± 89.3501
786F	907R	AluI	120174	26.04%	141.4120 ± 14.2381	69.9093 ± 13.2572	67.1266 ± 9.2869
341F	806R	TaqI	118818	25.75%	454.0434 ± 19.1363	297.8171 ± 110.4986	130.5935 ± 103.7321
343F	806R	TaqI	118729	25.73%	452.0589 ± 19.1611	295.5937 ± 110.5392	130.7703 ± 103.8081
517F	939R	TaqI	118010	25.57%	423.3573 ± 13.2719	214.7220 ± 90.6694	172.1523 ± 89.8338
968F	1387R	HaeIII	117230	25.40%	419.3491 ± 12.8075	185.2400 ± 95.2627	167.8761 ± 45.4432
1099F	1389R	AluI	116453	25.23%	307.7056 ± 15.3744	171.7870 ± 56.5971	110.3541 ± 44.9793
27F	907R	DdeI	116393	25.22%	906.0211 ± 22.7615	16.0000 ± .0000	205.7612 ± 147.2503
27F	907R	BstUI	116383	25.22%	906.0209 ± 22.7620	197.0338 ± 121.2989	248.7451 ± 148.7401
27F	907R	MspI	116220	25.18%	906.0347 ± 22.7368	275.7848 ± 160.2909	250.6388 ± 121.5817
27F	907R	Sau961	116109	25.16%	906.0101 ± 22.7453	237.4299 ± 74.4335	367.1871 ± 206.4758

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>Nº de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
27F	907R	RsaI	115596	25.05%	906.0165 ± 22.7706	427.5859 ± 230.3546	52.0164 ± 87.7110
27F	907R	HaeIII	115147	24.95%	906.0782 ± 22.7704	205.4511 ± 105.3744	256.9940 ± 231.0153
27F	907R	AluI	114316	24.77%	905.9410 ± 22.8975	182.9133 ± 122.2126	215.0952 ± 216.2007
8F	907R	DdeI	114038	24.71%	906.2229 ± 22.5995	16.0000 ± .0000	206.0415 ± 147.2879
8F	907R	BstUI	114029	24.71%	906.2229 ± 22.6000	196.7126 ± 121.3148	248.9124 ± 148.6431
8F	907R	MspI	113867	24.67%	906.2373 ± 22.5737	275.2416 ± 160.2597	249.8474 ± 121.3554
968F	1387R	TaqI	113840	24.67%	419.4864 ± 12.1804	297.0121 ± 114.1747	82.6144 ± 65.7792
8F	907R	Sau96I	113758	24.65%	906.2117 ± 22.5827	237.1714 ± 74.3167	367.5057 ± 206.8320
27F	907R	TaqI	113671	24.63%	906.0623 ± 22.6807	84.0552 ± 125.6454	430.8147 ± 323.1311
27F	907R	BfaI	113669	24.63%	905.9169 ± 22.8560	289.1817 ± 228.5953	216.8861 ± 214.6082
1055F	1387R	TaqI	113366	24.57%	332.3482 ± 12.2161	255.2962 ± 37.8010	70.3113 ± 23.2952
8F	907R	RsaI	113275	24.55%	906.2173 ± 22.6087	428.7897 ± 229.5800	52.0670 ± 87.9578
8F	907R	HaeIII	112829	24.45%	906.2816 ± 22.6051	205.5778 ± 105.3821	256.6796 ± 231.1355
8F	907R	AluI	111972	24.26%	906.1433 ± 22.7372	182.8248 ± 122.5280	216.0796 ± 217.0888
517F	1492R	BstUI	111558	24.17%	992.9750 ± 22.9444	12.4330 ± 23.1079	241.0929 ± 155.2267
517F	1492R	BfaI	111555	24.17%	992.9777 ± 22.8067	251.7138 ± 227.5239	143.6439 ± 56.2312
517F	1492R	RsaI	111544	24.17%	992.9807 ± 22.8069	324.3598 ± 129.3979	111.9845 ± 33.2039
517F	1492R	AluI	111527	24.17%	992.9720 ± 22.9432	270.0385 ± 164.5376	214.7298 ± 154.3759
8F	907R	TaqI	111418	24.14%	906.2641 ± 22.5171	82.7930 ± 122.9087	428.8992 ± 323.0071
517F	1492R	MspI	111409	24.14%	992.9573 ± 22.6485	151.5117 ± 196.0731	122.6500 ± 71.2894
517F	1492R	TaqI	111402	24.14%	992.9722 ± 22.9584	326.8223 ± 135.3426	241.3093 ± 171.8308
8F	907R	BfaI	111368	24.13%	906.1217 ± 22.6929	288.6971 ± 228.7648	217.2844 ± 215.3852
517F	1492R	HhaI	111310	24.12%	992.9856 ± 22.7915	222.1196 ± 220.9269	251.4267 ± 165.7891
517F	1492R	Sau96I	111144	24.08%	992.9734 ± 22.8253	291.9417 ± 136.0851	301.1503 ± 145.6561
1099F	1387R	TaqI	110871	24.02%	288.3766 ± 11.7285	211.7345 ± 36.5655	70.2222 ± 22.8328
343F	1492R	BstUI	110855	24.02%	1155.3006 ± 21.1963	63.7385 ± 22.2865	243.0674 ± 155.7817
343F	1492R	RsaI	110854	24.02%	1155.3011 ± 21.1962	217.8282 ± 167.9528	112.0715 ± 34.2947
343F	1492R	MspI	110847	24.02%	1155.3002 ± 21.1962	158.8888 ± 60.0072	121.4604 ± 73.1680

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>Nº de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
343F	1492R	BfaI	110840	24.02%	1155.2981 ± 21.1975	387.1410 ± 243.2049	143.4941 ± 55.2200
343F	1492R	AluI	110834	24.02%	1155.3005 ± 21.1979	295.2595 ± 200.7224	214.8187 ± 154.1022
343F	1492R	Sau96I	110733	23.99%	1155.3206 ± 21.0334	400.3908 ± 183.6325	300.9569 ± 142.7150
343F	1492R	TaqI	110711	23.99%	1155.3035 ± 21.1921	446.5519 ± 177.8254	237.9853 ± 169.2967
341F	1492R	RsaI	110199	23.88%	1157.3618 ± 21.1096	219.4614 ± 167.1445	112.0768 ± 33.9666
341F	1492R	BstUI	110198	23.88%	1157.3617 ± 21.1097	65.7265 ± 22.2279	242.7519 ± 155.3362
341F	1492R	MspI	110192	23.88%	1157.3612 ± 21.1099	160.4056 ± 59.6611	121.0107 ± 71.0703
341F	1492R	BfaI	110183	23.88%	1157.3591 ± 21.1109	389.5336 ± 243.5491	143.4790 ± 55.0387
341F	1492R	AluI	110177	23.87%	1157.3616 ± 21.1114	297.0712 ± 200.4575	214.6673 ± 154.0804
341F	1492R	Sau96I	110089	23.86%	1157.3795 ± 20.9500	402.4876 ± 183.3349	300.6288 ± 142.4543
341F	1492R	TaqI	110063	23.85%	1157.3623 ± 21.1062	448.3974 ± 177.7911	237.4846 ± 169.0204
1055F	1387R	RsaI	108910	23.60%	333.1419 ± 11.9286	190.0870 ± 18.9700	140.2435 ± 16.2300
27F	1406R	DdeI	108805	23.58%	1385.7279 ± 27.7170	16.0000 ± .0000	261.5745 ± 247.5365
27F	1406R	BstUI	108801	23.58%	1385.7293 ± 27.7165	200.8722 ± 122.7294	135.7218 ± 146.5840
27F	1406R	AluI	108800	23.58%	1385.7278 ± 27.7175	195.3347 ± 159.3178	200.1217 ± 122.8838
27F	1406R	TaqI	108780	23.57%	1385.7322 ± 27.7122	107.1681 ± 184.5235	211.4501 ± 178.6023
27F	1406R	Sau96I	108776	23.57%	1385.7272 ± 27.7167	239.0300 ± 83.8683	295.4933 ± 156.1069
27F	1406R	BfaI	108773	23.57%	1385.7233 ± 27.7187	310.3899 ± 268.7170	65.5007 ± 43.4889
27F	1406R	MspI	108771	23.57%	1385.7431 ± 27.6851	279.6510 ± 166.4703	40.8151 ± 88.8606
27F	1406R	RsaI	108591	23.53%	1385.7449 ± 27.7050	431.1017 ± 240.1132	302.3387 ± 186.9679
517F	1492R	HaeIII	108331	23.47%	992.9984 ± 23.0668	317.0359 ± 163.1095	146.7184 ± 113.5165
343F	1492R	HaeIII	108120	23.43%	1155.4585 ± 21.2999	223.9034 ± 227.4620	148.9911 ± 128.6933
517F	1492R	DdeI	108047	23.41%	993.0258 ± 23.0602	262.5263 ± 141.6140	251.1693 ± 213.3285
343F	1492R	DdeI	107787	23.36%	1155.1097 ± 21.1379	343.6777 ± 182.1537	259.7659 ± 219.1758
341F	1492R	HaeIII	107476	23.29%	1157.5015 ± 21.7358	226.1348 ± 227.5481	147.9076 ± 125.6224
1099F	1387R	RsaI	107385	23.27%	289.1729 ± 11.4670	146.1951 ± 18.2116	140.2319 ± 16.1217
341F	1492R	DdeI	107138	23.22%	1157.1717 ± 21.0485	346.0366 ± 182.1715	260.1699 ± 219.0899
27F	518R	BstUI	106806	23.14%	514.8926 ± 22.1179	201.7985 ± 121.3145	7.0000 ± .0000

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>Nº de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
27F	518R	DdeI	106806	23.14%	514.8926 ± 22.1179	16.0000 ± .0000	167.3764 ± 66.7959
27F	536R	BstUI	106711	23.12%	516.8924 ± 22.1140	201.8133 ± 121.3125	9.0000 ± .0000
27F	536R	DdeI	106711	23.12%	516.8924 ± 22.1140	16.0000 ± .0000	169.3663 ± 66.8000
968F	1387R	RsaI	106501	23.08%	420.3581 ± 12.4447	234.4239 ± 88.6407	150.5670 ± 47.4594
27F	907R	HhaI	106282	23.03%	906.8151 ± 22.3612	272.2704 ± 195.9690	327.8562 ± 224.4452
786F	926R	BfaI	106279	23.03%	141.4051 ± 13.6352	40.0138 ± 7.0239	100.2546 ± 6.7147
27F	518R	Sau96I	106274	23.03%	514.8665 ± 22.0990	238.0934 ± 69.8786	161.9820 ± 54.7847
27F	536R	Sau96I	106181	23.01%	516.8658 ± 22.0951	238.0840 ± 69.8741	163.7637 ± 55.0854
786F	907R	BfaI	106040	22.98%	141.3792 ± 13.3731	40.1764 ± 7.2079	100.1299 ± 6.7504
8F	1406R	DdeI	105949	22.96%	1385.9900 ± 27.6575	16.0000 ± .0000	262.1149 ± 247.7613
8F	1406R	BstUI	105945	22.96%	1385.9914 ± 27.6570	200.3757 ± 122.7417	134.9987 ± 146.1885
8F	1406R	AluI	105944	22.96%	1385.9899 ± 27.6580	195.5486 ± 160.2499	200.5846 ± 122.9234
8F	1406R	TaqI	105926	22.95%	1385.9937 ± 27.6528	105.6837 ± 182.2206	212.5838 ± 178.8974
8F	1406R	Sau96I	105920	22.95%	1385.9893 ± 27.6572	238.6921 ± 83.8487	296.3485 ± 156.5205
8F	1406R	BfaI	105917	22.95%	1385.9853 ± 27.6593	309.6797 ± 269.0254	65.5362 ± 43.7387
8F	1406R	MspI	105916	22.95%	1386.0058 ± 27.6243	278.8710 ± 166.4575	40.8421 ± 89.0395
8F	1406R	HaeIII	105871	22.94%	1386.0021 ± 27.6338	211.3723 ± 131.0248	131.2077 ± 248.5402
8F	518R	DdeI	105806	22.93%	514.9878 ± 22.0053	16.0000 ± .0000	167.1008 ± 66.9923
8F	518R	BstUI	105805	22.93%	514.9876 ± 22.0054	201.7533 ± 121.4050	7.0000 ± .0000
8F	1406R	RsaI	105745	22.91%	1386.0070 ± 27.6446	432.7437 ± 238.9978	302.5521 ± 186.9506
8F	536R	DdeI	105703	22.90%	516.9892 ± 22.0005	16.0000 ± .0000	169.0899 ± 66.9979
8F	536R	BstUI	105702	22.90%	516.9890 ± 22.0005	201.7643 ± 121.4040	9.0000 ± .0000
517F	806R	AluI	105610	22.88%	290.3884 ± 16.3065	121.8605 ± 58.5328	149.6371 ± 61.8629
8F	518R	Sau96I	105282	22.81%	514.9617 ± 21.9854	237.8879 ± 69.7564	162.2464 ± 54.5197
8F	536R	Sau96I	105181	22.79%	516.9627 ± 21.9805	237.8823 ± 69.7446	164.0359 ± 54.8204
8F	907R	HhaI	104342	22.61%	906.9363 ± 22.2576	272.0652 ± 196.0215	327.9581 ± 224.5838
27F	518R	HaeIII	104112	22.56%	515.0098 ± 22.2284	201.2386 ± 95.7113	150.3014 ± 68.8594
27F	536R	HaeIII	104020	22.54%	517.0082 ± 22.2257	201.2312 ± 95.7209	152.3092 ± 68.8590



<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>Nº de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
8F	518R	HaeIII	103148	22.35%	515.1081 ± 22.1122	201.2946 ± 95.7180	150.5719 ± 68.8296
8F	536R	HaeIII	103048	22.33%	517.1083 ± 22.1085	201.2899 ± 95.7296	152.5818 ± 68.8301
27F	518R	AluI	102263	22.16%	514.7566 ± 22.4314	170.3298 ± 92.2621	189.6303 ± 107.5291
27F	536R	AluI	102174	22.14%	516.7557 ± 22.4259	170.3144 ± 92.2729	191.6501 ± 107.5453
27F	806R	DdeI	101766	22.05%	787.7647 ± 21.2531	16.0000 ± .0000	137.4976 ± 157.1946
27F	806R	BstUI	101746	22.05%	787.7638 ± 21.2540	197.0194 ± 120.5788	214.6613 ± 94.1471
27F	806R	Sau961	101635	22.02%	787.7673 ± 21.2452	235.6114 ± 70.0660	292.3448 ± 179.7751
27F	806R	MspI	101627	22.02%	787.7699 ± 21.2463	274.9060 ± 160.5681	183.5542 ± 75.3552
27F	518R	TaqI	101409	21.97%	514.6934 ± 22.0704	62.5482 ± 44.5263	390.2624 ± 119.4718
27F	536R	TaqI	101325	21.96%	516.6923 ± 22.0665	62.5347 ± 44.4818	392.2602 ± 119.4751
8F	518R	AluI	101285	21.95%	514.8552 ± 22.3187	170.3126 ± 92.6212	189.8323 ± 107.7687
517F	806R	Sau961	101274	21.94%	290.4313 ± 16.7258	168.2694 ± 78.8148	109.2816 ± 73.2734
8F	536R	AluI	101187	21.93%	516.8560 ± 22.3124	170.2962 ± 92.6345	191.8545 ± 107.7794
27F	518R	MspI	100764	21.83%	514.9421 ± 21.8998	259.9409 ± 151.5016	85.6407 ± 116.6050
27F	536R	MspI	100678	21.82%	516.9393 ± 21.8969	260.0349 ± 151.5193	87.6302 ± 116.5790
8F	518R	TaqI	100582	21.80%	514.7655 ± 21.9712	62.3497 ± 44.2791	390.6378 ± 119.3326
8F	536R	TaqI	100491	21.78%	516.7667 ± 21.9667	62.3370 ± 44.2348	392.6357 ± 119.3399
8F	806R	DdeI	100315	21.74%	787.8115 ± 21.2034	16.0000 ± .0000	137.4879 ± 157.0057
8F	806R	BstUI	100296	21.73%	787.8108 ± 21.2042	197.1766 ± 120.7960	214.8722 ± 94.0734
8F	806R	Sau961	100185	21.71%	787.8143 ± 21.1952	235.5186 ± 69.8669	292.9110 ± 179.7147
27F	806R	HaeIII	100183	21.71%	787.8179 ± 21.3102	201.7231 ± 101.8661	298.4618 ± 176.5944
8F	806R	MspI	100175	21.71%	787.8168 ± 21.1964	274.5171 ± 160.4665	183.2937 ± 75.2233
8F	518R	MspI	99821	21.63%	515.0405 ± 21.7877	259.5455 ± 151.4565	85.7989 ± 116.6762
1055F	1492R	AluI	99754	21.62%	454.3332 ± 22.9003	13.9969 ± .1763	214.9410 ± 154.2124
8F	536R	MspI	99727	21.61%	517.0393 ± 21.7838	259.6294 ± 151.4706	87.7913 ± 116.6530
27F	926R	DdeI	99705	21.60%	905.6761 ± 23.0007	16.0000 ± .0000	210.2299 ± 149.4386
27F	926R	BstUI	99694	21.60%	905.6763 ± 23.0015	175.6293 ± 110.1487	254.4468 ± 146.2900
27F	926R	MspI	99528	21.57%	905.6895 ± 22.9751	256.4139 ± 152.5397	247.6554 ± 119.8597

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>Nº de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
27F	926R	Sau96I	99422	21.54%	905.6635 ± 22.9821	241.4504 ± 76.7813	368.9932 ± 208.0159
1055F	1492R	RsaI	99378	21.53%	454.3678 ± 22.8421	245.2142 ± 73.8685	110.3924 ± 20.0172
1055F	1492R	BfaI	99319	21.52%	454.3824 ± 22.8260	228.0159 ± 91.7644	141.6548 ± 47.4708
27F	806R	AluI	99214	21.50%	787.6740 ± 21.4114	177.4289 ± 114.4185	326.2217 ± 175.0128
786F	1492R	RsaI	99055	21.46%	724.2641 ± 23.8578	112.2205 ± 69.9624	112.0440 ± 31.4395
786F	1492R	AluI	99040	21.46%	724.2621 ± 23.8634	134.9867 ± 97.6429	218.1194 ± 156.4549
786F	1492R	BfaI	99021	21.46%	724.2669 ± 23.8389	179.5289 ± 210.6318	143.3044 ± 52.9887
1055F	1492R	HhaI	99019	21.46%	454.3243 ± 22.9211	57.8120 ± 32.7375	264.7171 ± 158.8132
1055F	1492R	MspI	98984	21.45%	454.3433 ± 22.8224	140.8575 ± 81.9698	118.6804 ± 51.6853
27F	926R	RsaI	98930	21.44%	905.6719 ± 23.0100	406.3645 ± 210.0001	55.0417 ± 94.8589
27F	806R	TaqI	98899	21.43%	787.7053 ± 21.2148	75.3624 ± 102.0767	413.5164 ± 303.9903
786F	1492R	TaqI	98853	21.42%	724.2572 ± 23.8814	151.6982 ± 59.0422	232.8334 ± 166.6051
8F	806R	HaeIII	98774	21.40%	787.8645 ± 21.2585	201.9106 ± 101.8488	298.7087 ± 176.6535
786F	1492R	MspI	98717	21.39%	724.2268 ± 23.7004	279.6328 ± 164.8431	119.7080 ± 57.8434
786F	1492R	BstUI	98685	21.38%	724.2530 ± 23.7327	151.1823 ± 62.2509	234.7034 ± 147.9852
786F	1492R	HhaI	98580	21.36%	724.2565 ± 23.8805	252.4074 ± 113.4464	262.6728 ± 160.7362
27F	926R	HaeIII	98458	21.33%	905.7401 ± 23.0155	221.0946 ± 96.8268	282.4014 ± 231.7760
786F	1492R	Sau96I	98454	21.33%	724.2419 ± 23.9170	135.8112 ± 47.6613	295.8187 ± 143.6713
8F	926R	DdeI	98046	21.25%	905.7486 ± 22.9415	16.0000 ± .0000	210.5369 ± 149.3975
8F	926R	BstUI	98036	21.24%	905.7490 ± 22.9423	175.5307 ± 110.1982	255.0798 ± 146.1369
1099F	1387R	AluI	97875	21.21%	288.7233 ± 12.2017	172.2244 ± 58.8688	89.9235 ± 45.4246
8F	926R	MspI	97871	21.21%	905.7629 ± 22.9154	255.8720 ± 152.3601	247.5023 ± 119.7802
8F	806R	AluI	97779	21.19%	787.7214 ± 21.3630	177.4152 ± 114.7124	326.8385 ± 175.0839
8F	926R	Sau96I	97767	21.19%	905.7356 ± 22.9225	241.3553 ± 76.5957	369.4844 ± 208.0571
27F	926R	AluI	97624	21.15%	905.5743 ± 23.1631	193.0480 ± 126.0922	234.9640 ± 224.5382
8F	806R	TaqI	97535	21.13%	787.7534 ± 21.1624	75.1033 ± 101.6695	412.3353 ± 304.3421
1099F	1492R	HhaI	97404	21.11%	409.7063 ± 15.9102	10.0000 ± .0000	268.6106 ± 157.8256
8F	926R	RsaI	97302	21.08%	905.7421 ± 22.9518	406.4143 ± 209.8328	55.0292 ± 94.9619

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>N° de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
517F	806R	HaeIII	97187	21.06%	290.4659 ± 17.0247	174.0749 ± 67.4449	97.5300 ± 58.2493
27F	926R	TaqI	97147	21.05%	905.7160 ± 22.9042	86.8801 ± 130.7591	424.7969 ± 317.6811
27F	926R	BfaI	97000	21.02%	905.5473 ± 23.1132	300.1079 ± 239.4053	216.5482 ± 220.6916
1099F	1492R	RsaI	96978	21.01%	409.7514 ± 15.7878	200.8872 ± 73.1998	110.3541 ± 19.4922
1099F	1492R	BfaI	96924	21.00%	409.7507 ± 15.7672	184.8875 ± 90.8628	141.6880 ± 47.5383
8F	926R	HaeIII	96835	20.98%	905.8126 ± 22.9542	221.3012 ± 96.6811	282.6414 ± 231.8273
1099F	1492R	MspI	96675	20.95%	409.7260 ± 15.7643	103.2641 ± 83.2806	117.0211 ± 48.7832
8F	926R	AluI	95975	20.80%	905.6453 ± 23.1058	192.9991 ± 126.2282	235.9787 ± 225.0933
27F	1389R	DdeI	95601	20.72%	1385.1554 ± 26.7079	16.0000 ± .0000	261.6073 ± 245.9757
27F	1389R	RsaI	95601	20.72%	1385.1554 ± 26.7079	436.2488 ± 247.2833	13.0000 ± .0000
27F	1389R	BstUI	95598	20.72%	1385.1568 ± 26.7073	203.7392 ± 122.9137	137.4952 ± 146.0077
27F	1389R	AluI	95596	20.71%	1385.1554 ± 26.7084	189.8469 ± 149.3616	203.5135 ± 121.6017
27F	1389R	BfaI	95584	20.71%	1385.1527 ± 26.7090	309.2072 ± 265.8295	65.0357 ± 40.1554
27F	1389R	TaqI	95581	20.71%	1385.1608 ± 26.7020	108.2577 ± 185.6627	199.7453 ± 171.4466
27F	1389R	MspI	95571	20.71%	1385.1665 ± 26.6864	284.7322 ± 169.0256	39.0606 ± 81.7788
8F	926R	TaqI	95563	20.71%	905.7839 ± 22.8487	85.3228 ± 127.5364	423.9197 ± 317.7040
786F	1492R	HaeIII	95539	20.70%	724.2628 ± 24.2441	148.6457 ± 104.1927	138.5827 ± 96.1349
27F	1389R	HaeIII	95527	20.70%	1385.1620 ± 26.6970	206.7158 ± 133.9167	112.9607 ± 224.2993
8F	926R	BfaI	95395	20.67%	905.6202 ± 23.0540	299.9506 ± 239.4696	216.8740 ± 221.0796
786F	907R	HaeIII	95103	20.61%	141.5576 ± 15.9482	95.6410 ± 26.6170	42.0859 ± 23.4529
786F	926R	AluI	95033	20.59%	141.4446 ± 14.4722	69.6634 ± 13.8763	67.6188 ± 10.1316
1055F	1492R	HaeIII	95024	20.59%	454.3807 ± 23.2962	175.6492 ± 72.2929	134.1332 ± 82.0546
27F	806R	BfaI	93341	20.23%	787.5407 ± 21.4736	253.2069 ± 195.6068	282.4078 ± 207.5123
27F	806R	HhaI	93218	20.20%	787.8722 ± 21.4825	255.5681 ± 180.2297	272.4572 ± 200.9057
8F	1389R	DdeI	92852	20.12%	1385.4365 ± 26.6084	16.0000 ± .0000	262.1727 ± 246.1780
8F	1389R	RsaI	92852	20.12%	1385.4365 ± 26.6084	438.1628 ± 246.0775	13.0000 ± .0000
8F	1389R	BstUI	92849	20.12%	1385.4379 ± 26.6077	203.2470 ± 122.9464	136.7426 ± 145.5350
8F	1389R	AluI	92847	20.12%	1385.4364 ± 26.6090	190.0092 ± 150.2382	204.1036 ± 121.6140

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>Nº de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
8F	1389R	BfaI	92835	20.12%	1385.4338 ± 26.6096	308.4008 ± 266.0554	65.0712 ± 40.4080
8F	1389R	TaqI	92834	20.12%	1385.4412 ± 26.6026	106.7698 ± 183.3572	200.7340 ± 171.8426
8F	1389R	MspI	92823	20.11%	1385.4481 ± 26.5860	284.0586 ± 169.1244	39.1303 ± 82.0325
8F	1389R	HaeIII	92784	20.11%	1385.4434 ± 26.5964	206.7382 ± 134.0695	112.7275 ± 225.3588
1099F	1492R	HaeIII	92643	20.07%	409.7303 ± 16.0697	135.4152 ± 69.3685	132.3383 ± 80.7611
341F	518R	HhaI	92191	19.98%	184.7867 ± 20.3307	51.1804 ± 34.3518	125.6421 ± 44.1540
341F	536R	HhaI	92188	19.98%	186.7841 ± 20.0930	51.1780 ± 34.3526	127.6350 ± 44.1640
8F	806R	BfaI	92022	19.94%	787.5901 ± 21.4244	253.0490 ± 195.6994	282.7670 ± 207.7364
8F	806R	HhaI	91907	19.92%	787.9161 ± 21.4337	255.3006 ± 180.1608	272.8736 ± 201.1376
343F	518R	HhaI	91866	19.91%	182.7950 ± 20.3566	49.1810 ± 34.3622	125.6676 ± 44.1481
343F	536R	HhaI	91865	19.91%	184.7921 ± 20.1181	49.1788 ± 34.3628	127.6557 ± 44.1665
27F	926R	HhaI	91724	19.88%	905.9105 ± 23.0920	264.6518 ± 200.3299	329.4239 ± 234.5715
1055F	1492R	Sau961	91685	19.87%	454.3990 ± 23.6490	212.0221 ± 90.1464	142.1280 ± 74.6425
1055F	1387R	Sau961	90919	19.70%	331.3453 ± 13.7596	152.4844 ± 26.0108	171.7017 ± 30.3015
786F	939R	AluI	90835	19.68%	154.4986 ± 13.7929	71.1184 ± 12.5898	79.5021 ± 9.3035
8F	926R	HhaI	90216	19.55%	905.9787 ± 23.0377	264.3794 ± 200.3117	330.2408 ± 234.7022
1099F	1492R	Sau961	90056	19.51%	409.7154 ± 16.2061	167.9218 ± 89.2892	141.6721 ± 74.1545
63F	907R	DdeI	89461	19.39%	866.2831 ± 25.5040	197.7795 ± 81.2729	182.1301 ± 127.4534
63F	907R	BstUI	89456	19.38%	866.2804 ± 25.5046	197.1280 ± 138.5521	254.2325 ± 153.1687
63F	907R	Sau961	89407	19.37%	866.2952 ± 25.4991	189.5077 ± 61.9000	356.9456 ± 194.8823
63F	907R	MspI	89337	19.36%	866.3095 ± 25.5018	265.1283 ± 179.8226	242.5545 ± 141.3905
63F	907R	RsaI	89323	19.36%	866.2844 ± 25.5090	455.6669 ± 246.5925	37.8309 ± 33.5612
63F	907R	TaqI	88834	19.25%	866.2885 ± 25.5305	41.3477 ± 111.3961	398.1578 ± 326.0828
63F	907R	AluI	88661	19.21%	866.1696 ± 25.5737	136.5965 ± 134.8949	162.3839 ± 174.6434
1099F	1387R	Sau961	88627	19.20%	287.3503 ± 13.3410	108.8586 ± 25.0780	171.4422 ± 30.1616
63F	907R	HaeIII	88466	19.17%	866.1774 ± 25.6012	103.4554 ± 126.4667	212.3129 ± 222.9999
968F	1387R	Sau961	88304	19.13%	418.8611 ± 14.5179	184.3973 ± 89.4109	200.8978 ± 75.4776
27F	806R	RsaI	88082	19.09%	787.4995 ± 20.6430	372.5349 ± 164.0223	273.8576 ± 124.9134

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>N° de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
786F	1492R	DdeI	88026	19.07%	724.2697 ± 25.1035	313.6497 ± 193.9844	210.6539 ± 164.0762
517F	806R	TaqI	87964	19.06%	290.3890 ± 17.7687	175.6424 ± 64.4157	99.9739 ± 62.1596
968F	1492R	AluI	87418	18.94%	542.3852 ± 16.2437	96.1729 ± 25.7245	223.7268 ± 157.4242
968F	1492R	BfaI	87379	18.93%	542.3926 ± 16.2093	263.2001 ± 138.8375	150.0084 ± 39.8683
968F	1492R	RsaI	87343	18.93%	542.4047 ± 16.1261	304.9819 ± 112.1487	112.9613 ± 17.1838
968F	1492R	BstUI	87299	18.92%	542.3923 ± 16.2494	5.9523 ± 23.7353	240.2712 ± 146.3864
968F	1492R	MspI	87264	18.91%	542.3815 ± 16.2403	175.8536 ± 102.1837	119.5041 ± 49.8369
968F	1492R	HhaI	87105	18.87%	542.3756 ± 16.2374	117.9841 ± 55.6904	272.0846 ± 160.3552
27F	518R	RsaI	86871	18.82%	514.1550 ± 21.9483	346.4264 ± 156.2279	69.8941 ± 77.3676
8F	806R	RsaI	86830	18.82%	787.5183 ± 20.6103	372.5944 ± 163.6506	274.1830 ± 124.6748
27F	536R	RsaI	86790	18.81%	516.1530 ± 21.9460	346.4544 ± 156.2256	71.8683 ± 77.3098
786F	939R	BfaI	86389	18.72%	154.4789 ± 14.0192	40.5088 ± 7.0714	112.9816 ± 7.0379
8F	518R	RsaI	86093	18.66%	514.2468 ± 21.8302	347.3328 ± 155.5555	69.8120 ± 77.1662
8F	536R	RsaI	86004	18.64%	516.2474 ± 21.8257	347.3757 ± 155.5373	71.7872 ± 77.1022
27F	907R	EcoRI	84522	18.31%	906.9180 ± 21.9046	644.8868 ± 74.1879	254.2627 ± 39.0680
63F	907R	HhaI	84016	18.21%	866.9158 ± 25.3241	210.7686 ± 173.8757	339.1481 ± 221.9349
968F	1492R	HaeIII	83213	18.03%	542.3934 ± 16.4480	226.4318 ± 116.5613	132.3529 ± 81.4949
63F	806R	DdeI	83161	18.02%	747.4861 ± 25.0855	200.5629 ± 78.2068	98.9295 ± 124.3737
63F	806R	BstUI	83144	18.02%	747.4801 ± 25.0875	192.7644 ± 138.3221	243.2923 ± 68.3277
8F	907R	EcoRI	83125	18.01%	906.9805 ± 21.8437	644.9927 ± 74.0555	254.2117 ± 38.7819
63F	806R	Sau96I	83119	18.01%	747.4871 ± 25.0869	187.3065 ± 61.4359	278.9567 ± 178.8923
63F	806R	MspI	83044	17.99%	747.5083 ± 25.0853	265.4657 ± 180.0455	188.8420 ± 83.3767
63F	907R	BfaI	82712	17.92%	865.1979 ± 26.0758	227.0926 ± 169.1206	254.6892 ± 199.8950
63F	806R	TaqI	81901	17.75%	747.3670 ± 25.1623	35.1598 ± 88.6509	421.9168 ± 301.4536
63F	806R	HaeIII	81880	17.74%	747.2990 ± 25.2119	99.8481 ± 117.7472	280.7007 ± 190.2719
63F	806R	AluI	81862	17.74%	747.3131 ± 25.2142	132.4158 ± 125.3609	289.7013 ± 178.0687
343F	1492R	EcoRI	81507	17.66%	1155.9650 ± 21.2365	328.2114 ± 76.5939	810.7710 ± 117.4802
1055F	1492R	BstUI	81202	17.60%	454.3066 ± 24.7150	222.2024 ± 61.5264	174.9095 ± 66.1877

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>Nº de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
968F	1492R	Sau96I	81168	17.59%	542.3588 ± 16.5830	257.7972 ± 127.7871	147.0907 ± 83.6024
341F	1492R	EcoRI	81056	17.56%	1158.0394 ± 21.1804	330.2246 ± 76.3493	810.8448 ± 117.3397
27F	518R	HhaI	81006	17.55%	515.5574 ± 21.4752	199.5603 ± 116.2762	242.9188 ± 119.1745
341F	536R	AluI	80968	17.54%	185.7274 ± 21.9258	103.5016 ± 23.0901	77.7271 ± 24.8179
27F	536R	HhaI	80925	17.54%	517.5611 ± 21.4679	199.5592 ± 116.2513	244.9129 ± 119.1682
341F	518R	AluI	80921	17.53%	183.7331 ± 22.1790	103.5055 ± 23.0968	75.7223 ± 24.7893
343F	536R	AluI	80643	17.47%	183.7645 ± 21.9539	101.4294 ± 23.2142	77.8257 ± 24.9454
343F	518R	AluI	80596	17.46%	181.7698 ± 22.2094	101.4343 ± 23.2171	75.8196 ± 24.9171
1055F	1492R	DdeI	80539	17.45%	454.4652 ± 25.3029	186.9470 ± 99.8694	166.7508 ± 111.2798
63F	939R	DdeI	80502	17.44%	881.4280 ± 24.5898	203.8144 ± 77.1083	194.9527 ± 128.9150
63F	939R	BstUI	80499	17.44%	881.4248 ± 24.5911	198.8414 ± 139.0221	261.0977 ± 153.2581
63F	939R	HaeIII	80473	17.44%	881.4312 ± 24.5887	108.9416 ± 151.9284	10.0000 ± .0000
63F	939R	MspI	80471	17.44%	881.4305 ± 24.5859	271.9928 ± 181.4166	254.1081 ± 140.0183
8F	518R	HhaI	80390	17.42%	515.6015 ± 21.3899	199.5353 ± 116.1941	243.0813 ± 119.1653
63F	939R	RsaI	80377	17.42%	881.4340 ± 24.5932	463.4270 ± 249.9902	50.2136 ± 29.6180
27F	518R	BfaI	80308	17.40%	515.7633 ± 22.5673	174.1714 ± 97.7496	274.3069 ± 97.4500
8F	536R	HhaI	80306	17.40%	517.6040 ± 21.3831	199.5270 ± 116.1651	245.0864 ± 119.1611
27F	536R	BfaI	80255	17.39%	517.7651 ± 22.5600	174.1475 ± 97.7506	276.3336 ± 97.4291
517F	1492R	EcoRI	80160	17.37%	993.4910 ± 18.1129	167.7115 ± 77.6117	809.6826 ± 119.0187
63F	518R	BstUI	80088	17.35%	474.7474 ± 25.7045	191.5415 ± 137.2963	7.0000 ± .0000
63F	536R	BstUI	80066	17.35%	476.7548 ± 25.6427	191.5396 ± 137.2993	9.0000 ± .0000
63F	518R	DdeI	80007	17.34%	474.7375 ± 25.7089	197.6046 ± 79.2619	177.3877 ± 53.4675
63F	518R	Sau96I	80003	17.34%	474.7585 ± 25.7009	189.2807 ± 61.5999	158.5334 ± 58.9917
63F	536R	DdeI	79985	17.33%	476.7449 ± 25.6471	197.6081 ± 79.2625	179.3965 ± 53.4540
63F	536R	Sau96I	79983	17.33%	476.7657 ± 25.6389	189.2893 ± 61.5972	160.4022 ± 59.1556
63F	939R	TaqI	79972	17.33%	881.4478 ± 24.6058	43.0306 ± 115.7231	387.9420 ± 321.8220
63F	939R	AluI	79792	17.29%	881.3284 ± 24.6609	133.4016 ± 136.2112	175.2227 ± 177.5509
8F	518R	BfaI	79655	17.26%	515.7955 ± 22.5028	173.9158 ± 97.6787	274.6265 ± 97.3380

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>Nº de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
8F	536R	BfaI	79600	17.25%	517.7984 ± 22.4948	173.8837 ± 97.6788	276.6592 ± 97.3190
27F	1387R	DdeI	79190	17.16%	1367.4320 ± 24.8540	16.0000 ± .0000	248.0612 ± 261.1496
27F	1387R	MspI	79190	17.16%	1367.4320 ± 24.8540	267.4649 ± 157.0041	4.0000 ± .0000
27F	1387R	BstUI	79189	17.16%	1367.4323 ± 24.8540	189.5911 ± 116.5952	80.1257 ± 130.6208
27F	1387R	Sau96I	79188	17.16%	1367.4312 ± 24.8538	238.0776 ± 79.0641	305.7800 ± 142.0408
27F	1387R	AluI	79184	17.16%	1367.4322 ± 24.8547	203.3784 ± 173.3568	175.1142 ± 121.6604
27F	1387R	TaqI	79179	17.16%	1367.4311 ± 24.8538	96.2275 ± 165.5262	205.6843 ± 183.6893
27F	1387R	BfaI	79176	17.16%	1367.4307 ± 24.8554	313.9070 ± 271.8888	45.5665 ± 37.8154
27F	1387R	HaeIII	79173	17.16%	1367.4305 ± 24.8545	217.2160 ± 122.1865	285.8174 ± 238.2891
27F	1387R	RsaI	79118	17.14%	1367.4431 ± 24.8287	438.1160 ± 234.9515	281.7730 ± 178.5498
1099F	1492R	BstUI	78880	17.09%	409.5467 ± 16.7735	180.1660 ± 57.4445	175.1260 ± 65.0318
63F	518R	MspI	78755	17.07%	474.6754 ± 25.8068	257.3332 ± 178.1119	81.0488 ± 122.6866
63F	536R	MspI	78737	17.06%	476.6829 ± 25.7442	257.3386 ± 178.1253	83.0973 ± 122.7369
27F	1406R	EcoRI	78716	17.06%	1386.0642 ± 25.6507	654.3960 ± 96.0535	713.8331 ± 107.5674
63F	806R	HhaI	78611	17.03%	747.2844 ± 25.3659	200.3941 ± 158.3896	301.7165 ± 182.3086
1099F	1492R	DdeI	78490	17.01%	409.6687 ± 17.4957	143.1446 ± 99.4570	168.0656 ± 110.6617
27F	939R	DdeI	78221	16.95%	920.0749 ± 23.8150	16.0000 ± .0000	196.2195 ± 126.0327
27F	939R	HaeIII	78221	16.95%	920.0749 ± 23.8150	200.4221 ± 137.9961	10.0000 ± .0000
27F	939R	Sau96I	78221	16.95%	920.0749 ± 23.8150	233.2960 ± 76.5251	21.5372 ± 40.6624
27F	939R	BstUI	78217	16.95%	920.0752 ± 23.8151	199.3573 ± 123.6536	252.6974 ± 145.1100
27F	939R	MspI	78149	16.93%	920.0768 ± 23.8125	276.6887 ± 166.4335	253.6890 ± 125.2150
27F	939R	RsaI	77758	16.85%	920.0548 ± 23.8382	456.2939 ± 236.6297	64.0581 ± 84.0304
63F	518R	HaeIII	77710	16.84%	474.4537 ± 25.8519	95.7890 ± 106.7168	148.0846 ± 88.3646
63F	536R	HaeIII	77679	16.83%	476.4596 ± 25.7897	95.8180 ± 106.7351	150.1007 ± 88.3586
8F	1387R	DdeI	77580	16.81%	1367.6468 ± 24.6934	16.0000 ± .0000	248.6611 ± 261.4532
8F	1387R	BstUI	77579	16.81%	1367.6471 ± 24.6934	189.2145 ± 116.4852	80.1148 ± 130.6897
8F	1387R	AluI	77574	16.81%	1367.6470 ± 24.6941	203.8020 ± 174.2146	175.1074 ± 121.6804
8F	1387R	TaqI	77569	16.81%	1367.6459 ± 24.6932	95.9150 ± 165.0667	206.5189 ± 183.7747

<b>Primer F</b>	<b>Primer R</b>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>Nº de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
8F	1387R	BfaI	77566	16.81%	1367.6455 ± 24.6949	313.5096 ± 272.1904	45.5540 ± 37.7149
8F	1387R	HaeIII	77564	16.81%	1367.6457 ± 24.6939	217.3737 ± 122.2296	286.9972 ± 239.6189
8F	1387R	RsaI	77510	16.80%	1367.6580 ± 24.6673	439.0153 ± 234.0732	282.6055 ± 178.5309
63F	939R	HhaI	77466	16.79%	881.1895 ± 24.8523	214.9504 ± 172.8487	352.5231 ± 220.5216
63F	518R	TaqI	77358	16.76%	474.3438 ± 25.8679	23.4859 ± 31.8253	403.3800 ± 98.7996
63F	536R	TaqI	77340	16.76%	476.3520 ± 25.8040	23.4822 ± 31.8020	405.3681 ± 98.8084
1055F	1492R	TaqI	77120	16.71%	454.8221 ± 25.2911	270.0565 ± 53.5637	152.6165 ± 65.0749
8F	1406R	EcoRI	77027	16.69%	1386.1298 ± 25.6530	654.5276 ± 96.0210	713.7935 ± 107.5138
27F	939R	BfaI	76961	16.68%	920.0268 ± 23.8143	270.2874 ± 225.1257	251.2443 ± 232.1329
27F	939R	AluI	76959	16.68%	919.9684 ± 23.9454	170.0500 ± 118.5917	223.4041 ± 219.9570
8F	939R	DdeI	76843	16.65%	920.1515 ± 23.7489	16.0000 ± .0000	195.8760 ± 125.2795
8F	939R	HaeIII	76843	16.65%	920.1515 ± 23.7489	200.4015 ± 137.8162	10.0000 ± .0000
8F	939R	Sau96I	76843	16.65%	920.1515 ± 23.7489	233.2592 ± 76.3532	21.5366 ± 40.7264
8F	939R	BstUI	76839	16.65%	920.1518 ± 23.7490	199.6567 ± 123.8859	253.1322 ± 145.0285
27F	926R	EcoRI	76824	16.65%	906.1500 ± 22.5195	643.5729 ± 75.8125	254.0562 ± 37.6227
8F	939R	MspI	76773	16.64%	920.1541 ± 23.7463	276.3157 ± 166.4703	253.3967 ± 125.2210
8F	939R	RsaI	76398	16.55%	920.1317 ± 23.7709	456.6452 ± 236.4044	64.0917 ± 84.2477
27F	939R	TaqI	76196	16.51%	920.1030 ± 23.7514	88.8319 ± 136.1425	431.3779 ± 323.9081
63F	518R	AluI	76098	16.49%	474.0495 ± 26.1273	115.8035 ± 79.0074	195.8259 ± 109.0969
63F	536R	AluI	76072	16.48%	476.0553 ± 26.0642	115.8016 ± 79.0103	197.8651 ± 109.1127
27F	806R	EcoRI	75794	16.42%	787.4242 ± 21.2245	646.0239 ± 72.0314	134.2743 ± 33.3803
1099F	1492R	TaqI	75769	16.42%	409.9957 ± 17.0112	226.6371 ± 51.7543	152.7334 ± 64.3208
8F	926R	EcoRI	75633	16.39%	906.2124 ± 22.4573	643.6816 ± 75.6900	254.0132 ± 37.3886
8F	939R	BfaI	75603	16.38%	920.1040 ± 23.7472	269.9407 ± 225.0566	252.0150 ± 232.7203
8F	939R	AluI	75584	16.38%	920.0438 ± 23.8808	169.9001 ± 118.6661	224.1972 ± 220.5427
8F	939R	TaqI	74890	16.23%	920.1735 ± 23.6930	87.1276 ± 132.6651	430.9496 ± 323.9905
8F	806R	EcoRI	74813	16.21%	787.4608 ± 21.1837	646.0993 ± 71.9354	134.2245 ± 33.0134
63F	806R	BfaI	74354	16.11%	745.9871 ± 25.7875	204.8220 ± 136.0807	253.1389 ± 158.9876



<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>Nº de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
63F	939R	BfaI	74083	16.05%	880.4217 ± 25.2268	222.6060 ± 166.2796	274.7895 ± 201.9440
27F	939R	HhaI	73853	16.00%	920.2308 ± 23.8136	278.9122 ± 200.7023	312.5610 ± 213.9418
27F	1492R	DdeI	73638	15.96%	1486.5674 ± 43.0083	16.0000 ± .0000	284.7620 ± 269.9514
27F	1492R	AluI	73607	15.95%	1487.1119 ± 32.7140	187.5744 ± 145.1078	212.3592 ± 155.6243
27F	1492R	BstUI	73606	15.95%	1487.1334 ± 32.2834	210.3501 ± 124.7194	236.0470 ± 152.6251
27F	1492R	BfaI	73598	15.95%	1487.1088 ± 32.7015	304.3294 ± 262.8598	144.4619 ± 58.3896
27F	1492R	MspI	73596	15.95%	1487.1520 ± 32.2361	288.3610 ± 171.0191	123.9172 ± 80.1197
27F	1492R	RsaI	73596	15.95%	1487.1152 ± 32.7032	436.3421 ± 247.4928	111.9238 ± 36.1219
27F	1492R	TaqI	73590	15.95%	1487.1307 ± 32.2774	108.3219 ± 185.4171	248.6998 ± 176.6825
27F	1492R	HaeIII	73541	15.94%	1487.1291 ± 32.6769	210.2678 ± 152.0359	183.7170 ± 212.8972
968F	1492R	DdeI	73036	15.83%	542.5140 ± 17.4199	225.4102 ± 119.0402	207.1704 ± 126.6881
8F	939R	HhaI	72596	15.73%	920.3037 ± 23.7469	278.9217 ± 200.7248	312.3380 ± 214.1479
63F	1406R	MspI	72373	15.68%	1343.4817 ± 29.7858	264.1271 ± 179.3568	32.3993 ± 48.2148
63F	1406R	AluI	72372	15.68%	1343.4815 ± 29.7859	144.6452 ± 150.0702	204.3062 ± 116.7241
63F	1406R	DdeI	72372	15.68%	1343.4815 ± 29.7859	197.0651 ± 82.1301	265.5841 ± 214.1843
63F	1406R	Sau96I	72372	15.68%	1343.4821 ± 29.7858	188.3241 ± 63.8923	233.7688 ± 92.0461
63F	1406R	BstUI	72371	15.68%	1343.4810 ± 29.7859	192.1457 ± 138.3664	134.3778 ± 138.4370
27F	1406R	HaeIII	72370	15.68%	1386.7442 ± 26.8952	213.4597 ± 124.3706	147.8724 ± 273.7787
63F	1406R	TaqI	72370	15.68%	1343.4820 ± 29.7859	48.8455 ± 135.7725	132.9894 ± 122.2560
63F	1406R	HhaI	72363	15.68%	1343.4785 ± 29.7859	259.1856 ± 254.9578	233.5704 ± 117.4603
63F	1406R	HaeIII	72354	15.68%	1343.4864 ± 29.7823	109.0261 ± 149.7571	37.3448 ± 71.3174
63F	1406R	BfaI	72323	15.67%	1343.4684 ± 29.7915	301.7030 ± 298.5165	65.5604 ± 49.0033
63F	1406R	RsaI	72312	15.67%	1343.4922 ± 29.7686	450.9812 ± 250.5066	332.4449 ± 180.6536
8F	1492R	DdeI	71933	15.59%	1486.7332 ± 43.5724	16.0000 ± .0000	284.8381 ± 270.0373
8F	1492R	AluI	71901	15.58%	1487.3108 ± 32.7291	187.4688 ± 145.4482	212.6043 ± 155.8760
8F	1492R	BstUI	71900	15.58%	1487.3329 ± 32.2882	210.1473 ± 124.7319	235.5445 ± 152.3962
8F	1492R	BfaI	71892	15.58%	1487.3078 ± 32.7162	303.6069 ± 262.8485	144.4453 ± 58.5218
8F	1492R	MspI	71891	15.58%	1487.3523 ± 32.2396	287.8369 ± 171.1104	123.8314 ± 79.9700

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>Nº de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
8F	1492R	RsaI	71890	15.58%	1487.3143 ± 32.7179	437.6173 ± 246.6047	111.9951 ± 36.2465
8F	1492R	TaqI	71884	15.58%	1487.3301 ± 32.2821	106.3338 ± 182.4141	248.9029 ± 176.9516
8F	1492R	HaeIII	71839	15.57%	1487.3282 ± 32.6901	210.1133 ± 151.9327	183.2966 ± 213.3267
968F	1492R	TaqI	71485	15.49%	542.5797 ± 16.5570	313.7628 ± 122.1701	164.0286 ± 91.5552
27F	1406R	HhaI	71454	15.48%	1386.7227 ± 26.9025	342.5497 ± 290.5584	253.5816 ± 135.7439
1099F	1492R	AluI	70938	15.37%	409.7790 ± 17.6972	204.4992 ± 87.6009	131.6657 ± 80.5325
27F	1389R	Sau96I	70792	15.34%	1385.4186 ± 26.4993	237.9727 ± 82.2374	293.7936 ± 148.3044
786F	926R	HaeIII	69947	15.16%	141.6954 ± 16.8021	93.5956 ± 28.2615	43.4824 ± 24.7565
8F	1406R	HhaI	69191	14.99%	1387.1568 ± 26.7435	340.0605 ± 289.0703	253.8240 ± 136.2075
343F	1492R	HhaI	68971	14.95%	1155.3737 ± 22.0484	257.8823 ± 247.5842	256.0633 ± 164.4137
63F	1389R	DdeI	68680	14.88%	1343.0035 ± 30.0803	196.5657 ± 82.2177	266.7906 ± 213.2793
63F	1389R	MspI	68680	14.88%	1343.0035 ± 30.0803	269.3640 ± 178.6516	32.3006 ± 47.5483
63F	1389R	RsaI	68680	14.88%	1343.0035 ± 30.0803	454.6111 ± 253.1296	13.0000 ± .0000
63F	1389R	AluI	68679	14.88%	1343.0032 ± 30.0805	141.9123 ± 143.6036	206.4715 ± 116.2187
63F	1389R	Sau96I	68679	14.88%	1343.0039 ± 30.0804	187.3566 ± 63.8079	233.5992 ± 90.1231
63F	1389R	BstUI	68678	14.88%	1343.0027 ± 30.0804	193.2150 ± 138.3085	136.1470 ± 138.6231
63F	1389R	TaqI	68677	14.88%	1343.0038 ± 30.0805	48.5514 ± 135.0309	127.6002 ± 116.2979
63F	1389R	HhaI	68670	14.88%	1343.0000 ± 30.0805	261.0185 ± 254.0246	237.0558 ± 115.7331
63F	1389R	HaeIII	68661	14.88%	1343.0083 ± 30.0768	106.7634 ± 149.1833	34.9269 ± 63.7685
63F	1389R	BfaI	68644	14.87%	1342.9938 ± 30.0852	293.5605 ± 287.8503	65.2632 ± 46.5857
341F	1492R	HhaI	68596	14.86%	1157.4433 ± 21.9890	259.5256 ± 247.4850	255.9859 ± 164.4213
27F	1389R	EcoRI	68584	14.86%	1386.0734 ± 26.5467	656.2568 ± 96.4522	711.7737 ± 112.5037
8F	1389R	EcoRI	66971	14.51%	1386.1458 ± 26.5689	656.4565 ± 96.3838	711.6850 ± 112.5203
63F	518R	HhaI	66219	14.35%	475.9678 ± 25.4385	160.6702 ± 120.1806	249.7886 ± 125.4773
517F	806R	RsaI	66213	14.35%	290.4818 ± 20.4843	147.1836 ± 53.4099	117.0148 ± 54.4844
63F	536R	HhaI	66192	14.34%	477.9770 ± 25.3628	160.6429 ± 120.1699	251.7940 ± 125.4729
63F	806R	RsaI	65423	14.18%	747.2373 ± 25.7887	354.0670 ± 174.3997	258.4598 ± 145.4282
63F	518R	BfaI	64270	13.93%	474.3335 ± 26.2185	171.3448 ± 80.2800	232.6366 ± 82.5268

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>N° de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
63F	536R	BfaI	64242	13.92%	476.3434 ± 26.1429	171.3468 ± 80.2884	234.6592 ± 82.5137
27F	1387R	EcoRI	60679	13.15%	1367.5411 ± 24.6600	646.8400 ± 74.1057	708.2367 ± 55.4940
343F	1387R	Sau96I	60258	13.06%	1032.4113 ± 16.3468	431.2497 ± 175.1277	318.8785 ± 136.5344
8F	1387R	EcoRI	59635	12.92%	1367.6308 ± 24.5804	646.9031 ± 74.1082	708.2922 ± 55.1576
27F	1389R	HhaI	59627	12.92%	1386.2502 ± 26.1693	340.4895 ± 281.9556	251.5186 ± 131.9840
786F	907R	BstUI	58377	12.65%	141.4174 ± 20.1900	75.9361 ± 16.1655	63.6241 ± 14.8201
8F	1389R	HhaI	57434	12.45%	1386.7536 ± 25.9477	337.4667 ± 279.7803	251.7518 ± 132.3803
27F	939R	EcoRI	54556	11.82%	920.1268 ± 24.2582	645.4694 ± 72.4000	268.1434 ± 42.3111
63F	518R	RsaI	54277	11.76%	472.7980 ± 27.3171	305.6892 ± 139.6625	89.2102 ± 98.0681
63F	536R	RsaI	54254	11.76%	474.7983 ± 27.2351	305.6445 ± 139.6577	91.2630 ± 98.1345
63F	1387R	BstUI	54233	11.75%	1323.5268 ± 29.3608	185.3632 ± 140.0604	71.3212 ± 122.7561
63F	1387R	MspI	54233	11.75%	1323.5268 ± 29.3608	255.1770 ± 178.1591	4.0000 ± .0000
63F	1387R	Sau96I	54233	11.75%	1323.5268 ± 29.3608	194.1558 ± 65.9545	241.4690 ± 90.6529
63F	1387R	AluI	54232	11.75%	1323.5265 ± 29.3610	160.6225 ± 177.5214	173.1778 ± 115.9579
63F	1387R	DdeI	54232	11.75%	1323.5265 ± 29.3610	190.8292 ± 85.7010	214.1008 ± 204.7756
63F	1387R	TaqI	54229	11.75%	1323.5276 ± 29.3611	36.1209 ± 102.8248	135.4784 ± 141.0040
63F	1387R	HhaI	54226	11.75%	1323.5250 ± 29.3622	224.4895 ± 246.0769	211.1194 ± 137.7957
63F	1387R	HaeIII	54216	11.75%	1323.5339 ± 29.3549	128.8615 ± 148.5700	177.9836 ± 64.0085
63F	1387R	RsaI	54201	11.74%	1323.5373 ± 29.3344	474.9761 ± 252.1473	269.2890 ± 172.5676
63F	1387R	BfaI	54183	11.74%	1323.5087 ± 29.3678	319.3166 ± 336.8005	46.4810 ± 46.7001
8F	939R	EcoRI	53670	11.63%	920.1899 ± 24.2043	645.5940 ± 72.1915	268.0885 ± 42.0072
63F	926R	DdeI	52959	11.48%	858.7148 ± 27.2688	194.0156 ± 79.3720	177.0812 ± 115.3853
63F	926R	BstUI	52950	11.47%	858.7086 ± 27.2696	128.0723 ± 116.9166	296.6017 ± 135.8842
63F	926R	Sau96I	52915	11.47%	858.7277 ± 27.2666	199.3815 ± 67.4726	367.3761 ± 187.7113
63F	926R	RsaI	52888	11.46%	858.7255 ± 27.2736	366.6156 ± 219.2490	38.9316 ± 39.2888
63F	926R	MspI	52857	11.45%	858.7434 ± 27.2833	190.8999 ± 160.0023	239.5474 ± 146.5895
63F	926R	TaqI	52414	11.36%	858.6525 ± 27.3115	43.2900 ± 112.5207	411.5310 ± 309.0333
63F	926R	AluI	52150	11.30%	858.4015 ± 27.3362	176.8505 ± 154.0825	209.8001 ± 198.4506

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>N° de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
27F	1492R	EcoRI	52123	11.29%	1488.7537 ± 29.1577	658.0940 ± 103.8744	811.3561 ± 123.6030
63F	926R	HaeIII	51985	11.26%	858.4020 ± 27.3874	127.1229 ± 136.3513	305.3664 ± 228.7407
63F	907R	EcoRI	51734	11.21%	865.7887 ± 26.0562	610.6448 ± 48.7247	253.3518 ± 34.1803
8F	1492R	EcoRI	51096	11.07%	1488.7869 ± 29.1909	658.1736 ± 103.5365	811.3696 ± 123.3658
63F	926R	HhaI	50956	11.04%	858.3814 ± 27.5303	157.8526 ± 169.4832	364.7441 ± 262.0397
63F	806R	EcoRI	49773	10.79%	745.8443 ± 25.9470	610.2939 ± 48.1026	134.1255 ± 33.4279
786F	907R	DdeI	49591	10.75%	141.0680 ± 22.2481	59.1150 ± 17.9295	78.6413 ± 17.2847
63F	939R	EcoRI	47272	10.24%	880.8038 ± 25.3584	612.6973 ± 48.5780	266.3766 ± 34.7508
786F	907R	MspI	46621	10.10%	141.3962 ± 22.4513	53.9385 ± 33.2032	80.5036 ± 32.3390
63F	926R	BfaI	46212	10.01%	855.6691 ± 27.6600	267.0461 ± 192.9949	266.1153 ± 213.5940
341F	536R	DdeI	45353	9.83%	180.8555 ± 27.2201	100.4525 ± 35.0308	73.5567 ± 30.3740
341F	518R	DdeI	45327	9.82%	178.8580 ± 27.5822	100.4380 ± 35.0322	71.5738 ± 30.3906
343F	536R	DdeI	45195	9.79%	178.9019 ± 27.2613	98.4315 ± 34.8615	73.6026 ± 30.2472
343F	518R	DdeI	45170	9.79%	176.9045 ± 27.6242	98.4187 ± 34.8603	71.6181 ± 30.2607
786F	907R	HhaI	45137	9.78%	141.5542 ± 22.6741	66.1813 ± 17.1859	65.2153 ± 14.9840
27F	1492R	HhaI	44453	9.63%	1488.7369 ± 32.9975	340.6446 ± 279.8628	256.7483 ± 175.3400
786F	926R	BstUI	42890	9.29%	141.3796 ± 21.2367	74.0065 ± 17.9515	65.2128 ± 16.7790
63F	1406R	EcoRI	41422	8.98%	1342.2242 ± 31.2112	615.0423 ± 70.5973	712.1862 ± 94.7656
786F	926R	DdeI	41405	8.97%	140.8641 ± 22.1097	57.7738 ± 18.7497	79.3937 ± 18.0960
786F	939R	BstUI	40862	8.85%	154.6322 ± 20.3654	76.3944 ± 15.2352	76.0669 ± 13.1262
63F	939R	Sau961	39630	8.59%	881.3059 ± 24.7632	189.1870 ± 61.3988	14.7791 ± 30.9658
63F	1389R	EcoRI	39374	8.53%	1341.7541 ± 31.5101	614.7652 ± 71.2298	711.8067 ± 95.2235
786F	926R	MspI	38822	8.41%	141.3508 ± 22.3335	51.5756 ± 35.0751	81.5631 ± 34.4011
341F	536R	Sau961	38655	8.38%	187.4660 ± 28.4164	91.2351 ± 30.6659	88.0170 ± 32.8904
343F	536R	Sau961	38634	8.37%	185.4813 ± 28.4215	89.2211 ± 30.6692	88.0650 ± 32.8825
341F	518R	Sau961	38625	8.37%	185.4651 ± 28.8223	91.1964 ± 30.5509	86.0284 ± 32.8810
343F	518R	Sau961	38603	8.36%	183.4842 ± 28.8342	89.1818 ± 30.5541	86.0827 ± 32.8761
63F	1492R	DdeI	37393	8.10%	1441.9314 ± 30.1544	194.5286 ± 81.7139	286.2145 ± 230.9188

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>Nº de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
63F	1492R	AluI	37392	8.10%	1441.9668 ± 29.3672	139.4117 ± 133.5394	197.0159 ± 147.5727
63F	1492R	HaeIII	37392	8.10%	1441.8602 ± 31.8612	103.6482 ± 143.5015	118.3704 ± 72.4856
63F	1492R	BfaI	37391	8.10%	1441.9658 ± 29.3669	273.3073 ± 267.4630	134.6610 ± 60.1267
63F	1492R	BstUI	37391	8.10%	1441.9662 ± 29.3674	189.1213 ± 134.4719	234.2593 ± 142.8399
63F	1492R	Sau961	37391	8.10%	1441.9675 ± 29.3674	186.4356 ± 64.8047	244.4304 ± 87.4806
63F	1492R	MspI	37390	8.10%	1441.9676 ± 29.3678	275.3150 ± 177.0041	122.6638 ± 56.7695
63F	1492R	RsaI	37390	8.10%	1441.9680 ± 29.3676	458.1099 ± 253.0811	111.9557 ± 34.1362
63F	1492R	TaqI	37389	8.10%	1441.9677 ± 29.3669	38.9399 ± 113.3586	217.1123 ± 112.8665
63F	1492R	HhaI	37383	8.10%	1441.9649 ± 29.3690	269.1015 ± 259.8392	210.8508 ± 154.9177
786F	939R	HhaI	37245	8.07%	154.6037 ± 21.0329	65.2461 ± 17.1798	77.9556 ± 14.1920
786F	939R	DdeI	35351	7.66%	154.0630 ± 22.2371	61.0795 ± 16.6855	89.6024 ± 16.1777
786F	907R	TaqI	35292	7.65%	141.7883 ± 25.7414	51.0874 ± 14.2024	73.0775 ± 20.3956
786F	939R	MspI	34353	7.44%	154.3345 ± 22.0803	58.2247 ± 32.2536	89.8073 ± 31.6193
786F	926R	HhaI	32679	7.08%	141.6093 ± 24.1535	63.6374 ± 19.2043	64.1826 ± 17.0368
63F	1387R	EcoRI	32665	7.08%	1321.1631 ± 31.3520	610.0599 ± 54.9438	698.0272 ± 75.2259
27F	1387R	HhaI	31770	6.88%	1369.5216 ± 24.1850	324.0289 ± 285.3490	237.1150 ± 136.3032
8F	1387R	HhaI	31182	6.76%	1369.7079 ± 24.0610	323.3641 ± 284.7760	237.7417 ± 136.4932
8F	1492R	HhaI	31101	6.74%	1490.0302 ± 33.0973	335.5577 ± 270.7100	258.9853 ± 175.9945
63F	926R	EcoRI	30328	6.57%	855.8235 ± 27.9542	600.8618 ± 48.6739	252.4453 ± 28.5312
786F	939R	TaqI	28322	6.14%	154.8445 ± 24.2067	51.2928 ± 15.5093	83.3835 ± 21.0113
786F	926R	TaqI	24428	5.29%	141.9576 ± 27.9264	56.4020 ± 12.5096	81.8784 ± 16.4744
27F	1406R	HindIII	22970	4.98%	1385.5342 ± 28.6802	320.7297 ± 332.6857	1010.4359 ± 357.8251
27F	907R	HindIII	22892	4.96%	905.1245 ± 24.6870	233.4806 ± 222.6823	643.8255 ± 239.9110
786F	907R	Sau961	22634	4.90%	142.5288 ± 32.1661	52.8320 ± 13.7612	87.3773 ± 15.7355
341F	536R	TaqI	22565	4.89%	190.4673 ± 36.0027	99.9920 ± 38.4534	87.2382 ± 38.4285
341F	518R	TaqI	22545	4.89%	188.4803 ± 36.5578	99.9853 ± 38.4304	85.2306 ± 38.3448
343F	536R	TaqI	22513	4.88%	188.5009 ± 36.0381	97.8958 ± 38.5076	87.3594 ± 38.5004
343F	518R	TaqI	22492	4.87%	186.5140 ± 36.5939	97.8890 ± 38.4846	85.3519 ± 38.4167

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>Nº de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
8F	907R	HindIII	22184	4.81%	905.7817 ± 24.2463	233.6438 ± 224.0866	644.5105 ± 241.1616
8F	1406R	HindIII	22028	4.77%	1386.3777 ± 28.3956	323.0963 ± 335.5147	1008.8240 ± 360.2436
343F	1406R	HindIII	21688	4.70%	1055.2744 ± 23.2342	411.6019 ± 275.2004	628.3013 ± 276.6135
341F	536R	BfaI	21465	4.65%	184.3922 ± 37.7524	93.6529 ± 33.1488	86.2722 ± 28.7762
341F	518R	BfaI	21460	4.65%	182.3886 ± 38.2847	93.6743 ± 33.1721	84.2335 ± 28.7420
341F	1406R	HindIII	21442	4.65%	1057.2354 ± 22.9679	415.4217 ± 274.8548	627.3756 ± 276.4918
343F	536R	BfaI	21438	4.65%	182.4150 ± 37.7746	91.7728 ± 32.9276	86.1879 ± 28.5209
343F	518R	BfaI	21430	4.64%	180.4175 ± 38.3272	91.8126 ± 32.9449	84.1404 ± 28.4864
63F	1492R	EcoRI	20837	4.52%	1441.1868 ± 30.9522	612.8161 ± 76.3888	813.8723 ± 94.1973
27F	1389R	HindIII	20105	4.36%	1385.0771 ± 29.3613	327.0773 ± 335.4765	1004.9753 ± 357.8599
63F	907R	HindIII	20066	4.35%	870.2865 ± 22.5880	201.7400 ± 246.2454	611.0767 ± 280.8475
8F	1389R	Sau961	19944	4.32%	1389.5089 ± 25.9972	231.6960 ± 76.8940	301.4508 ± 143.1409
343F	1389R	HindIII	19775	4.29%	1055.5418 ± 23.7591	412.1994 ± 278.3993	627.8551 ± 279.7576
343F	907R	HindIII	19767	4.28%	572.8321 ± 20.0358	269.0340 ± 152.7119	301.2648 ± 155.8488
341F	907R	HindIII	19558	4.24%	574.7609 ± 20.0508	272.1299 ± 152.5463	300.2750 ± 155.6651
341F	1389R	HindIII	19550	4.24%	1057.5155 ± 23.6266	416.0828 ± 278.0577	626.9058 ± 279.6381
8F	1389R	HindIII	19201	4.16%	1386.0145 ± 29.0794	330.2437 ± 338.8775	1001.9822 ± 361.3486
786F	926R	Sau961	19047	4.13%	142.5272 ± 31.6433	52.6321 ± 13.9341	87.3528 ± 16.1237
343F	1406R	BamHI	18138	3.93%	1053.3236 ± 21.3929	398.1295 ± 244.0525	645.2143 ± 251.5447
341F	1406R	BamHI	18006	3.90%	1055.3677 ± 21.4211	399.8045 ± 244.0738	645.5122 ± 251.5783
27F	926R	HindIII	17554	3.80%	907.5992 ± 23.2528	240.2558 ± 227.8781	647.2491 ± 242.3943
27F	518R	HindIII	17487	3.79%	516.2172 ± 23.6662	145.8587 ± 103.7576	360.8021 ± 115.5607
27F	536R	HindIII	17475	3.79%	518.1958 ± 23.6582	145.8951 ± 103.8020	362.7689 ± 115.5819
63F	939R	HindIII	17451	3.78%	887.5156 ± 18.6561	202.8045 ± 256.7400	621.0967 ± 294.2791
517F	1406R	BamHI	17441	3.78%	888.6825 ± 20.6055	243.2267 ± 248.5230	635.6575 ± 252.4184
27F	806R	HindIII	17386	3.77%	791.7768 ± 19.6285	189.8177 ± 179.4402	577.5066 ± 195.6654
8F	926R	HindIII	17251	3.74%	907.6372 ± 23.2055	240.0550 ± 228.0855	647.6255 ± 242.6682
8F	518R	HindIII	17193	3.73%	516.6365 ± 23.2858	145.2509 ± 104.1617	361.7670 ± 115.9675

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>N° de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
8F	536R	HindIII	17175	3.72%	518.6218 ± 23.2736	145.2841 ± 104.2190	363.7407 ± 115.9993
8F	806R	HindIII	17133	3.71%	791.8570 ± 19.5391	189.3824 ± 179.5009	577.9660 ± 195.8605
343F	1389R	BamHI	16835	3.65%	1053.5247 ± 21.9235	394.0075 ± 240.8491	650.1182 ± 248.1512
341F	1389R	BamHI	16707	3.62%	1055.5756 ± 21.9555	395.6819 ± 240.8448	650.4248 ± 248.1516
517F	1406R	HindIII	16584	3.59%	890.5312 ± 22.2194	355.0745 ± 236.6963	525.3703 ± 234.6985
517F	1389R	BamHI	16155	3.50%	888.6516 ± 20.6886	238.6061 ± 245.2437	640.8957 ± 249.0199
27F	1387R	HindIII	16008	3.47%	1368.5354 ± 27.0399	275.6760 ± 315.3277	1062.0806 ± 334.4257
63F	1406R	HindIII	15821	3.43%	1349.1047 ± 24.3307	265.8891 ± 321.0491	1027.1138 ± 344.5323
63F	806R	HindIII	15652	3.39%	759.7569 ± 11.7961	150.5411 ± 196.1076	575.9208 ± 218.1495
343F	907R	BamHI	15588	3.38%	576.0826 ± 18.0599	286.1901 ± 139.2309	289.1786 ± 139.4015
27F	1492R	HindIII	15586	3.38%	1486.0807 ± 33.3793	346.5667 ± 354.2365	1066.1195 ± 393.1594
8F	1387R	HindIII	15544	3.37%	1369.1211 ± 26.7428	276.2792 ± 316.7949	1062.6120 ± 335.6280
341F	907R	BamHI	15524	3.36%	578.0799 ± 18.0807	288.5283 ± 139.3327	288.8370 ± 139.5027
343F	926R	HindIII	15514	3.36%	569.8207 ± 17.5377	257.8157 ± 156.9442	308.9265 ± 161.5971
341F	926R	HindIII	15356	3.33%	571.7840 ± 17.5888	260.4179 ± 157.0757	308.4495 ± 161.8206
27F	939R	HindIII	15207	3.30%	921.7809 ± 23.1564	234.0502 ± 230.4434	660.4803 ± 249.7689
8F	1492R	HindIII	15026	3.26%	1486.8133 ± 33.1767	348.5952 ± 356.0602	1066.0974 ± 393.1288
8F	939R	HindIII	14947	3.24%	921.8108 ± 23.1038	234.0215 ± 230.5461	660.9247 ± 249.6785
343F	939R	BamHI	14902	3.23%	589.2133 ± 18.3251	286.5668 ± 138.5100	301.8834 ± 138.5311
517F	1389R	HindIII	14901	3.23%	890.5563 ± 22.2526	356.7986 ± 237.9879	523.5172 ± 235.9797
343F	1387R	HindIII	14872	3.22%	1035.0091 ± 23.0872	380.1807 ± 272.2892	646.2117 ± 275.0989
341F	939R	BamHI	14853	3.22%	591.2047 ± 18.3511	288.8445 ± 138.6014	301.5968 ± 138.6148
341F	1387R	HindIII	14833	3.21%	1036.9904 ± 23.0340	382.3797 ± 272.3638	646.1486 ± 275.1726
63F	1389R	HindIII	14716	3.19%	1348.4410 ± 24.7605	274.8166 ± 325.2316	1020.1678 ± 346.1337
343F	1387R	BamHI	14343	3.11%	1033.5177 ± 19.5442	375.9389 ± 241.8960	649.8304 ± 248.9561
341F	1387R	BamHI	14266	3.09%	1035.5468 ± 19.5561	377.6439 ± 241.8140	650.1153 ± 248.8887
517F	907R	BamHI	14007	3.04%	408.9465 ± 18.3736	124.2869 ± 140.0294	284.1801 ± 138.0627
343F	939R	HindIII	13938	3.02%	587.9427 ± 18.1367	278.4445 ± 159.9779	306.9389 ± 162.9355

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>Nº de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
341F	939R	HindIII	13851	3.00%	589.9866 ± 18.1577	280.6324 ± 160.1286	306.9555 ± 163.1352
343F	926R	BamHI	13746	2.98%	574.9825 ± 18.7579	259.3580 ± 124.6623	314.8417 ± 126.9371
341F	926R	BamHI	13680	2.96%	576.9737 ± 18.7849	261.5802 ± 124.7621	314.6095 ± 127.0441
63F	518R	HindIII	13653	2.96%	483.2265 ± 18.1929	91.5267 ± 100.3624	384.6070 ± 112.7897
63F	536R	HindIII	13652	2.96%	485.2082 ± 18.2097	91.6283 ± 100.4357	386.5267 ± 112.8324
517F	1387R	BamHI	13534	2.93%	869.2718 ± 18.3331	220.2216 ± 246.7047	641.7763 ± 249.8241
517F	939R	BamHI	13401	2.90%	421.8845 ± 18.6595	121.1637 ± 139.3877	300.2300 ± 137.4217
63F	1387R	HindIII	12994	2.82%	1331.8488 ± 21.2045	194.9872 ± 273.0188	1073.4281 ± 322.0049
517F	926R	BamHI	12352	2.68%	408.7234 ± 19.3986	98.7163 ± 128.4810	309.4932 ± 126.4595
343F	806R	HindIII	12086	2.62%	456.1196 ± 21.9543	201.9176 ± 98.6306	252.1378 ± 98.6043
517F	907R	HindIII	12051	2.61%	409.5718 ± 19.6799	197.1446 ± 110.0430	211.5246 ± 108.7184
341F	806R	HindIII	11959	2.59%	458.0034 ± 22.0598	204.7388 ± 98.1783	251.3804 ± 97.9809
8F	1387R	MspI	11430	2.48%	1370.4682 ± 24.1546	270.5504 ± 166.5999	4.0000 ± .0000
63F	907R	BamHI	10138	2.20%	874.9397 ± 18.8622	459.5160 ± 186.9533	389.4523 ± 163.5480
63F	939R	BamHI	9866	2.14%	887.9398 ± 18.8248	461.6869 ± 185.4296	399.6693 ± 160.7794
517F	1387R	HindIII	9801	2.12%	870.8811 ± 22.6741	360.3848 ± 224.2657	504.7395 ± 223.3404
63F	926R	HindIII	9760	2.11%	869.1222 ± 23.2292	228.5481 ± 268.2919	630.4379 ± 287.5375
343F	806R	BamHI	9661	2.09%	459.0684 ± 21.4058	195.0626 ± 33.8472	263.5293 ± 33.0639
341F	806R	BamHI	9620	2.08%	461.0695 ± 21.4403	197.0765 ± 33.8246	263.5145 ± 33.0595
63F	1406R	BamHI	9441	2.05%	1350.9035 ± 23.9546	531.0864 ± 264.7977	787.7113 ± 257.0156
517F	926R	HindIII	9213	2.00%	409.2544 ± 15.8910	202.0434 ± 115.4095	206.2120 ± 113.6125
343F	1492R	HindIII	9195	1.99%	1157.6036 ± 37.4006	444.3162 ± 306.9702	695.9724 ± 311.2377
27F	1406R	BamHI	9141	1.98%	1388.6428 ± 25.9586	567.9803 ± 353.4519	796.3213 ± 355.6779
8F	1387R	Sau961	9125	1.98%	1371.0222 ± 22.9718	235.1348 ± 72.0872	306.8193 ± 141.4213
786F	1406R	HindIII	9106	1.97%	621.7818 ± 28.5635	246.0072 ± 168.6635	374.2888 ± 167.2232
341F	1492R	HindIII	9067	1.96%	1159.5333 ± 37.0895	448.2135 ± 306.0234	695.4745 ± 310.8019
8F	1406R	BamHI	8950	1.94%	1388.6524 ± 26.0393	568.4942 ± 354.3702	796.1366 ± 356.7466
63F	926R	BamHI	8875	1.92%	874.4926 ± 19.8873	418.9119 ± 152.6282	426.3902 ± 128.0129



<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>Nº de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
63F	1389R	BamHI	8827	1.91%	1350.7026 ± 24.3998	527.1406 ± 264.6234	791.5497 ± 255.6200
517F	939R	HindIII	8297	1.80%	423.0669 ± 17.3824	211.6624 ± 113.1989	210.6390 ± 113.0427
786F	1389R	HindIII	8178	1.77%	621.6757 ± 28.9013	249.4401 ± 169.0629	370.6480 ± 167.5582
27F	1389R	BamHI	8138	1.76%	1388.5955 ± 26.4218	566.5822 ± 349.9685	797.3828 ± 351.7092
63F	806R	BamHI	8112	1.76%	757.3095 ± 20.5173	414.5514 ± 149.1460	313.0999 ± 122.6724
786F	1406R	BamHI	8045	1.74%	622.0057 ± 28.3014	199.7866 ± 177.1591	421.2051 ± 177.4535
517F	806R	BamHI	7997	1.73%	290.5950 ± 23.0919	30.4231 ± 31.9941	260.0264 ± 30.2315
8F	1389R	BamHI	7951	1.72%	1388.6129 ± 26.5181	567.1508 ± 350.8925	797.2259 ± 352.8275
63F	1492R	HindIII	7805	1.69%	1445.0350 ± 27.2640	295.8642 ± 340.2824	1081.0942 ± 381.7013
27F	907R	BamHI	7744	1.68%	910.8385 ± 16.9351	433.4291 ± 242.4960	460.4934 ± 239.2798
8F	907R	BamHI	7597	1.65%	910.8778 ± 16.8446	432.7712 ± 243.7056	461.6651 ± 240.4587
63F	1387R	BamHI	7448	1.61%	1330.9251 ± 21.3127	520.7490 ± 263.4519	775.9899 ± 256.2005
786F	1389R	BamHI	7403	1.60%	622.0357 ± 29.0036	195.0140 ± 175.3263	426.1952 ± 175.4845
517F	1492R	HindIII	7265	1.57%	993.0997 ± 27.9757	391.9803 ± 273.6339	591.6591 ± 273.5619
27F	926R	BamHI	7071	1.53%	910.6486 ± 17.2986	403.5187 ± 224.3482	489.1341 ± 222.9084
8F	926R	BamHI	6936	1.50%	910.6648 ± 17.2825	402.9454 ± 225.4314	490.1275 ± 223.9503
968F	1406R	EcoRI	6789	1.47%	440.1989 ± 50.7566	187.8724 ± 177.7043	247.3819 ± 177.6041
343F	1492R	BamHI	6666	1.44%	1152.9565 ± 33.4321	442.5774 ± 265.1855	699.8687 ± 267.7390
341F	1492R	BamHI	6605	1.43%	1155.0910 ± 33.5253	444.1721 ± 265.3433	700.3167 ± 267.8812
968F	1389R	EcoRI	6484	1.41%	440.1708 ± 51.6652	188.2395 ± 178.2600	246.9207 ± 178.1137
517F	1492R	BamHI	6476	1.40%	990.0565 ± 33.7308	291.6895 ± 269.3967	688.4049 ± 267.8033
27F	1387R	BamHI	6332	1.37%	1369.2819 ± 26.1012	542.9602 ± 346.9099	801.6731 ± 348.3427
8F	1387R	BamHI	6233	1.35%	1369.4120 ± 26.0445	541.6830 ± 346.9366	803.1417 ± 348.3666
786F	1387R	HindIII	6195	1.34%	602.1787 ± 27.5800	209.0431 ± 177.7868	391.8434 ± 177.2783
27F	1492R	BamHI	6096	1.32%	1488.3990 ± 30.2285	582.3709 ± 362.9514	882.6081 ± 364.9428
27F	1492R	Sau961	6036	1.31%	1488.5759 ± 23.7352	240.6264 ± 73.8390	306.9844 ± 172.7551
8F	1492R	Sau961	6027	1.31%	1488.5756 ± 23.7186	240.6011 ± 73.7258	307.0056 ± 172.7442
8F	1492R	BamHI	5984	1.30%	1488.3869 ± 30.3051	582.9230 ± 363.5575	882.5520 ± 365.6852

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>Nº de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
517F	806R	HindIII	5880	1.27%	290.5743 ± 27.2785	120.3716 ± 36.6334	169.3956 ± 30.6332
27F	939R	BamHI	5815	1.26%	923.1673 ± 17.5402	487.6856 ± 236.5291	415.9933 ± 227.9906
27F	806R	BamHI	5767	1.25%	793.3251 ± 16.3704	351.3159 ± 182.1687	421.4576 ± 181.2431
8F	939R	BamHI	5698	1.23%	923.2197 ± 17.4257	487.6985 ± 237.8194	416.4763 ± 229.4764
8F	806R	BamHI	5658	1.23%	793.3604 ± 16.3374	350.4714 ± 182.9269	422.9634 ± 182.0291
786F	1406R	EcoRI	5645	1.22%	624.8066 ± 61.9012	258.4252 ± 142.6383	364.2691 ± 137.1092
786F	1387R	BamHI	5577	1.21%	602.5967 ± 26.8914	201.6785 ± 176.6077	399.9363 ± 177.5693
786F	1389R	EcoRI	5239	1.14%	624.1517 ± 61.0804	256.3697 ± 140.0337	365.6774 ± 134.1891
968F	1406R	HindIII	4877	1.06%	440.9861 ± 36.4334	165.0720 ± 129.4299	275.2639 ± 129.9819
343F	536R	HindIII	4610	1.00%	188.8553 ± 24.0990	93.4839 ± 35.5093	94.7269 ± 32.3182
343F	518R	HindIII	4607	1.00%	186.8539 ± 24.1062	93.4521 ± 35.5216	92.7569 ± 32.3272
341F	536R	HindIII	4543	0.98%	190.8409 ± 24.2424	96.3896 ± 35.1652	93.7973 ± 31.8551
341F	518R	HindIII	4540	0.98%	188.8369 ± 24.2452	96.3712 ± 35.1738	91.8115 ± 31.8613
968F	1389R	HindIII	4506	0.98%	441.0450 ± 37.8515	171.4207 ± 129.1222	268.9277 ± 129.7398
63F	1492R	BamHI	4117	0.89%	1445.0848 ± 20.0381	550.1513 ± 296.4098	863.7722 ± 283.8499
786F	1492R	HindIII	3920	0.85%	725.3383 ± 36.4059	276.1015 ± 194.3016	446.4987 ± 194.6505
786F	1492R	BamHI	3428	0.74%	727.3188 ± 44.1454	223.0799 ± 194.3465	503.0125 ± 194.0832
968F	1492R	EcoRI	3387	0.73%	543.5506 ± 47.0136	213.2359 ± 184.2177	324.7800 ± 183.0967
786F	907R	BamHI	3318	0.72%	143.0799 ± 35.5709	57.3134 ± 15.0596	85.5690 ± 17.6771
786F	1387R	EcoRI	3257	0.71%	603.9484 ± 60.2481	226.6155 ± 90.0805	376.4515 ± 81.6261
27F	518R	BamHI	3247	0.70%	522.8854 ± 20.3497	195.6732 ± 94.5377	324.1084 ± 91.8603
27F	536R	BamHI	3239	0.70%	524.9352 ± 20.3400	195.6842 ± 94.5746	326.1395 ± 91.9320
8F	518R	BamHI	3205	0.69%	522.9520 ± 20.3134	193.9910 ± 94.9549	325.8618 ± 92.3730
8F	536R	BamHI	3198	0.69%	524.9809 ± 20.3368	193.9575 ± 95.0059	327.9174 ± 92.4381
786F	939R	BamHI	3111	0.67%	156.1488 ± 36.7327	57.3147 ± 15.4736	98.6236 ± 18.1998
786F	907R	HindIII	2953	0.64%	141.8700 ± 40.1220	75.7988 ± 33.9699	65.9357 ± 25.8317
1055F	1406R	HindIII	2881	0.62%	353.4703 ± 41.6955	179.7178 ± 79.7042	173.3832 ± 81.3196
1055F	1406R	EcoRI	2845	0.62%	356.2629 ± 85.4137	306.6735 ± 58.3844	49.0520 ± 65.7992

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>Nº de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
1099F	1406R	HindIII	2812	0.61%	309.5437 ± 44.8386	135.8087 ± 79.8447	173.0107 ± 81.0533
1099F	1406R	EcoRI	2784	0.60%	311.6613 ± 88.4491	263.1853 ± 60.7050	47.9267 ± 61.7633
968F	1406R	BamHI	2743	0.59%	438.4816 ± 37.9066	156.2559 ± 129.2403	281.8410 ± 128.2985
1055F	1389R	EcoRI	2700	0.59%	354.8078 ± 83.4444	307.6433 ± 58.4338	46.5981 ± 58.6149
1055F	1389R	HindIII	2684	0.58%	353.0755 ± 41.6823	177.6311 ± 80.7692	175.0487 ± 82.0597
1099F	1389R	EcoRI	2653	0.57%	311.8319 ± 90.5980	263.9574 ± 61.0621	47.2982 ± 62.1698
917F	1406R	Sau961	2613	0.57%	488.0115 ± 9.0381	10.0000 ± .0000	270.1956 ± 198.0820
1099F	1389R	HindIII	2610	0.57%	309.5077 ± 46.3611	133.6084 ± 80.9948	175.1188 ± 82.2874
917F	1406R	AluI	2603	0.56%	487.9992 ± 9.0483	143.8098 ± 28.6773	229.8767 ± 121.1495
917F	1406R	HhaI	2590	0.56%	487.9722 ± 9.0256	169.2039 ± 43.0523	256.5363 ± 85.7820
917F	1406R	BfaI	2584	0.56%	488.0112 ± 9.0462	326.4729 ± 136.1904	64.2786 ± 21.7988
786F	926R	HindIII	2580	0.56%	141.6473 ± 30.8823	78.0787 ± 32.4718	63.4136 ± 21.9450
917F	1406R	BstUI	2545	0.55%	487.9238 ± 8.9871	121.6389 ± 124.6277	192.5383 ± 170.3783
917F	1406R	TaqI	2537	0.55%	487.8514 ± 8.9964	50.6129 ± 43.2812	192.4616 ± 159.6207
968F	1387R	EcoRI	2534	0.55%	421.8227 ± 59.4840	61.2033 ± 70.3433	360.1125 ± 59.4430
917F	1406R	MspI	2527	0.55%	488.0487 ± 9.0845	224.7772 ± 92.7738	45.3000 ± 61.4435
968F	1389R	BamHI	2479	0.54%	438.6293 ± 39.7595	152.1359 ± 128.2703	286.0968 ± 127.3583
786F	1492R	EcoRI	2470	0.54%	729.7279 ± 71.3212	276.8316 ± 167.3900	450.2538 ± 160.2078
786F	939R	HindIII	2436	0.53%	154.4992 ± 33.3342	77.8705 ± 26.8474	76.4816 ± 26.5577
968F	1387R	HindIII	2433	0.53%	421.8303 ± 42.3954	185.4432 ± 138.3550	235.2833 ± 140.3925
917F	1406R	DdeI	2209	0.48%	488.2802 ± 9.2990	282.6247 ± 117.3851	135.5324 ± 67.1276
968F	1492R	HindIII	2177	0.47%	545.0579 ± 43.9537	198.8443 ± 145.0662	343.8686 ± 147.2571
786F	926R	BamHI	2147	0.47%	144.0713 ± 44.0434	60.6418 ± 17.7446	83.1998 ± 21.5310
917F	1389R	RsaI	2138	0.46%	488.0674 ± 9.3339	335.0589 ± 102.3919	13.0000 ± .0000
917F	1389R	Sau961	2138	0.46%	488.0674 ± 9.3339	10.0000 ± .0000	246.4593 ± 199.1146
917F	1389R	AluI	2129	0.46%	488.0597 ± 9.3509	145.2799 ± 26.2638	235.9441 ± 120.1067
917F	1389R	MspI	2127	0.46%	488.0705 ± 9.3157	221.9234 ± 92.1211	35.5933 ± 44.2394
917F	1389R	HhaI	2122	0.46%	488.0443 ± 9.3354	169.1984 ± 42.9971	259.0938 ± 83.6845

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>Nº de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
63F	518R	BamHI	2118	0.46%	481.8166 ± 40.7901	180.9731 ± 107.0608	299.1146 ± 99.1017
63F	536R	BamHI	2115	0.46%	483.8260 ± 40.8347	180.8988 ± 106.9500	301.1934 ± 98.9898
917F	1389R	BfaI	2113	0.46%	488.0786 ± 9.3446	337.9588 ± 130.2587	63.9068 ± 18.5392
917F	1387R	MspI	2106	0.46%	470.3628 ± 9.3552	227.4520 ± 89.8615	4.0000 ± .0000
917F	1387R	Sau96I	2106	0.46%	470.3628 ± 9.3552	10.0000 ± .0000	372.4886 ± 129.9748
917F	1389R	TaqI	2103	0.46%	488.0685 ± 9.3525	50.5373 ± 43.4200	191.8302 ± 159.5497
917F	1389R	BstUI	2092	0.45%	487.9794 ± 9.2857	104.8772 ± 111.4182	206.6816 ± 174.0625
917F	1387R	HhaI	2091	0.45%	470.3702 ± 9.3760	173.8006 ± 41.0976	246.3989 ± 78.5658
917F	1387R	AluI	2083	0.45%	470.3207 ± 9.3913	146.6755 ± 23.0435	232.3850 ± 116.7407
917F	1387R	BfaI	2077	0.45%	470.3327 ± 9.4038	359.1709 ± 122.4792	44.6326 ± 14.8376
917F	1387R	BstUI	2075	0.45%	470.3759 ± 9.3657	97.9716 ± 104.0369	231.5875 ± 185.6234
917F	1387R	TaqI	2042	0.44%	470.2116 ± 9.3591	54.8937 ± 57.6170	158.6518 ± 152.3419
917F	1406R	RsaI	2030	0.44%	488.2389 ± 9.5876	292.9901 ± 84.9282	161.5833 ± 55.9454
917F	1406R	HaeIII	2013	0.44%	487.4958 ± 9.9619	266.9329 ± 102.5360	117.0412 ± 87.3081
917F	1387R	DdeI	1875	0.41%	470.6539 ± 9.6946	217.3851 ± 126.8686	106.8373 ± 50.7991
1055F	1492R	HindIII	1844	0.40%	454.9881 ± 39.8373	237.4718 ± 110.7837	217.5022 ± 117.4586
1099F	1492R	HindIII	1816	0.39%	410.9053 ± 43.6240	193.1344 ± 110.6318	217.2137 ± 116.4043
917F	1389R	DdeI	1811	0.39%	488.2281 ± 9.6498	281.1380 ± 115.5878	136.5930 ± 68.6373
1055F	1492R	EcoRI	1786	0.39%	460.0571 ± 81.0310	319.4323 ± 60.6527	140.3410 ± 68.7113
917F	1387R	RsaI	1756	0.38%	471.1640 ± 9.4913	302.7443 ± 74.6579	146.1418 ± 39.0428
1099F	1492R	EcoRI	1729	0.37%	414.1122 ± 77.7403	274.2915 ± 59.6754	139.5275 ± 56.9329
968F	1387R	BamHI	1726	0.37%	417.7159 ± 47.7358	144.1200 ± 125.6468	273.2464 ± 124.2296
1099F	1406R	BamHI	1713	0.37%	311.2522 ± 54.6472	179.3649 ± 23.7317	131.0018 ± 45.8253
917F	1389R	HaeIII	1701	0.37%	487.5226 ± 10.2089	272.8701 ± 101.9115	106.4509 ± 84.1938
27F	518R	EcoRI	1579	0.34%	521.9671 ± 40.6418	183.3528 ± 158.3201	335.8740 ± 160.4902
27F	536R	EcoRI	1578	0.34%	524.0215 ± 40.6913	183.3802 ± 158.3277	337.8251 ± 160.5165
1055F	1406R	BamHI	1573	0.34%	355.3369 ± 53.9509	222.8341 ± 27.7057	131.5321 ± 44.8176
8F	518R	EcoRI	1563	0.34%	522.1273 ± 40.7576	183.2559 ± 158.6363	336.2994 ± 160.8139

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>Nº de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
8F	536R	EcoRI	1562	0.34%	524.1825 ± 40.8074	183.2836 ± 158.6442	338.2503 ± 160.8407
1099F	1389R	BamHI	1497	0.32%	311.5845 ± 58.3909	179.0461 ± 24.7098	131.5638 ± 48.5759
1055F	1387R	HindIII	1380	0.30%	333.9362 ± 43.1931	215.1785 ± 50.0158	118.1513 ± 59.1540
1055F	1389R	BamHI	1356	0.29%	354.7699 ± 55.4728	222.4963 ± 27.5136	131.1903 ± 43.4756
1099F	1387R	HindIII	1351	0.29%	289.9830 ± 43.8895	171.2554 ± 50.0419	118.1014 ± 59.4010
968F	1492R	BamHI	1322	0.29%	546.3086 ± 68.1646	171.3979 ± 149.4763	374.6906 ± 147.1531
917F	1387R	HaeIII	1316	0.29%	469.0213 ± 11.3562	260.3883 ± 85.6440	159.1223 ± 48.7867
1099F	1387R	BamHI	1232	0.27%	290.6916 ± 40.7014	178.2468 ± 25.9348	112.3977 ± 43.7923
1055F	1387R	BamHI	1227	0.27%	334.4706 ± 40.8466	221.7398 ± 27.4182	112.6835 ± 44.6177
917F	1492R	Sau961	1062	0.23%	591.5320 ± 8.9514	10.0000 ± .0000	253.8729 ± 206.8649
917F	1492R	BfaI	1058	0.23%	591.5340 ± 8.9046	326.8819 ± 137.0372	155.1928 ± 34.6539
917F	1492R	RsaI	1058	0.23%	591.5293 ± 8.9662	336.0964 ± 98.1454	116.1730 ± 21.4077
917F	1492R	AluI	1056	0.23%	591.5085 ± 8.9548	141.6723 ± 30.3085	200.3674 ± 168.4283
917F	1492R	MspI	1056	0.23%	591.4517 ± 8.8208	236.9015 ± 99.0298	123.3286 ± 69.7305
917F	1492R	HhaI	1055	0.23%	591.5081 ± 8.9464	167.5744 ± 44.2562	319.4588 ± 138.3591
917F	1492R	BstUI	1041	0.23%	591.6158 ± 8.8579	120.3573 ± 124.7978	292.6657 ± 173.2856
917F	1492R	TaqI	1039	0.23%	591.3013 ± 8.8149	49.4196 ± 42.6976	184.8373 ± 162.5295
917F	1492R	HaeIII	968	0.21%	591.3254 ± 8.9179	312.5506 ± 135.9575	130.1983 ± 94.2919
343F	536R	EcoRI	944	0.20%	201.4650 ± 147.1670	100.3326 ± 37.1022	97.9555 ± 110.9773
343F	518R	EcoRI	942	0.20%	198.5053 ± 144.1181	100.1401 ± 36.5156	95.1815 ± 108.4918
917F	1492R	DdeI	938	0.20%	591.8188 ± 9.0461	293.4051 ± 129.3906	146.7537 ± 124.3575
341F	536R	EcoRI	933	0.20%	203.7149 ± 148.0115	102.3505 ± 37.1415	98.1501 ± 111.5707
341F	518R	EcoRI	932	0.20%	200.2371 ± 143.6166	102.2002 ± 36.2412	94.8767 ± 108.1287
1099F	1492R	BamHI	869	0.19%	417.7192 ± 75.2912	201.5915 ± 64.9130	214.0207 ± 89.2352
1055F	1492R	BamHI	799	0.17%	461.7247 ± 77.3080	246.5582 ± 71.0864	213.1039 ± 90.3607
786F	907R	EcoRI	501	0.11%	175.9940 ± 195.5064	78.9421 ± 154.0638	94.7206 ± 39.1722
786F	926R	EcoRI	490	0.11%	167.0755 ± 175.7219	73.7041 ± 140.2403	91.7367 ± 33.1512
63F	536R	EcoRI	385	0.08%	498.0753 ± 77.8665	172.1403 ± 146.1516	323.0649 ± 137.6150

<i>Primer F</i>	<i>Primer R</i>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>N° de Sequências Digeridas</b>	<b>% de Sequências Digeridas</b>	<b>Tamanho Amplicons (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 5' (Média)</b>	<b>Tamanho Fragmento 3' (Média)</b>
63F	518R	EcoRI	384	0.08%	493.4271 ± 61.5729	171.6055 ± 145.5012	319.0452 ± 136.4619
343F	518R	BamHI	251	0.05%	203.8526 ± 135.8472	108.0080 ± 90.2844	93.9203 ± 58.7453
343F	536R	BamHI	251	0.05%	205.8526 ± 135.8472	108.0080 ± 90.2844	95.9203 ± 58.7453
341F	518R	BamHI	249	0.05%	206.2008 ± 136.3362	110.4137 ± 90.4637	93.8474 ± 58.9060
341F	536R	BamHI	249	0.05%	208.2008 ± 136.3362	110.4137 ± 90.4637	95.8474 ± 58.9060
1099F	1387R	EcoRI	189	0.04%	329.3016 ± 239.7574	170.2698 ± 154.4465	155.9524 ± 118.3311
1055F	1387R	EcoRI	179	0.04%	376.0000 ± 246.8542	217.0169 ± 157.4628	155.7135 ± 120.1031
786F	939R	EcoRI	162	0.04%	225.8642 ± 273.8145	109.1420 ± 228.7368	114.4568 ± 53.9997
917F	1406R	HindIII	127	0.03%	489.1339 ± 7.1329	289.1181 ± 124.1468	200.0157 ± 122.4841
917F	1492R	HindIII	76	0.02%	594.8553 ± 8.9825	325.0526 ± 110.7971	269.8026 ± 107.4393
917F	1406R	BamHI	65	0.01%	485.8615 ± 9.9544	151.5538 ± 110.8122	333.6154 ± 107.1223
917F	1406R	EcoRI	59	0.01%	495.0847 ± 40.5472	302.1356 ± 181.4615	186.0678 ± 191.7338
917F	1389R	BamHI	56	0.01%	485.8214 ± 9.9272	151.7679 ± 110.7173	333.8036 ± 107.2463
917F	1389R	EcoRI	54	0.01%	495.7593 ± 42.3391	290.0556 ± 184.5416	198.1852 ± 195.6277
917F	1387R	BamHI	45	0.01%	465.5556 ± 8.6012	132.2000 ± 93.3368	332.6667 ± 91.2350
917F	1389R	HindIII	40	0.01%	487.1500 ± 7.7907	176.9750 ± 118.3015	310.1750 ± 118.3565
917F	1492R	EcoRI	34	0.01%	591.4706 ± 8.7047	274.1471 ± 186.9482	316.2647 ± 189.2155
917F	1492R	BamHI	31	0.01%	590.2258 ± 10.4042	152.1290 ± 124.4285	437.0968 ± 121.9504
917F	1387R	HindIII	23	0.00%	466.2174 ± 5.9464	208.6522 ± 132.6755	257.5652 ± 131.9679
917F	1387R	EcoRI	11	0.00%	498.8182 ± 93.7217	142.1818 ± 114.1506	356.6364 ± 163.9367