

Genêros de microrganismos comumente utilizados na produção de insumo agrícola com microrganismos vivo cultivável em meio de cultura como ingrediente ativo

Bactérias: *Bradyrhizobium* spp., *Rhizobium* spp., *Paraburkholderia* spp. *Bacillus* spp., *Azospirillum* spp., *Pseudomonas fluorescens*.

Fungos: *Trichoderma* spp., *Metarhizium* spp. e *Beauveria* spp.

Amplificação Rep-PCR com primer BOX	Sequência do primer	BOX 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'																							
	Composição da reação	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Componente</th> <th>Concentração final</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Tampão</td> <td>1×</td> </tr> <tr> <td>dNTPs</td> <td>0,3 mM cada base</td> </tr> <tr> <td>MgCl₂</td> <td>3,4 mM</td> </tr> <tr> <td>Primer BOX</td> <td>2 µM</td> </tr> <tr> <td>Taq polimerase</td> <td>1 U</td> </tr> <tr> <td>DNA gnômico</td> <td>~50 ng</td> </tr> </tbody> </table>			Componente	Concentração final	Tampão	1×	dNTPs	0,3 mM cada base	MgCl ₂	3,4 mM	Primer BOX	2 µM	Taq polimerase	1 U	DNA gnômico	~50 ng							
	Componente	Concentração final																							
Tampão	1×																								
dNTPs	0,3 mM cada base																								
MgCl ₂	3,4 mM																								
Primer BOX	2 µM																								
Taq polimerase	1 U																								
DNA gnômico	~50 ng																								
Condições de amplificação térmica	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Etapa</th> <th>Temperatura (°C)</th> <th>Tempo</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Desnaturação inicial</td> <td>95 °C</td> <td>7 min</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">30 a 35 ciclos</td> <td>Desnaturação</td> <td>94 °C</td> <td>1 min</td> </tr> <tr> <td>Anelamento</td> <td>54°C*</td> <td>1 min</td> </tr> <tr> <td>Extensão</td> <td>70 °C</td> <td>8 min</td> </tr> <tr> <td>Extensão final</td> <td>70 °C</td> <td>16 min</td> </tr> <tr> <td>Armazenamento</td> <td>4 °C</td> <td>∞</td> </tr> </tbody> </table> <p>* Dependendo das condições analíticas, temperaturas de anelamento entre 53 °C e 56 °C tendem a proporcionar boa amplificação. Recomenda-se a avaliação experimental dentro desse intervalo para identificar a condição que otimize os resultados.</p>			Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Desnaturação inicial	95 °C	7 min	30 a 35 ciclos	Desnaturação	94 °C	1 min	Anelamento	54°C*	1 min	Extensão	70 °C	8 min	Extensão final	70 °C	16 min	Armazenamento	4 °C	∞
Etapa	Temperatura (°C)	Tempo																							
Desnaturação inicial	95 °C	7 min																							
30 a 35 ciclos	Desnaturação	94 °C	1 min																						
	Anelamento	54°C*	1 min																						
	Extensão	70 °C	8 min																						
Extensão final	70 °C	16 min																							
Armazenamento	4 °C	∞																							

Observações:

- 1) A seleção e o uso de insumos devem ser precedidos de validação interna no laboratório, considerando as recomendações dos fabricantes, as características do microrganismo-alvo e a finalidade analítica do ensaio, que no caso do rep-PCR é a geração de perfis eletroforéticos de qualidade adequada para análise comparativa.
- 2) Alterações na reação, como a inclusão de um segundo primer, modificação das concentrações iniciais dos reagentes ou adição de soluções voltadas à otimização da amplificação, podem exigir ajustes no volume final da mistura. A compensação deve ser realizada no volume de água livre de nucleases de forma a completar o volume total estabelecido para a reação.
- 3) Ajustes na concentração de MgCl₂ e/ou da temperatura de extensão, conforme as recomendações do fabricante da enzima Taq DNA polimerase, pode contribuir para a otimização do desempenho da reação.
- 4) Enzimas que requerem ativação prévia podem demandar a inclusão de uma etapa inicial obrigatória no perfil térmico da reação, conforme especificado pelo fabricante.

Cepas geneticamente muito próximas, que apresentem perfis indistinguíveis com o uso do primer BOX, podem exigir a aplicação de primers alternativos buscando obter perfis diferenciadores.

Opções primers para amplificação																				
Amplificação Rep-PCR com par de primer REP 1R e REP 2I	Sequências dos primers	REP 1R 5'-IIIICGICGICATCIGGC- 3' REP 2I 5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'																		
	Composição da reação	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Componente</th> <th>Concentração final</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Tampão</td> <td>1×</td> </tr> <tr> <td>dNTPs</td> <td>0,3 mM cada base</td> </tr> <tr> <td>MgCl₂</td> <td>3,4 mM</td> </tr> <tr> <td>REP 1R</td> <td>2 μM</td> </tr> <tr> <td>REP 2I</td> <td>2 μM</td> </tr> <tr> <td>Taq polimerase</td> <td>1 U</td> </tr> <tr> <td>DNA gnômico</td> <td>~50 ng</td> </tr> </tbody> </table>	Componente	Concentração final	Tampão	1×	dNTPs	0,3 mM cada base	MgCl ₂	3,4 mM	REP 1R	2 μM	REP 2I	2 μM	Taq polimerase	1 U	DNA gnômico	~50 ng		
	Componente	Concentração final																		
Tampão	1×																			
dNTPs	0,3 mM cada base																			
MgCl ₂	3,4 mM																			
REP 1R	2 μM																			
REP 2I	2 μM																			
Taq polimerase	1 U																			
DNA gnômico	~50 ng																			
Condições de amplificação térmica	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Etapa</th> <th>Temperatura (°C)</th> <th>Tempo</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Desnaturação inicial</td> <td>95 °C</td> <td>7 min</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">30 a 35 ciclos</td> <td>Desnaturação</td> <td>94 °C</td> </tr> <tr> <td>Anelamento</td> <td>54 °C</td> </tr> <tr> <td>Extensão</td> <td>70 °C</td> </tr> <tr> <td>Extensão final</td> <td>70 °C</td> <td>16 min</td> </tr> <tr> <td>Armazenamento</td> <td>4 °C</td> <td>∞</td> </tr> </tbody> </table>	Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Desnaturação inicial	95 °C	7 min	30 a 35 ciclos	Desnaturação	94 °C	Anelamento	54 °C	Extensão	70 °C	Extensão final	70 °C	16 min	Armazenamento	4 °C	∞
Etapa	Temperatura (°C)	Tempo																		
Desnaturação inicial	95 °C	7 min																		
30 a 35 ciclos	Desnaturação	94 °C																		
	Anelamento	54 °C																		
	Extensão	70 °C																		
Extensão final	70 °C	16 min																		
Armazenamento	4 °C	∞																		
Amplificação Rep-PCR com par de primer ERIC 1R e ERIC 2	Sequências dos primers	ERIC 1R 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3' ERIC 2 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'																		
	Composição da reação	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Componente</th> <th>Concentração final</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Tampão</td> <td>1×</td> </tr> <tr> <td>dNTPs</td> <td>0,3 mM cada base</td> </tr> <tr> <td>MgCl₂</td> <td>3,4 mM</td> </tr> <tr> <td>ERIC 1R</td> <td>2 μM</td> </tr> <tr> <td>ERIC 2</td> <td>2 μM</td> </tr> <tr> <td>Taq polimerase</td> <td>1 U</td> </tr> <tr> <td>DNA gnômico</td> <td>~50 ng</td> </tr> </tbody> </table>	Componente	Concentração final	Tampão	1×	dNTPs	0,3 mM cada base	MgCl ₂	3,4 mM	ERIC 1R	2 μM	ERIC 2	2 μM	Taq polimerase	1 U	DNA gnômico	~50 ng		
	Componente	Concentração final																		
Tampão	1×																			
dNTPs	0,3 mM cada base																			
MgCl ₂	3,4 mM																			
ERIC 1R	2 μM																			
ERIC 2	2 μM																			
Taq polimerase	1 U																			
DNA gnômico	~50 ng																			
Condições de amplificação térmica	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Etapa</th> <th>Temperatura (°C)</th> <th>Tempo</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Desnaturação inicial</td> <td>95 °C</td> <td>7 min</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">30 a 35 ciclos</td> <td>Desnaturação</td> <td>94 °C</td> </tr> <tr> <td>Anelamento</td> <td>52 °C</td> </tr> <tr> <td>Extensão</td> <td>70 °C</td> </tr> <tr> <td>Extensão final</td> <td>70 °C</td> <td>16 min</td> </tr> <tr> <td>Armazenamento</td> <td>4 °C</td> <td>∞</td> </tr> </tbody> </table>	Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Desnaturação inicial	95 °C	7 min	30 a 35 ciclos	Desnaturação	94 °C	Anelamento	52 °C	Extensão	70 °C	Extensão final	70 °C	16 min	Armazenamento	4 °C	∞
Etapa	Temperatura (°C)	Tempo																		
Desnaturação inicial	95 °C	7 min																		
30 a 35 ciclos	Desnaturação	94 °C																		
	Anelamento	52 °C																		
	Extensão	70 °C																		
Extensão final	70 °C	16 min																		
Armazenamento	4 °C	∞																		

Amplificação Rep-PCR com par de primer REP 1R-Dt e REP 2-Dt	Sequências dos primers	REP 1R-Dt 5'- IIINCGNCGNCATCNGGC- 3' REP 2-Dt 5'- NCGNCTTATCNGGCCTAC- 3'																								
	Composição da reação	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Componente</th> <th>Concentração final</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Tampão</td> <td>1×</td> </tr> <tr> <td>dNTPs</td> <td>0,3 mM cada base</td> </tr> <tr> <td>MgCl₂</td> <td>3,4 mM</td> </tr> <tr> <td>REP 1R-Dt</td> <td>2 μM</td> </tr> <tr> <td>REP 2-Dt</td> <td>2 μM</td> </tr> <tr> <td>Taq polimerase</td> <td>1 U</td> </tr> <tr> <td>DNA gnômico</td> <td>~50 ng</td> </tr> </tbody> </table>			Componente	Concentração final	Tampão	1×	dNTPs	0,3 mM cada base	MgCl ₂	3,4 mM	REP 1R-Dt	2 μM	REP 2-Dt	2 μM	Taq polimerase	1 U	DNA gnômico	~50 ng						
	Componente	Concentração final																								
Tampão	1×																									
dNTPs	0,3 mM cada base																									
MgCl ₂	3,4 mM																									
REP 1R-Dt	2 μM																									
REP 2-Dt	2 μM																									
Taq polimerase	1 U																									
DNA gnômico	~50 ng																									
Condições de amplificação térmica	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Etapa</th> <th>Temperatura (°C)</th> <th>Tempo</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Desnaturação inicial</td> <td>95 °C</td> <td>7 min</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">30 a 35 ciclos</td> <td>Desnaturação</td> <td>94 °C</td> <td>1 min</td> </tr> <tr> <td>Anelamento</td> <td>50 °C</td> <td>1 min</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Extensão</td> <td>70 °C</td> <td>8 min</td> </tr> <tr> <td>Extensão final</td> <td>70 °C</td> <td>16 min</td> </tr> <tr> <td>Armazenamento</td> <td>4 °C</td> <td>∞</td> </tr> </tbody> </table>			Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Desnaturação inicial	95 °C	7 min	30 a 35 ciclos	Desnaturação	94 °C	1 min	Anelamento	50 °C	1 min		Extensão	70 °C	8 min	Extensão final	70 °C	16 min	Armazenamento	4 °C	∞
Etapa	Temperatura (°C)	Tempo																								
Desnaturação inicial	95 °C	7 min																								
30 a 35 ciclos	Desnaturação	94 °C	1 min																							
	Anelamento	50 °C	1 min																							
	Extensão	70 °C	8 min																							
Extensão final	70 °C	16 min																								
Armazenamento	4 °C	∞																								

Caso a diferenciação entre as cepas ainda não seja obtida, pode ser realizados estudos com intuito de identificar primers com capacidade discriminatória adequada ao par de cepas em avaliação. Referências úteis para essa seleção incluem o trabalho clássico de Versalovic et al. (1994), bem como outros estudos científicos sobre aplicação da técnica rep-PCR na diferenciação de estirpes microbianas.

Nota: As cepas Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense*, amplamente utilizadas na formulação de inoculantes, é um conhecido exemplo de cepas geneticamente muito próximas. O primer BOX pode não ser capaz de gerar perfis diferenciadores entre estas cepas com o nível de confiabilidade requerido para aplicações analíticas de rotina, especialmente em análises fiscais e periciais, dependendo do banco de germoplasma de origem do isolado presente no produto. Resultados mais resolutivos têm sido observados com a utilização de primers REP 1R-Dt e REP 2-Dt em par, ou com a combinação entre REP 1R ou REP 2I e ERIC 2. Pode ser necessária a realização de duas ou mais reações de rep-PCR utilizando diferentes primers, a fim de aumentar o poder discriminatório do método. Recomenda-se, nesses casos, a inclusão de material de referência proveniente de, no mínimo, dois bancos de germoplasma distintos (incluindo o de origem do material).