



**cgEE**

Centro de Gestão e Estudos Estratégicos  
*Ciência, Tecnologia e Inovação*

---

# **Taxonomia: Microbiana, de Procariontes, de Fungos, de Protozoários e de Vírus**



## DOCUMENTO

### Taxonomia Microbiana

#### Taxonomia de Procariontes

Fabiano L. Thompson & Valéria Maia de Oliveira

Divisão de Recursos Microbianos &

Coleção Brasileira de Microrganismos do Ambiente e Indústria (CBMAI)

CPQBA, UNICAMP

Alexandre Caselatto 999, CEP 13140000, Paulínia, Brasil.

E-mail: [Fabiano.Thompson@terra.com.br](mailto:Fabiano.Thompson@terra.com.br); [vmaia\\_oliveira@yahoo.com.br](mailto:vmaia_oliveira@yahoo.com.br)

#### Taxonomia de Fungos

João Lúcio de Azevedo<sup>1</sup>, Welington Luiz de Araújo<sup>1</sup> & Carlos A. Inácio<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Genética de Microrganismos, Departamento de Genética

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), USP.

Av. Pádua Dias, 11, B. Agronomia, Cx Postal 83

13400-970 Piracicaba, São Paulo

E-mail: [jazevedo@esalq.usp.br](mailto:jazevedo@esalq.usp.br) e [wlaraujo@esalq.usp.br](mailto:wlaraujo@esalq.usp.br)

<sup>2</sup> Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília

Campus Universitário Darcy Ribeiro

CEP 70910-900, Brasília DF

E-mail: [inacio@unb.br](mailto:inacio@unb.br)

#### Taxonomia de Protozoários

Mirna Helena Regali Seleglim

Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva

Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)

Rodovia Washington Luis, Km 235 - Cx. Postal 676

CEP 13565-905 - São Carlos/SP

[mirna@iqsc.usp.br](mailto:mirna@iqsc.usp.br)

#### Taxonomia de Vírus

Elliot Watanabe Kitajima

Centro de microscopia eletrônica (ESALQ/USP)

Av. Pádua dias 11- Caixa postal 9

Piracicaba-SP

e-mail: [ewkitaji@carpa.ciagri.usp.br](mailto:ewkitaji@carpa.ciagri.usp.br)

**Palavras-chave:** taxonomia, filogenia, evolução, identificação, genética de populações e coleções de cultura.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	5
<b>A DIVERSIDADE MICROBIANA</b> .....	6
<b>CONSIDERAÇÕES SOBRE A TAXONOMIA MICROBIANA</b> .....	12
Procariontes: Bactérias e Arquéias.....	12
Fungos .....	12
Protozoários .....	13
Vírus.....	14
<b>HISTÓRICO DA TAXONOMIA MICROBIANA</b> .....	16
Procariontes: Bactérias e Arquéias.....	16
Fungos .....	19
Protozoários .....	20
Vírus.....	23
Vírus de DNA como genoma:.....	23
Potexvirus, Trichovirus, Vitivirus.....	23
Tobravirus, Varicosavirus .....	24
Aspectos históricos da taxonomia microbiana no Brasil e estado da arte.....	24
Procariontes: Bactérias e Arquéias.....	24
Fungos .....	25
Protozoários .....	26
Vírus.....	27
Princípios, estratégias e técnicas modernas para a taxonomia .....	28
Procariontes: Bactérias e Arquéias.....	28
Fungos .....	31
Protozoários .....	35
Vírus.....	35
Impedimentos taxonômicos .....	36
<b>TENDÊNCIAS E PERSPECTIVAS</b> .....	39
<b>RECOMENDAÇÕES</b> .....	40
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	42

## INTRODUÇÃO

Uma pesquisa científica ou tecnológica só tem valor se puder ser convenientemente reproduzida. Quando essa pesquisa ou tecnologia envolve microrganismos, sejam eles bactérias, arqueias, fungos, vírus, protozoários ou algas, a manutenção das espécies envolvidas é altamente importante. Mais ainda, além da preservação, uma classificação apropriada tem que estar baseada em processos rigorosos a fim de serem sanadas quaisquer dúvidas e confusões, tanto quando uma pesquisa científica for desenvolvida, como também se um processo ou produto baseado em culturas microbianas vai ser reproduzido, muitas vezes gerando produtos sujeitos a regras rígidas de biossegurança e propriedade industrial. É devido a isso que muitos países, mantêm coleções de culturas internacionais de referência, destinadas a preservar microrganismos, sua distribuição e também funcionando como depositárias de culturas reconhecidas por agências de patenteamento. Algumas importantes coleções de microrganismos existem em diferentes países do mundo, desde independentes e sem fins lucrativos, até governamentais. Dentre elas podem ser citadas a American Type Culture Collection (ATCC) nos Estados Unidos, a DSMZ (Alemanha), BCCM (Bélgica), JCM (Japão), CBS (Holanda), USDA (Estados Unidos) entre outras. Essas coleções além da preservação e distribuição das culturas de microrganismos mantêm também um grupo de pesquisadores envolvidos em estudos de taxonomia e desenvolvimento de processos de manutenção mais apropriados em cada caso, preservando inclusive a estabilidade das linhagens estocadas.

## A DIVERSIDADE MICROBIANA

O Brasil é reconhecido como um dos países que apresenta um dos mais elevados índices de biodiversidade animal e vegetal. É o primeiro colocado no mundo no segmento plantas superiores, peixes de águas doce e mamíferos. Ocupa o segundo lugar dentre os países com megadiversidade em anfíbios e determinados insetos como borboletas e é o terceiro classificado na biodiversidade em aves.. Entretanto, se formos procurar dados sobre a diversidade microbiana brasileira verificamos que esses dados são escassos ou até mesmo inexistentes. No primeiro relatório Nacional para a convenção sobre diversidade biológica apresentado pelo Ministério do Meio ambiente dos recursos hídricos e da Amazônia Legal (1998) em suas 283 páginas, praticamente nada, exceto duas referências bibliográficas mencionam microrganismos. Essa ausência de dados sobre microrganismos é surpreendente e revela o descaso e a falta de conhecimento sobre a diversidade microbiana, tanto por falha dos pesquisadores como pelo desconhecimento de sua importância por parte dos órgãos governamentais. Atualmente conhece-se que menos de 5% das espécies existentes de fungos no nosso planeta foram descritas, pois das estimadas 1,5 milhões de espécies, pouco mais de 70.000 são mantidas em coleções de culturas no mundo todo. O mesmo ocorre com os organismos procariontes, pois embora existam 6.500 espécies descritas e estocadas em coleções de culturas, a estimativa é de que este número constitua apenas 1 a 10% do total existente em nosso planeta. Sabendo-se que o Brasil apresenta uma alta biodiversidade vegetal e animal e que as estimativas mencionadas acima são em parte baseadas na constante descoberta de novos microrganismos que vivem em conjunto com as mais de 300.000 espécies vegetais existentes, é de se esperar que o Brasil possua também uma enorme diversidade microbiana ainda praticamente não explorada. A idéia de que microrganismos sejam prejudiciais às atividades humanas é falsa. A maioria dos microrganismos, especialmente fungos, procariontes e algas é benéfica ao ser humano, aos animais domésticos, às plantas e na verdade, esses seres vivos são indispensáveis para a manutenção

da vida como um todo. Portanto, apenas uma restrita fração das espécies microbianas é prejudicial ao ser humano. De fato, a participação de produtos microbianos no mercado global é de 50 a 100 bilhões de dólares anuais, o que ainda é muito pouco em termos mundiais frente a potencialidade que eles apresentam do ponto de vista biotecnológico. Verifica-se um aumento constante na porcentagem de produtos derivados de microrganismos e até mesmo da utilização dos próprios microrganismos para as mais diversas finalidades. São lançados no mercado fármacos, cosméticos, enzimas, alimentos, corantes, aromáticos, bioinseticidas, além de microrganismos utilizados como inoculantes agrícolas que estimulam o crescimento por fixarem nitrogênio atmosférico ou produzem hormônios vegetais, solubilizadores de fosfatos e controladores de pragas e moléstias, degradadores de compostos tóxicos entre muitos outros.

Os exemplos citados são algumas das grandes potencialidades dos microrganismos que anualmente atingem o público consumidor. Daí vem a importância não só da pesquisa visando a descoberta de novos processos e produtos microbianos, como da manutenção e caracterização dos microrganismos. Aliás, isso já foi percebido por diversas empresas e grupos do exterior que freqüentemente realizam excursões em busca dos microrganismos de origem tropical não só no Brasil como em parte da América do Sul, Central e África.

Existe em todo o mundo uma crescente procura por microrganismos com potencialidade biotecnológica, visando a produção de fármacos como os antitumorais e produtos destinados principalmente a terceira idade, visando-se a descoberta de novos microrganismos capazes de diminuir a utilização de insumos agrícolas como os fertilizantes e agroquímicos, capazes de reduzir a poluição ambiental, além de muitos outros produtos derivados de microrganismos que se encontram praticamente inexplorados. A descoberta desses novos microrganismos, bem como sua preservação e classificação apropriada são imprescindíveis para que a nossa diversidade seja convenientemente utilizada, mantida e transformada em riquezas, antes que grupos de pesquisa e empresas de outros países o façam a partir da mesma. Ter biodiversidade é importante, mas saber e poder utilizá-la de maneira

apropriada é muito mais importante ainda. Em geral, microrganismos de interesse para as áreas industrial, ambiental e agrícola vêm sendo pesquisados no Brasil por instituições universitárias e de pesquisa eminentemente públicas. Esse é o caso, por exemplo, da EMBRAPA através de diversos de seus centros - Agrobiologia, Cenargen, CNPM - ou de universidades públicas estaduais e federais.

As coleções microbianas que resultam dos esforços de pesquisa das instituições citadas são, em geral, como a própria origem indica, muito mais coleções de pesquisa do que de serviço, nas quais os microrganismos são distribuídos sob um rígido controle de qualidade a fim de atender, principalmente, finalidades do setor produtivo e da pesquisa acadêmica aplicada. As coleções de pesquisa muitas vezes se perdem quando um pesquisador ou mesmo grupo cessa suas atividades ou muda seu foco de pesquisa. É uma perda irreparável tanto do ponto de vista acadêmico como financeiro. A tarefa de manutenção de culturas microbianas de modo duradouro e confiável é feita em determinados países por coleções nacionais, como já mencionado. Infelizmente, o Brasil não possuiu uma coleção de culturas comparável com as coleções de outros países. Existem, é verdade, iniciativas isoladas, mas ainda muito tímidas e restritas à manutenção de culturas para determinadas finalidades.

Alem de fungos, bactérias e arqueias, há que se considerar outros grupos de microrganismos também de importância acadêmica e aplicada. É o caso dos protozoários. Protozoários são organismos unicelulares, eucarióticos e microscópicos que podem ser parasitas ou de vida livre e são encontrados em quase que todos ambientes do planeta, sempre vinculados à presença de água. Vão ser aqui abordados apenas os de vida livre, que podem ser solitários ou viver em colônias, embora cada organismo seja independente um do outro. Eles podem ser encontrados em todos tipos de ambientes e foram tradicionalmente considerados como cosmopolitas, embora evidências recentes apontem para a possibilidade da ocorrência de espécies endêmicas (Godinho & Regali Selegim, 1999).



Apesar de possuírem diminuto tamanho, atualmente reconhece-se sua contribuição substancial nos ambientes aquáticos e terrestres, funcionando como elos de ligação entre diferentes níveis tróficos. Segundo Patterson (1996), a importância dos protozoários no ambiente está intimamente relacionada com o uso das bactérias como fonte de alimento. Os protozoários de vida livre possuem, de um modo geral, duas formas diferentes de obtenção de alimento: filtração e predação (Hausmann & Hülsmann, 1996). Por possuírem distintas fontes de alimento como, por exemplo, a heterotrófica ou mesmo a mixotrófica, o grupo dos protozoários é considerado artificial, não sendo mais, hoje em dia, considerado um filo. Entretanto, o termo protozoário foi “universalizado” e continua sendo utilizado em trabalhos científicos embora os pesquisadores estejam cientes do fato do termo não ter mais valor científico. Fazem parte desse grupo organismos de diversos filos e não existe consenso, por parte dos pesquisadores da área, um consenso sobre o número exato destes e a classificação dos mesmos, embora vários sistemas tenham sido propostos (Cavalier-Smith, 1993). Entretanto, os principais filos de protozoários de vida livre, segundo Lee *et al.* (1985) são os *Ciliophora* (ciliados) e *Sarcomastigophora* (amebas, heliozoários e flagelados).

Os protozoários constituem um grupo que apresenta grande diversidade. Há controvérsias sobre o número estimado de espécies. Vickerman (1992) aponta pelo menos 28.000 para os grupos somados. Existem coleções de cultura de protozoários vivos que são mantidas para serem vendidas a qualquer pesquisador que demandar. Estes organismos podem ser usados como material didático em escolas e universidades ou para pesquisa. No exterior as principais coleções de cultura se encontram nos EUA (American Type Culture Collection, Carolina Biological Supply Company e Smithsonian Institution) e na Inglaterra (Culture Centre of Algae and Protozoa). Elas dispõem de linhagens de organismos dos mais variados grupos, inclusive de protozoários. No Brasil, embora tenham ocorrido tentativas para se criarem coleções de cultura de referência, conhece-se apenas a existência de algumas coleções informais com linhagens mantidas e usadas para pesquisas e ensino em universidades ou escolas. Elas são mantidas sem financiamento específico e fornecem material sem cobrança. Essas coleções sofrem, portanto, com a falta de

recursos para a compra de material e também com a falta de mão de obra especializada para o isolamento de novas linhagens, execução dos meios de cultura e repicagens que são necessárias com freqüência para sua manutenção. Como exemplo ao que foi relatado acima, existe uma coleção informal no Laboratório de Ecologia de Microrganismos Aquáticos da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) que possui pelo menos 10 linhagens de protozoários mantidas em cultura.

Para fins taxonômicos, existem também coleções de lâminas preparadas de espécimens-tipo, que são mantidas muitas vezes em laboratórios ou museus (e.g. Museu de História Natural de Paris). Na tentativa de centralizar tal material, em benefício de todos os pesquisadores foi criada, em 1963, a “Coleção Internacional de Espécies-Tipo de Ciliados”, que ficou sediada inicialmente na Universidade de Illinois e foi posteriormente transferida para a Smithsonian Institution onde está atualmente (Corliss, 1972). Ela recebe material proveniente dos pesquisadores quando ocorre a identificação de uma espécie nova. Após a publicação do trabalho com a descrição da espécie nova, as lâminas provenientes desse estudo devem ser depositadas no Smithsonian e ficam à disposição dos pesquisadores para estudos ou checagens taxonômicas. Tais análises podem ser feitas no local ou as lâminas podem ser enviadas sob demanda para o pesquisador qualificado que esteja interessado.

Finalmente, os vírus são macromoléculas autoreplicativas que dependem inteiramente da célula hospedeira invadida para sua multiplicação. Quimicamente são nucleoproteínas, tendo como genoma DNA ou RNA. São submicroscópicas com forma helicoidal ou icosaédrica e, eventualmente, nenhuma delas, sendo então referidas como de morfologia complexa. Podem ou não ser providas de uma membrana envoltória de origem celular. O genoma viral codifica um número limitado de genes, mas o suficiente para alterar o metabolismo celular e assegurar a cópia de um grande número de indivíduos iguais às que invadiu a célula. Erros na seqüência de nucleotídeos durante a replicação geram mutantes que podem se adaptar a novas condições, como a capacidade de infetar uma hospedeira diferente. Sua importância sócio-econômica é muito grande, pois o agronegócio representa uma parcela

considerável das atividades sócio-econômicas do País, assegurando a alimentação de sua população e a exportação dos excedentes. Gera direta e indiretamente empregos e contribui para a fixação do homem no campo. Citros, soja, cana-de-açúcar, fruteiras tropicais, café, milho, cereais de inverno, hortaliças, videira, fruteiras de clima temperado, forrageiras, feijão, girassol, amendoim, etc. fazem parte do elenco de culturas importantes e que são cultivadas em diferentes regiões.

Graças às atividades de pesquisas lideradas pela Embrapa além das instituições estatais e universidades a produtividade tem aumentado significativamente ao longo do tempo. Contudo, a produtividade tem sido constantemente ameaçada por vários fatores, dentre os quais os fitossanitários representam parcela importante. Dentre as doenças, chama atenção às de etiologia viral, pois ao contrário das causadas por organismos como fungos, bactérias e nematóides, não contam com métodos curativos após a instalação do patógeno, sendo as medidas de controle essencialmente preventivas. Existem poucos exemplos de viroses de planta altamente destrutivos. As mais citadas no País foram a tristeza dos Citros que destruiu cerca de 10 milhões de laranjeiras na década dos 1940 e o mosaico dourado do feijoeiro que dizimou feijoads no início da década dos 1970. Geralmente, entretanto, vírus de plantas causam prejuízos menores, mas constantes, e muitas vezes ignorados pelos produtores, pois as plantas infetadas raramente morrem, embora tenham redução na produção em quantidade e qualidade. Podem ser considerados atualmente de importância econômica vírus como: begomovírus diversos em tomateiro e feijoeiro, tospovírus em tomateiro e cucurbitáceas, mosaico em alface, enrolamento da folha e vírus Y em batata, necrose da haste em soja, carlavírus causando amarelão do melão, mosaico em mamoeiro, complexo de vírus em videira, leprose em citros, etc. Deve também ser salientado que certos vírus como os baculovírus são causadores de doenças de insetos. Tais vírus podem ser utilizados dessa maneira, no controle biológico de pragas da agricultura. Este é o caso do controle da lagarta da soja por baculovírus no Brasil, um programa de controle biológico de grande sucesso e reconhecido como o maior do planeta em área cultivada abrangida.

## CONSIDERAÇÕES SOBRE A TAXONOMIA MICROBIANA

### **Procariontes: Bactérias e Arquéias**

A taxonomia de procariontes é a ciência que lida com a classificação (= criação de novos taxa), identificação (= alocação de linhagens dentro de espécies conhecidas) e nomenclatura (Vandamme et al., 1996). Esta ciência produziu um sistema estável, predizível e altamente informativo que tem colaborado para o avanço de vários ramos da ciência, incluindo não somente a microbiologia, mas também a genômica, ciências médicas, ecologia de microrganismos, biotecnologia, evolução e epidemiologia (veja o texto opinativo da revista *Nature* (*Genomics and Taxonomy for all*, Vol. 417, número 6889, página 573, 2002). A taxonomia de procariontes, em geral, esteve em estado de fluxo por mais de 100 anos, pois sistematas davam grande valor a testes fenotípicos e características morfológicas nos antigos esquemas de classificação (veja, por exemplo, o *Manual Bergey's* ed. 1957), resultando na formação de grupos taxonômicos relativamente heterogêneos e muitas vezes artificiais. A proposta e subsequente aplicação massiva da taxonomia polifásica a partir de 1970, com o papel pivotal da técnica de hibridização de DNA-DNA (Colwell, 1970a), produziu grupos taxonômicos robustos que foram posteriormente posicionados no espaço filogenético com o auxílio de seqüências do DNAr 16S. Em 1987, Carl Woese publicou seu trabalho seminal sobre o uso de cronômetros filogenéticos, principalmente o RNAr 16S, o que mudou o rumo da taxonomia de procariontes (Woese, 1987). Hoje, a estrutura da taxonomia de bactérias é baseada na filogenia do DNAr 16S (Ludwig & Klenk, 2001). As aproximadamente 6500 espécies de procariontes formalmente descritos atualmente representam, no entanto, possivelmente 1-10 % de toda a diversidade procarionte porvável no meio ambiente, indicando uma necessidade premente de avanços nesta área .

### **Fungos**

Como já mencionado, o número estimado de espécies de fungos no planeta Terra é de 1,5 milhões, mas o número de espécies descritas até hoje é de aproximadamente 70 mil (Hawksworth & Rossman, 1997). É, portanto, evidente

que esses números refletem o grande potencial de exploração da biodiversidade fúngica conhecida e desconhecida. A grande dificuldade na identificação/classificação de fungos está associada ao fato de que a taxonomia deste grupo envolve classificações de *taxa* baseados em aspectos morfológicos, os quais são aplicados à chaves de classificação (Arx, 1974; Barnett & Hunter, 1972). Em muitos casos, os taxonomistas têm dificuldades para determinar quais são as características que realmente definem uma espécie ou gênero (Guarro et al. 1999). Além disso, fases sexuadas (teleomórficas) e assexuadas (anamórficas) de um mesmo genótipo são classificadas com espécies distintas, e apresentam capacidades distintas de compartilhar material genético, resultando em dificuldade na distinção dos indivíduos (Carlile & Watkinson., 1994). Neste aspecto, técnicas moleculares de classificação e identificação estão contribuindo de forma significativa para o entendimento das relações filogenéticas entre as diferentes espécies de fungos, bem como contribuir para uma melhor classificação das novas espécies que poderiam ser catalogadas em projetos de análise da biodiversidade. Além disso, a utilização de métodos moleculares, como o sequenciamento de genes conservados, para a identificação de microrganismos pode possibilitar ainda o desenvolvimento de métodos de diagnóstico, análises filogenéticas, epidemiologia e genética de populações.

### **Protozoários**

Infelizmente, não existem chaves de identificação de protozoários (ciliados, flagelados, heliozoários e amebas) de fácil utilização e atualizadas, sobretudo devido a ocorrência de muitas espécies não descritas, outras mal descritas e a falta de acordo entre os taxonomistas quanto à posição exata de diversos organismos desse grupo. Portanto, por exemplo, para se proceder à taxonomia de ciliados, é necessário, segundo Foissner, 1994, vários livros e algumas centenas de artigos científicos atualizados. Dentre a literatura mais comumente utilizada para a taxonomia dos protozoários podem ser incluídos: Bick (1972), Corliss (1979), Maeda (1985-1986), Dragesco & Dragesco-Kernéis (1986), Foissner & Berger (1996), Foissner, *et al.* (1999), Lee, *et al.* (1985), Page (1976) e Patterson & Larsen (1991) .

## Vírus

A classificação dos vírus foi muito controversa até o início da década dos 1950, pela simples razão de que pouco se conhecia sobre o ele em si, havendo mais informações sobre as enfermidades causadas. No caso dos vírus de planta, a tendência foi de agrupar conforme a hospedeira e os sintomas. A introdução do microscópio eletrônico de transmissão na comunidade científica por volta de 1950 e os avanços verificados nos métodos de análise bioquímica dos vírus passaram a oferecer dados precisos sobre a forma e composição química dos vírus. Assim, em 1960, criou-se o International Committee for Vírus Taxonomy (ICTV) que passou a cuidar da nomenclatura e classificação dos vírus, gerando periodicamente relatórios que atualizavam-nas. Os vírus passaram a ser classificados (a) pela natureza do seu genoma (DNA ou RNA), ser em fita simples ou dupla, ser fita única ou partida (bi-, tri- ou mais) e seu sentido (positivo ou negativo, em termos de tradução ou transcrição, no caso de genoma); (b) pela sua forma: helicoidal (em que o ácido nucléico em hélice é coberta por subunidades protéicas), icosaedral (em que as subunidades protéicas se organizam em uma cápsula icosaedral, em cujo interior se aloja o ácido nucléico) e complexa (quando não se enquadram na forma helicoidal ou na icosaedral); (c) ausência ou presença de membrana envoltória de origem celular, na qual glicoproteínas codificadas pelo vírus são inseridas.

Vírus que compartilham características comuns (tipo de ácido nucléico e homologia em sua seqüência, relações sorológicas próximas, forma similar e certas propriedades biológicas - tipo de hospedeiro, modo de transmissão, etc.) são agrupados em gêneros e, estes, por sua vez, em famílias. Há apenas uma ordem reconhecida, a que reúne vírus de RNA senso negativo como genoma, o *Mononegaviral*. Podem ser listados alguns exemplos de diferentes famílias e gêneros de vírus:

Família *Poxviridae* (que inclui vírus como o da varíola, boubá aviária, vacina, etc.):

- -DNA duplo, forma complexa, provido de membrana. Infeta vertebrados e invertebrados.

Família *Reoviridae* (inclui vírus como a diarreia infantil viral, nanismo do arroz, etc.)

- -Genoma de RNA duplo, segmentado, sem membrana. Infeta vertebrados, invertebrados e plantas.

Família *Caudovirales* (inclui bacteriófagos como T4 de *Escherichia coli*)-

- -Genoma DNA duplo contido em uma cápsula prismática dotada de uma “cauda” usada para o processo de infecção, sem membrana.

Família *Bunyaviridae* (inclui vírus como *Tospovirus* de planta e *Hantavirus* que causa doença em humanos)

- -Genoma de sRNA segmentado (senso negativo e ambisense), nucleocapsídeo helicoidal provido de membrana.

Por volta de 1970 foi reconhecido outro grupo de patógeno molecular de plantas, os viróides. São pequenos fragmentos (350-350 nucleotídeos) de ssRNA, que se anelam e produzem pareamento intramolecular. Replicam-se nas células permissíveis, aproveitando-se do mecanismo de duplicação do DNA (polimerase 2) e no processo causam doença.

## HISTÓRICO DA TAXONOMIA MICROBIANA

A classificação de organismos vivos foi um tema de grande interesse para os cientistas que pesquisavam a História Natural na Europa a partir do século XVI. Lineu propôs um sistema binomial de classificação que é uma das bases da classificação atual dos organismos. Em 1758, a décima edição do *Systema Naturae* de Lineu incluía 5.897 espécies de plantas e animais, os dois reinos nos quais ele dividia os organismos vivos. A *Taxonomia* se tornou uma profissão durante o século XIX, resultando em um rápido aumento no número de animais e plantas terrestres conhecidos.

O propósito primário de um sistema taxonômico utilitário é fornecer classificações que sejam úteis para finalidades científicas ou práticas diversas, especialmente a identificação, e também gerar bases de dados contendo informação relevante sobre organismos. Estas classificações devem ser estáveis, objetivas e preditivas.

### **Procariontes: Bactérias e Arquéias**

Os primeiros sistemas de classificação de procariontes eram baseados apenas em algumas propriedades fenotípicas que eram usadas para agrupar linhagens, a despeito de qualquer afinidade evolutiva verdadeira e por isso foram tidos como artificiais (veja, por exemplo, a quarta edição do Manual Bergey's, 1934). Estes sistemas refletiam as limitações tecnológicas daquele período. Na prática, estes sistemas, baseados em algumas propriedades morfológicas e comportamentais, levaram a sérios erros de classificação microbiana, nos mais variados grupos de bactérias (Boone & Castenholz, 2001). Tais métodos microbiológicos tradicionais baseados em características fenotípicas, como propriedades morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, governaram por décadas a taxonomia microbiana e forneceram informação descritiva para a estruturação de diversos taxa bacterianos.

Com o advento da taxonomia numérica (Sneath & Sokal, 1962) e o surgimento da computação, dados fenotípicos começaram a ser analisados por coeficientes numéricos que expressam similaridade entre linhagens com o



auxílio de um computador. Sem dúvidas, a taxonomia numérica veio proporcionar maior objetividade aos esquemas de classificação microbiana e a abordagem pressupunha a utilização de um grande número de testes bioquímicos (100 a 200) e uma amostragem grande e diversificada de linhagens, sendo os resultados expressos em porcentagens (Vandamme *et al.*, 1996). A aplicação de taxonomia numérica levou à avanços significativos na classificação dos microrganismos, mais especificamente bactérias. Bons exemplos de gêneros cuja taxonomia se beneficiou desta abordagem são *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* (Goodfellow, 2000).

Nos últimos 40 anos, com o desenvolvimento nas áreas de química, biologia molecular, estatística e informática, a taxonomia de microrganismos sofreu profundas alterações na direção de um sistema que refletisse as relações evolutivas entre os organismos aproximando a classificação microbiana o melhor possível da realidade biológica. O uso da homologia DNA-DNA associada a uma variedade de características ecológicas e fenotípicas na classificação de microrganismos foi denominada de taxonomia polifásica por Colwell (1970ab). Colwell propôs a integração da informação do nível molecular ao ecológico para obtenção de identificações e classificações mais precisas e confiáveis. Em princípio, toda informação genotípica, fenotípica e filogenética pode ser incorporada na taxonomia polifásica, mas a hibridização de DNA-DNA tem papel pivotal no delineamento de espécies. A abordagem polifásica da taxonomia tem sido praticada nos últimos 20 anos e pressupõe que as descrições polifásicas de espécie devem refletir relações filogenéticas, ser baseadas em hibridização DNA-DNA do genoma total e fornecer informação genotípica, fenotípica e quimiotaxonômica adicional que dê consistência à espécie definida em termos filogenéticos.

Woese & Fox (1977) publicaram o trabalho seminal sobre o uso de seqüências do rRNA 16S para a reconstrução da Árvore da Vida. Subsequentemente, se demonstrou que o rRNA 16S seria extremamente útil na afiliação filogenética de bactérias em espécies, gêneros e famílias (Woese, 1987). Seu uso foi prontamente incorporado à taxonomia polifásica (Stackebrandt & Goebel, 1987). O desenvolvimento rápido dos métodos de sequenciamento de DNA e o acúmulo da informação de seqüências em bases de dados públicas de livre

acesso (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), têm permitido o seqüenciamento comparativo de genes homólogos entre linhagens microbianas e é agora procedimento padrão em sistemática microbiana.

A aplicação de conceitos e práticas de taxonomia polifásica, a qual apresenta forte embasamento filogenético, teve um efeito profundo na classificação microbiana em todos os níveis da hierarquia taxonômica. Em particular, a crença na divisão dos seres vivos em 5 reinos proposta por Whittaker em 1969 foi desafiada pelo trabalho de Carl Woese e colaboradores, baseado no seqüenciamento comparativo de moléculas de rRNA e evidência genômica e bioquímica associada. Foi então proposto que a classificação dos seres vivos fosse substituída por um esquema baseado em 3 reinos ou Domínios: *Bacteria*, *Archaea* e *Eucarya*, sendo os dois primeiros exclusivamente microbianos e compostos por células procarióticas. O terceiro Domínio, *Eucarya*, engloba todos os organismos eucariotos, incluindo os microrganismos fungos e protozoários.

Com relação aos protozoários, segundo a taxonomia tradicional, a nomenclatura dos protozoários fagotróficos é regida pelo Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (INZ).

Outro grande impacto do uso de seqüências de rDNA como ferramenta na classificação microbiana se deu em estudos de diversidade de microrganismos a partir de amostras ambientais. A utilização de metodologias que independem do isolamento e cultivo de microrganismos levou a uma drástica mudança na perspectiva da diversidade microbiana existente no ambiente. Diversos grupos de microrganismos nunca antes cultivados puderam ser detectados no ambiente por meio das seqüências de rDNA 16S e, por meio da comparação com seqüências depositadas em bases de dados, observou-se que muitas delas pertenciam a organismos filogeneticamente não relacionados às divisões bacterianas já existentes (Pace, 1996; Hugenholtz *et al.*, 1998a). Este impacto na visão da diversidade microbiana pode ser exemplificado pelo número de divisões existentes dentro do Domínio Bactéria: em 1987 eram 12 divisões, todas elas descritas com base em organismos cultivados; já em 1998 o número de divisões publicado havia subido para 36 (Hugenholtz *et al.*, 1998b), sendo

13 delas divisões candidatas, ou seja, sem representante cultivado e descrição formal. Um levantamento mais recente, publicado em 2003, apontou como 53 o número de divisões dentro do Domínio Bacteria, sendo que aproximadamente 50% destas não possuem representantes cultivados (Rappé & Giovannoni, 2003). Hoje é um dos maiores desafios para taxonomistas o cultivo de representantes destas divisões.

## **Fungos**

A identificação clássica de fungos filamentosos leva em consideração, principalmente, as características morfológicas das estruturas reprodutivas (sexual e assexual). Dessa forma, para se identificar estas estruturas, os isolados devem ser cultivados a partir de colônias puras em meios de cultura apropriados e corada com técnicas apropriadas para manutenção das estruturas. Em muitos casos, pode não ocorrer a produção de estruturas reprodutivas, sendo necessário assim alterar as condições de cultivo. Para induzir a esporulação pode ser utilizado meio de cultura pobre (ágar-água), aumento da iluminação da cultura, irradiação com doses reduzidas de luz ultra violeta. Fatos estes possíveis somente para espécies/isolados cultiváveis. Em todos os casos deve se realizar uma preparação para observação microscópica das estruturas. As estruturas observadas devem ser comparadas com aquelas da literatura padrão, por meio de chaves de identificação (Arx, 1974; Barnett & Hunter, 1972)

Análises bioquímicas também podem ser utilizadas. Para fungos que não esporulam em meio sintético, técnicas de biologia molecular devem ser utilizadas. Estas técnicas se baseiam principalmente no seqüenciamento das regiões espaçadoras (ITS) do DNA ribossomal (rDNA) e comparação com uma base de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Além das seqüências de rDNA, outros mecanismos podem ser utilizados como será visto quando técnicas modernas de classificação serão mais amplamente discutidas. Tudo isso, torna o desenvolvimento de uma base de dados para seqüências de DNA, importante para a classificação de espécies fúngicas especialmente para o Brasil, país detentor de uma biodiversidade substancial, a qual poderia gerar uma quantidade muito grande de dados para a identificação de fungos.

## Protozoários

As técnicas utilizadas na taxonomia dos protozoários são baseadas em microscopia ótica e/ou eletrônica e são utilizados métodos diferentes para cada grupo. Isso dificulta a aplicação de técnicas taxonômicas adequadas em estudos ecológicos que queiram englobar todos os protozoários. Para todos os grupos, entretanto, aconselha-se, independentemente do método que será aplicado, a análise da amostra “*a fresco*” pois, com isso são obtidas informações impossíveis de se obter com material fixado e corado. Por exemplo, informações sobre o tipo de movimento, pseudópodo e presença de forma flutuante são vitais para a caracterização taxonômica de amebas nuas. Nessa etapa da análise do material vivo é aconselhada a obtenção de fotografias e desenhos bem feitos.

Para os ciliados, a taxonomia é complexa e depende, dentre outras coisas, da observação da morfologia externa; da posição dos vacúolos pulsáteis; da quantidade, posição e forma do macro e micronúcleo; do formato do citóstoma e, por fim, da posição exata dos cílios. Para essas observações, segundo Foissner (1991), são utilizadas as seguintes técnicas: coloração supravital com metil verde-pironina, impregnação a seco por nitrato de prata, impregnação úmida por nitrato de prata, impregnação por carbonato de prata, impregnação por protargol e microscopia eletrônica de escaneamento. Segundo esse autor, uma boa descrição taxonômica de ciliados necessita, além da observação do material vivo, a aplicação de mais de uma dessas técnicas acima citadas.

A taxonomia das tecamebas é baseada na análise da morfologia da carapaça e na forma e número de pseudópodos, normalmente podendo ser realizada por microscopia ótica, sem o auxílio de colorações especiais. Eventualmente, para determinadas espécies é necessária a utilização de microscopia eletrônica para a confirmação da composição e textura da carapaça. Por isso, e também pelo fato das tecamebas serem relativamente grandes, o processo de caracterização taxonômico delas é bem mais simples que dos ciliados. Essa facilidade é refletida na maior quantidade de pesquisadores trabalhando com esse grupo de protozoários e, conseqüentemente no número de publicações, inclusive no Brasil.

No caso das amebas nuas, como elas não têm forma definida, a caracterização morfológica é bastante dificultada. A taxonomia é baseada em análise de material vivo, anotando-se o tipo de movimento, pseudópode, presença de forma flutuante, etc.

Quanto aos heliozoários, existem poucas informações à respeito desse grupo e normalmente sua taxonomia é feita por microscopia eletrônica. Somente em raras espécies grandes a microscopia ótica é suficiente. São características importantes para a taxonomia desse grupo: o padrão das axonemas, presença e tipo de esqueleto, número de núcleos, tipo de organelas extrusivas, disposição dos microtúbulos e dos centros de organização de microtúbulos (Febvre-Chevalier, 1982).

Devido ao pequeno tamanho dos flagelados, a identificação segura dos mesmos necessita da utilização de microscopia eletrônica. Essa dificuldade é refletida na falta de pesquisadores trabalhando com esse grupo e a falta de informações e boas descrições na literatura. A maioria dos trabalhos e descrições, bem como das chaves de flagelados se refere a ambientes marinhos. No Brasil, por exemplo, não se tem notícia de pesquisadores trabalhando com taxonomia desse grupo.

Importantes facetas da taxonomia de protozoários estão relacionadas aos aspectos ecológicos especialmente em relação aos protozoários planctônicos e os do solo.

Segundo Foissner (1994), a maior parte das publicações ecológicas sobre protozoários planctônicos sofre pela falta de identificações confiáveis e de uma nomenclatura moderna. Isso ocorre pelo fato das técnicas usadas em taxonomia de protozoários serem laboriosas, caras e consumirem muito tempo para serem executadas, além de que, muitas vezes são incompatíveis com as técnicas usuais utilizadas em limnologia. Dentre esses problemas, destaca-se o fato de que essas técnicas tradicionais de taxonomia utilizam-se do crescimento de protozoários para a posterior aplicação das técnicas de coloração e impregnação, devido a perdas durante o processo. Além disso, tem que se considerar também que existem diversas técnicas de impregnação e cada uma delas é efetiva para determinados grupos de ciliados e menos eficiente para outros (Foissner, 1991).

Tais procedimentos alteram, portanto, a verdadeira composição e densidade de protozoários encontrada nos locais analisados naquele momento da coleta. Em estudos ecológicos, essas manipulações da amostra descaracterizariam o ambiente, uma vez que na maior parte das vezes o ecólogo está interessado em saber quem estava ativo naquele ambiente e em qual densidade, ou seja, obter uma “fotografia instantânea” da população naquele exato instante da coleta da amostra.

Recentemente, algumas técnicas foram propostas para contornar tais problemas como, por exemplo, a coloração quantitativa por protargol-QPS (Montagnes & Lynn, 1987 e 1993) ou a coloração quantitativa por protargol modificada por Skibe (1994), que reduziria o tempo de preparo das amostras de 24 para 4 horas. Tais técnicas utilizam algumas metodologias da taxonomia tradicional conjuntamente com outras que atenderiam aos interesses dos ecólogos: após a fixação das amostras, estas seriam filtradas em membranas específicas que seriam então montadas em lâminas e coradas com protargol para evidenciar as cinésias dos ciliados. Tais metodologias, segundo seus autores, não danificariam espécimens de outros grupos taxonômicos sendo as membranas então aproveitáveis também para contagens de outros grupos de protozoários bem como rotíferos, etc.

Entretanto, apesar dessas vantagens, tais técnicas são ainda pouco difundidas e utilizadas pelos limnólogos. Isso provavelmente é devido ao fato da técnica de impregnação por protargol ser relativamente cara devido aos reagentes utilizados na impregnação, ser efetiva para somente para determinados grupos de ciliados, ser demorada e complexa de executar, demandando bastante prática do pesquisador.

Com relação aos protozoários do solo, segundo Foissner (1992), para se estudar tecamebas de solo, basta analisar microscopicamente suspensões de solo mas, para os outros grupos de protozoários é mais difícil extraí-los da amostra. Para isso, foi desenvolvida uma técnica chamada: método da placa de Petri não alagada (“non-flooded Petri dish”) onde é adicionada água destilada a uma porção de solo em uma placa de Petri até a saturação. Após 2 dias ou mais a amostra é analisada. Embora seja uma técnica que tem sido

extensivamente utilizada para análise de solo, ela apresenta um problema que é a estimulação do crescimento de espécies que não necessariamente estavam ativas no solo no momento da coleta e sim encistadas. É, portanto, uma técnica importante para se avaliar a diversidade críptica do solo.

Recentemente, uma nova metodologia foi introduzida para o estudo de ciliados do solo que permite a análise quantitativa conjuntamente com a taxonômica: a coloração quantitativa por protargol edáfica (EQPS), que mescla a técnica do QPS com a técnica da placa de Petri não alagada (Acosta-Mercado & Lynn 2003)

### **Vírus**

São várias as famílias/gêneros de vírus de plantas descritos no Brasil. As pesquisas feitas mostram que muitos dos vírus descritos no exterior ocorrem no Brasil, provavelmente introduzidos junto com sementes ou material propagativo das culturas exóticas. Por outro lado vários vírus inéditos na literatura foram aqui encontrados e descritos. Assim, ocorrem no Brasil representantes de quase todos os gêneros de vírus de plantas:

#### **Vírus de DNA como genoma:**

- Família Geminiviridae: gêneros Begomovirus, Curtovirus
- Família Caulimoviridae: gêneros Caulimovirus, Cavemovirus, Badnavirus

#### **Vírus de RNA como genoma:**

- Família Bromoviridae: gêneros Bromovirus, Alfamovirus, Cucumovirus, Ilarvirus
- Família Bunyaviridae: gênero Tospovirus
- Família Closteroviridae: gêneros Closterovirus, Ampelovirus
- Família Comoviridae: gêneros Comovirus, Nepovirus
- Família Flexiviridae: gêneros Allexivirus, Carlavirus, Capillovirus, Foveavirus,

#### **Potexvirus, Trichovirus, Vitivirus**

Família Luteoviridae: Gêneros Lutovirus, Polerovirus

Família Potyviridae: Gênero Potyvirus

Família Reoviridae: Gênero Fijivirus

Família Rhabdoviridae: Gêneros Cytorhabdovirus, Nucleorhabdovirus

Família Sequiviridae: Gênero Sequivirus

Família Tombusviridae: Gêneros Carmovirus, Necrovirus

Família Tymoviridae: Gêneros Tymovirus, Marafivirus, Maculavirus

Gêneros: *Furovirus*, *Hordeivirus*, *Ophiovirus*, *Sobemovirus*, *Tenuivirus*, *Tobamovirus*,

**Tobravirus, Varicosavirus**

Viroides

Família Popsiviroidae: Gêneros Hostuviroid, Apscaviroid, Coleviroi

Aspectos históricos da taxonomia microbiana no Brasil e estado da arte

**Procariontes: Bactérias e Arquéias**

Existe obviamente uma diferença significativa entre o Brasil e o resto do mundo em termos de atividade científica em biodiversidade de procariontes. Por exemplo, nos últimos 15 anos, o Brasil colaborou com menos de dez publicações científicas por ano no *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM), que é o jornal oficial para caracterizações taxonômicas, descrições de novas taxa e reclassificações de procariontes. Para se ter uma idéia, países com maior tradição e investimentos no ramo da taxonomia, como é o caso dos EUA, Alemanha e Japão, produziram no mesmo período aproximadamente 80, 70, 55 trabalhos no IJSEM por ano, respectivamente. Realmente, existem pouquíssimos grupos de pesquisa dedicados à taxonomia de procariontes no Brasil, particularmente no que diz respeito a descrição de novas taxa.

Sob o ponto de vista metodológico, um dos principais problemas na taxonomia de procariontes em geral é a identificação de linhagens ao nível de espécie por meio de testes fenotípicos e de seqüências de rDNA 16S, pois as características fenotípicas e de seqüências das espécies existentes são muito



semelhantes. Neste caso, o critério decisivo para identificação de espécies ainda é a similaridade obtida em ensaios de hibridização de DNA entre genomas de dois organismos (Stackebrandt *et al.*, 2002). A hibridização de DNA-DNA é a parte mais laboriosa e demorada na taxonomia de procariontes e requer equipamentos especiais e pessoal treinado. Os resultados obtidos com esta técnica não são cumulativos em bases de dados, sendo que cada experimento novo deve incluir as linhagens de referência. Hoje esta técnica é realizada em poucos laboratórios de referência no mundo.

## **Fungos**

Estudos em fungos começaram ainda no século XIX quando viajantes coletores de fungos, na maioria estrangeiros, realizaram coletas em vários pontos do país, inclusive na Amazônia. Esses espécimes foram enviados a outros países para classificação. Como descrevem Fidalgo e Fidalgo (1957), ainda no século XIX e início do século XX destacam-se coletas, classificações preliminares e pequenas coleções de fungos realizadas por Juan Ignacio Puigarin em 1877, Heinrich Rehm de 1889 a 1912, Arsène Puttemans em Piracicaba na ESALQ, Fritz Noak no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Avena Saccá na ESALQ e um pouco mais tarde, em 1925, W.A. Mirril cujos fungos coletados estão na coleção do New York Botanical Garden. Além dos trabalhos pioneiros realizados com fungos de importância para a saúde, os quais não serão mencionados no presente documento, fungos causadores de doenças de plantas foram estudados no IAC por Ahmés Pinto Viegas e também no Instituto Biológico de São Paulo. O Instituto de Botânica de São Paulo teve destaque na taxonomia de fungos, especialmente basidiomicetos. De grande realce foi deve-se citar o trabalho iniciado por Augusto Chaves Batista em 1954 no Recife, Pernambuco, que no Instituto de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco por ele criado, conduziu importantes trabalhos sobre taxonomia de fungos organizando a coleção que até hoje é mantida no Departamento de Micologia da UFPE. Também coleções de fungos, especialmente leveduras de interesse industrial, foram organizadas no antigo Instituto Zimotécnico da ESALQ/USP por Jaime Rocha de Almeida. Atualmente coleções e herbários de fungos existem no Brasil destacando-se entre outras as da Universidade de Brasília relacionada a fungos isolados de

plantas do cerrado, da Universidade Federal de Pernambuco (talvez a mais completa no Brasil), do IAC (fitopatógenos), do Instituto de Botânica (Basidiomicetos), do CENARGEN, EMBRAPA em Brasília (fungos usados no controle biológico de insetos), da ESALQ no Departamento de Tecnologia Agroindustrial (principalmente leveduras) e Genética (especialmente fungos de interesse genético e fungos endofíticos), do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (fungos de interesse industrial). A maioria delas, entretanto, constituem coleções de pesquisa. Um esforço para reunir todos esses dados foi realizado nos anos 80 do século XX por Wanderley Perez Canhos e seu grupo organizando catálogos que reuniam todos os dados sobre coleções de culturas de microrganismos no Brasil incluindo os fungos (Canhos et al, 1989). Os trabalhos de classificação continuam a ser realizados com base nos aspectos morfológicos, especialmente na UFPE. Mais recentemente, especialmente após programas financiados primeiro pela FAPESP e depois por órgãos do governo federal visando estabelecimento de técnicas de seqüenciamento genômico de diferentes espécies microbianas, diversos laboratórios estão empregando técnicas moleculares na taxonomia de fungos.

### **Protozoários**

No Brasil, os trabalhos com protozoários se iniciaram nos primórdios do século 20 com os trabalhos de Provazek (1910), Cunha (1913; 1916; 1918) e Pinto (1925). Depois desse período produtivo, houve um período com poucas contribuições científicas destacando-se aí os trabalhos de Closs & Madeira (1962), Closs (1963), Closs & Madeira (1967), Mossmann (1966) e Green (1977). A partir da década de 80 o estudo de protozoários no Brasil ganhou um novo impulso e vem se acelerando nos últimos anos. Entretanto, considerando o crescimento e desenvolvimento do país nos últimos anos, atualmente existem proporcionalmente poucos pesquisadores trabalhando com ecologia e/ou taxonomia de protozoários no Brasil.

Em São Paulo, o Laboratório de Ecologia de Microrganismos Aquáticos (LEMA) da Universidade Federal de São Carlos (UFScar) tem realizado estudos ecológicos e taxonômicos sobre os diversos grupos de protozoários de água

doce desde o início da década de 80, sob a coordenação da prof. Dra Mirna Januária Godinho, hoje aposentada, tendo produzido diversas publicações, teses, dissertações e monografias e formado pessoal com experiência nessa linha de pesquisa. No Rio de Janeiro, estudos taxonômicos de ciliados, especialmente marinhos, são realizados pelo Dr. Inácio da Silva Neto da UFRJ. No Paraná, estudos taxonômicos de tecamebas com ênfase ecológica são realizados pelo Dr. Luiz Felipe Machado Velho do NUPELIA da Universidade Estadual de Maringá. No Mato Grosso, a Dra. Edna Lopes Haroim tem se dedicado ao estudo de vários grupos de protozoários, especialmente tecamebas.

### **Vírus**

Especialmente com relação a virologia vegetal no Brasil, dada extensão territorial e o clima ameno a quente (equatorial, tropical e subtropical) as condições ambientais favorecem a presença permanente de plantas e vetores (insetos, nematóides, ácaros) assegurando a existência de fontes de inóculo e a dispersão dos vírus, razão primordial da freqüente incidência de viroses em nossas culturas. O fato é agravado pela prática do plantio escalonado em uma dada cultura, como a do milho e as de várias hortaliças, quando o vírus passa continuamente das culturas mais velhas para as novas. Tais problemas têm atraído atenção dos fitopatologistas e há um contingente razoável, embora ainda insuficiente, de pesquisadores atuando em tempo integral na área de virologia vegetal no País. Estima-se em 80 profissionais, distribuídos em cerca de 40 centros de pesquisas e universidades. Pode-se agregar cerca de 20 pós-graduandos desenvolvendo dissertações e teses sobre vírus de plantas a este contingente. Houve o recente surgimento de empresas privadas de sementes, defensivos e biotecnologia que contam com virologistas vegetais em seus quadros. A maioria dos virologistas vegetais do País tem sólida formação acadêmica no país ou no exterior. Atua tanto diretamente na solução dos problemas através do equacionamento dos parâmetros epidemiológicos como pela geração de variedades resistentes. Estes trabalhos, contudo, acham-se fundamentos em estudos básicos sobre as propriedades biológicas, morfológicas, citopatológicas, bioquímicas, imunológicas e moleculares dos vírus. Houve uma rápida assimilação das modernas técnicas imunológicas e

moleculares para identificação e caracterização dos vírus e é hoje rotina o uso de técnicas como Elisa, Western blot, RT-PCR, hibridização, etc. Também há vários grupos seqüenciando genoma dos vírus e usando esta informação para gerar plantas transgênicas, expressando genes virais, com potencial para resistência a estes vírus (em feijoeiro, mamoeiro, citros, cana-de-açúcar, etc.). Há alguns grupos que lidam também com viróides. Existe, contudo, o problema da concentração da competência em algumas regiões (Sudeste e Centro-oste) e a absoluta falta na região Norte.

Graças a atividade destes pesquisadores conhece-se razoavelmente bem a situação das viroses em diferentes culturas e o manejo dos mesmos. Desde os primórdios da virologia vegetal no Brasil na década dos 1930 com o grupo do Instituto Biológico (A.A. Bitancourt e K.M. Silberschmidt) e do Instituto Agrônomo de Campinas (A.S. Costa) já foram geradas cerca de 6000 publicações (artigos, revisões, divulgação, resumos) muitas das quais em revistas de impacto (Nature, Virology, Proc.Natl.Acad.Sci., J.gen.Virology, Phytopathology, Plant Disease, Arch.virology, Intercvirology, etc.).

Princípios, estratégias e técnicas modernas para a taxonomia

### **Procariontes: Bactérias e Arquéias**

Atualmente a taxonomia polifásica é um consenso entre sistematas (Vandamme et al., 1996, Guarro et al., 1999). A taxonomia polifásica integra dados fenotípicos, quimiotaxômicos, moleculares e genômicos com o objetivo representar a biodiversidade nos seus diferentes níveis, isto é, de linhagem à supra-famílias (Figura 1). Neste contexto, diversas técnicas genômicas baseadas em padrões de banda ou códigos de barra (= fingerprints), por exemplo *AFLP*, *rep-PCR* e *ribotyping*, foram aplicadas na década passada (Dijkshoorn et al., 2001; Jaslavich et al., 2000; McCullough et al. 1998). Vários estudos independentes mostraram uma alta correlação entre a similaridade de padrões de *AFLP* e de hibridização de DNA-DNA para diversos grupos taxonômicos modelo, incluindo, por exemplo, *Aeromonas* (Huys et al., 1996). Por este motivo, se sugeriu que *AFLP* poderia ser uma alternativa para as hibridizações de DNA (Stackebrandt et al., 2002; Thompson et al., 2004). Apesar da técnica de *AFLP* ser rápida, altamente discriminatória e resultados

poderem ser acumulados em bases de dados locais, a comparação de padrões de *AFLP* gerados em diferentes laboratórios é muito difícil, comprometendo tremendamente a criação de bancos de dados públicos para a identificação de microrganismos.

A não-portabilidade de dados fenotípicos, por ex. perfis de ácidos graxos e de proteínas, e moleculares, por ex. *AFLP*, resulta na concentração do conhecimento taxonômico sobre diferentes grupos de microrganismos em poucos laboratórios internacionais de referência. Esta tendência leva a uma maior demora na inventarização da biodiversidade Global, uma vez que diferentes taxonomistas de diferentes partes do Globo usam diferentes ferramentas para estudarem os mesmos grupos taxonômicos. Além disto, o emprego destas técnicas requer a inclusão de linhagens de referência em cada novo estudo. Hoje, cada linhagem de referência chega a custar 300 dólares.

O uso de *Multi Locus Sequence Typing* (MLST; veja <http://www.mlst.net/>) tem ampliado a visão sobre a biodiversidade e evolução de bactérias (Cohan, 2002; Feil & Spratt, 2001; Feil *et al.*, 2003; Maiden *et al.*, 1998) e fungos (O'Donnell *et al.* 2004; Balajee *et al.* 2005). Esta técnica se originou da eletroforese de enzimas, amplamente usada por biólogos de populações (Caugant, 2001). A metodologia moderna consiste no seqüenciamento e análise de fragmentos de 5 a 7 genes, conservados (geralmente *housekeeping*), espaçados ao longo do genoma microbiano com pelo menos 100 Kb de distância ou do outro (Maiden *et al.*, 1998). A grande vantagem desta técnica é que a diferença entre linhagens é indexada diretamente nas seqüências de DNA. Como estes genes evoluem muito lentamente, se tornam ideais para estudos de longo termo de epidemiologia e identificação. Além disto, seqüências gênicas, diferentemente de padrões de bandas, como *AFLP*, *rpe-PCR*, podem ser acumuladas em bases de dados de domínio público e comparadas com facilidade.

Dados de MLST podem ser utilizados para calcular a contribuição de mutação e recombinação na evolução de complexos clonais dentro de uma dada espécie de bactérias (Feil *et al.*, 2003). Informações desta natureza podem auxiliar, por exemplo, na elaboração de vacinas mais eficientes para microrganismos patogênicos ou para tomada de medidas epidemiológicas. Este tipo de metodologia abre uma nova possibilidade para integrar o

conhecimento sobre a biodiversidade das diferentes regiões brasileiras. Neste sentido, a rede genoma nacional poderia servir como arcabouço para o estudo piloto de diferentes microrganismos de interesse ambiental e clínico.

É importante ressaltar que MLST tem sido empregado apenas na tipagem de alguns poucos patógenos humanos e pouco ainda é conhecido sobre o uso da metodologia de MLST para a diferenciação de espécies, gêneros e famílias no Domínio *Bacteria*. Ziegler (2003) examinou 49 genomas bacterianos de diferentes filos e encontrou alta correlação entre a similaridade dos aproximadamente 30 genes, por ex. *recN*, *thdF*, *rpoA*, *ligA*, *atpA* e *dnaX*, com as seqüências totais dos genomas. Ele concluiu que as seqüências destes genes poderiam ser usadas para a alocação de linhagens ambientais em espécies conhecidas.

Para bactérias, o paradigma atual da taxonomia reside no entendimento das relações evolutivas baseadas, quase que exclusivamente na filogenia de seqüências de rRNA 16S (Gupta & Griffiths, 2002). Hoje, existem pelo menos 20 grandes grupos taxonômicos dentro do Domínio *Bacteria*, os quais ainda não foram formalmente definidos, mas são referidos na literatura como “Divisões” (veja Bergey's website <http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline200210>). Divisões seriam categorias hierárquicas equivalentes aos filos da taxonomia de animais e plantas. *Proteobacteria* é o maior grupo, com mais de 1.500 espécies, divididas em cinco classes:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$ . Porém, existe uma necessidade premente de se refinar a filogenia de bactérias por meio da análise de outros genes.

Novas metodologias baseadas na genômica têm sido concebidas para o estudo da filogenia e evolução de procariontes, incluindo a análise de inserções/deleções (*indels*; Gupta & Griffiths, 2002), do conteúdo e ordem de genes, de seqüências concatenadas (Wolf *et al.*, 2002), super-árvores (Daubin *et al.*, 2001) e análises de distâncias evolucionárias entre genes ortólogos (Wolf *et al.*, 2002). Análises evolutivas em nível de espécie, que incluem a delimitação de genótipos ancestrais, complexos clonais e da taxa de recombinação entre linhagens, têm sido aprimoradas pelo uso dos algoritmos “*Burst*” e “*Splits tree decomposition*” (Feil & Spratt, 2001; Feil *et al.*, 2003). Aplicando estes novos

princípios, Cohan (2002) reflete que as espécies bacterianas atualmente delineadas são, na verdade, equivalentes a gêneros. Realmente, a definição atual de “espécie bacteriana” é pragmática. Atualmente, esta definição compreende grupos de isolados genomicamente coerentes, que compartilham elevado grau de similaridade em diversas características independentes. Apesar de intensa crítica (Lan & Reeves, 2000, 2001; Maynard Smith *et al.*, 2000), a hibridização de DNA-DNA ainda é o “*gold standard*” para o delineamento de espécies em Bacteriologia. Linhagens da mesma espécie apresentam, sob condições controladas de ensaios, pelo menos 70 % de hibridização entre seus genomas, conforme definido pelo Comitê Internacional de Sistemática Bacteriana (Wayne *et al.*, 1987; Stackebrandt *et al.*, 2002).

Recentemente, em uma nova reunião onde foram discutidos a definição e o conceito de espécies em procariontes (Gevers *et al.*, submetido), concluiu-se que a definição de espécie atualmente utilizada ainda é útil e operacional. Também se sugeriu que novas metodologias devam ser desenvolvidas com urgência para suplantar as limitações da hibridização DNA-DNA, rDNA 16S, características fenotípicas e fingerprints. *Multi Locus Sequence Analysis* (MLSA) é fortemente indicada como a nova alternativa. Diversos pesquisadores têm sugerido que a definição de espécie seja baseada em seqüências de genes (Gevers *et al.*, submetido; La Scola *et al.*, 2003), devido às características de baixo custo de ensaios, facilidade de construção de bases de dados de acesso público, incorporação de novos dados e recursos de análise computacional. Não há um consenso sobre o conceito de espécie em procariontes, mas diferentes modelos evolutivos baseados na seleção natural, de um lado, e na transferência horizontal de genes, do outro, têm sido propostos (Gevers *et al.*, submetido). Para se testar estes modelos, são necessários estudos futuros sobre evolução, filogenia, e genética de populações de procariontes com dados obtidos através de MLSA.

## **Fungos**

O objetivo da taxonomia moderna é entender as relações evolutivas entre as diferentes espécies, e por esse motivo quando duas espécies são incluídas em um mesmo clado, deve ser considerado que apresentam um ancestral comum. Dessa forma, a estratégia de classificação de indivíduos deve levar em

consideração características que de fato representam estas relações filogenéticas. Neste contexto, a taxonomia do Reino Fungi é extremamente complexa, tendo em vista a metodologia clássica atualmente utilizada para a classificação de espécies, que utiliza características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas para a classificação de um indivíduo em diferente espécie. Além disso, utilizando estruturas reprodutivas, tem sido classificadas espécies sexuais (teleomorfos) e assexuais (anamorfos), muitas vezes não representando as relações filogenéticas entre diferentes grupos.

Para resolver e melhorar a classificação de fungos, métodos moleculares têm sido largamente utilizado, para reclassificar grupos heterogêneos. O conteúdo de GC do DNA também têm sido utilizado para o estudo da taxonomia de fungos. Neste caso, embora estudos recentes mostram que uma diferença de 1% no conteúdo de GC pode ser considerado um indicativo de que dois isolados pertençam a espécies diferentes, têm sido aceito 2% como valor básico (Gue'ho et al. 1992). Entretanto, em grupos onde as relações filogenéticas ainda não foram resolvidas têm sido aceito até 8% de diferença (Boekhout 1991).

Da mesma forma que utilizada para a taxonomia de procariontes, a hibridização DNA-DNA também tem sido utilizada para a classificação de fungos. Neste caso, 80% de valor de hibridização pode indicar que dois isolados pertencem à mesma espécie, enquanto que valores menores que 20% indicam total falta de identidade (Vilgalys, 1988).

Técnicas de "fingerprinting" como RAPD e AFLP também podem ser utilizadas para a taxonomia de fungos. Neste caso, os dados devem ser tabulados e uma matriz de similaridade deve ser calculada para posterior construção de árvores filogenéticas. Neste caso, estas técnicas podem ser interessantes para a análise de clados que apresentam alta similaridade, sendo dessa forma úteis para a identificação ao nível de linhagens.

O RFLP pode ser utilizado da mesma forma que o RAPD e AFLP, entretanto esta técnica pode ser aplicada à seqüências específicas, permitindo uma melhor análise. O padrão de RFLP do DNA mitocondrial (mtDNA) ou somente parte (mtSSU rDNA) dele tem sido amplamente utilizado (Yamamoto et al.,



1995), permitindo uma distinção de subespécies. Segundo Gené et al. (1996) esta técnica pode ser aplicada para o entendimento das relações entre anamorfos e teleomorfos, visto que para certos grupos o número de espécies anamórficas não corresponde às espécies teleomórficas.

Uma variação do RFLP, o ARDRA, tem sido amplamente utilizada. Nesta técnica o rDNA deve ser amplificado e posteriormente digerido com enzimas de restrição, mostrando as relações evolutivas entre grupos com distância genética moderada, visto que uma variação do padrão de restrição do rDNA corresponde a uma variação na seqüência do gene. A limitação desta técnica pode estar relacionada à presença de diferentes seqüências de ITS em uma mesma espécie, dificultando posteriormente o entendimento dos resultados. O ARDRA permite que diferentes padrões de bandas possam ser acumulados em bases de dados de domínio público e comparados com facilidade.

A utilização da análise de polimorfismo de microssatélites para o estudo de taxonomia e diversidade de fungos tem crescido substancialmente, permitindo a caracterização de isolados clínicos e ambientais de diferentes espécies de fungos (Nascimento *et al.* 2004; Lasker & Ran, 2004). O desenvolvimento de novos marcadores de microssatélites para espécies ambientais e associadas à plantas poderia permitir a organização de um banco de dados com o(s) perfil (s) de cada espécie identificada, possibilitando a posterior identificação de isolados com base neste banco de dados.

A cariotipagem eletroforética (migração dos cromossomos em gel de agarose submetido a um campo elétrico de diferentes direções) pode também ser utilizada, embora a alta variabilidade intraespecífica pode resultar em dificuldades para a taxonomia fúngica.

A técnica da PCR têm sido a mais promissora, visto que associada ao seqüenciamento de regiões conservadas do genoma, e.g rRNA e introns de  $\beta$ -tubulina, actina, quitina-sintase, acetil-coenzima A sintase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, lignina peroxidase e orotidine 59-monofosfato descarboxilase. Neste contexto, o rDNA tem sido mais utilizado pelo fato de apresentar múltiplas cópias no genoma, não codificar proteínas, cópias em tandem podem ser tratadas como um gene único e está presente em todos os

organismos, compartilhando assim uma mesma origem evolutiva (Guarro et al., 1999). Além disso, o rDNA tem regiões altamente conservadas, que servem de pontos de referência para estudos de divergências evolutivas, alternadas com regiões variáveis. O rDNA é subdividido em pelo menos 3 subunidades (5,8S, 18S e 25S) que são transcritas com os espaçadores internos e externos (ITS e ETS), os quais são removidos posteriormente para formar os ribossomos. Além destas regiões transcritas, espaçadores intergênicos (NTS ou IGS) que separam as cópias em tandem nos cromossomos e que não são transcritas, também podem ser utilizadas.

O 18S rDNA (chamado do SSU - small-subunit) tem sido mais utilizado para o estudo taxonômico de fungos filamentosos, enquanto que as regiões variáveis D1 e D2 do 25S rDNA (LSU – large-subunit) tem sido mais usadas para taxonomia de leveduras. Entretanto, esta padronização deve ser utilizada com cautela, pois fungos leveduriformes podem ser observados tanto nos grupos *Ascomycotina* como *Basidiomycotina*.

Para uma correta identificação utilizando a seqüências de genes conservados, se faz necessário uma base de dados confiável para a comparação das seqüências. Atualmente o GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) tem sido utilizado, embora erros decorrentes de informações imprecisas podem ser observados. Neste aspecto, o desenvolvimento de uma base de dados para seqüências de DNA importantes para a classificação de espécies fúngicas seria de extrema importância para o desenvolvimento desta área no Brasil, visto que o país é detentor de uma biodiversidade substancial, a qual poderia gerar uma quantidade muito grande de dados para a identificação de fungos.

O uso de *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) tem também sido aplicado para o entendimento da biodiversidade e evolução de fungos (O'Donnell et al. 2004; Balajee et al. 2005). Esta metodologia, como já descrito para procariontes se baseia no seqüenciamento e análise de fragmentos de genes conservados (geralmente *housekeeping*), espaçados ao longo do genoma microbiano com pelo menos 100 Kb de distância ou do outro (Maiden *et al.*, 1998). A grande vantagem desta técnica é que a diferença entre linhagens é indexada diretamente nas seqüências de DNA. Como estes genes evoluem muito

lentamente, se tornam ideais para estudos de longo termo de epidemiologia e identificação.

### **Protozoários**

Também em protozoários as técnicas moleculares e modernas começaram a ocupar espaço na taxonomia. Segundo Caron (2004), nos últimos anos tem ocorrido um espantoso aumento no uso de técnicas moleculares e genéticas para a caracterização taxonômica de procariontes que, infelizmente, não foi acompanhado para o grupo dos protozoários. Entretanto, estes estudos estão sendo iniciados e, segundo esse mesmo autor, os estudos mais recentes sobre a diversidade de protistas foram feitos utilizando análises filogenéticas de genes de RNA ribossômico eucariótico amplificados por PCR e clonados de amostras naturais de água. Tais estudos revelaram seqüências únicas até então não catalogadas nas bases de dados públicas, indicando linhagens ainda não descritas. São utilizadas também técnicas para obter o DNA ribossômico da unidade 18S. Mas, técnicas mais simples para serem utilizadas com rotina em estudos ecológicos de diversidade de protistas incluem: DGGE, TGGE, T-RFLP, ARDRA, ALH, LH-PCR.

Embora seja indiscutível o avanço proporcionado pelos métodos moleculares para a avaliação da diversidade microbiana, segundo Savin *et al.* (2004), apesar das vantagens desses métodos, eles não tornam os métodos tradicionais de identificação obsoletos, pois ambos capturam uma parcela da comunidade.

Não se tem conhecimento, até o momento, de grupos de pesquisa no Brasil que estão usando essas técnicas para protozoários.

### **Vírus**

A taxonomia dos vírus baseada em características morfológicas obtidas por observação em microscopia eletrônica, sofreu grande impacto dos processos moleculares como auxiliares na identificação e caracterização dos mesmos. Um problema é, entretanto a manutenção de uma coleção de vírus vegetais. Embora, em principio, seja factível manter-se uma coleção de vírus de plantas, na prática nem sempre é viável. Manter os vírus em plantas, transferindo periodicamente por transmissão mecânica, insetos ou enxertia consome muito

tempo, mão-de-obra e espaço, além do risco de ocorrer mutações. E também possível manter material dessecado ou congelados (-20 C/-80 C ou nitrogênio líquido) e alguns grupos tem mantido os vírus que trabalham desta maneira, porém requer-se uma infra-estrutura apreciável para manter um grande numero de vírus e seus diferentes isolados; Contudo, para se manter um grande numero de vírus e seus diferentes isolados requer-se uma infra-estrutura apreciável e pessoal e assim, embora desejável, inexistente entre nós uma coleção que compreenda a maioria dos vírus descritos no País.

#### Impedimentos taxonômicos

A falta de uma política de financiamento direcionada para pesquisa em taxonomia e estabelecimento de Centros de Recursos Biológicos é sem dúvidas o maior impedimento taxonômico no âmbito do Brasil. Coleções Internacionais de renome, como por ex. a BCCM (Bélgica), CBS (Holanda), DSMZ (Alemanha) e JCM (Japão) são financiadas pelo governo. A ATCC (EUA) também tem apoio financeiro massivo do governo por meio de projetos de pesquisa. Por exemplo, A DSMZ, que acumula hoje o maior acervo de bactérias e arqueias de referência do mundo, conta com uma equipe de aprox. 90 pessoas, das quais aprox. 30 são pesquisadores renomados. Isto significa um investimento governamental de pelo menos 2 Milhões de Euros anualmente, apenas com pagamento de pessoal. No caso da BCCM que possui cerca de 50 funcionários, sendo que aprox. 15 são pesquisadores, este montante é de pelo menos 1 milhão de Euros.

O trabalho de pesquisa em taxonomia, particularmente a classificação de novos taxa, demanda uma quantia considerável de recursos, tanto em equipamentos e insumos, quanto em horas de trabalho. Para cada descrição de uma nova espécie de procarionte, se gasta em torno de 10 mil euros (Erko Stackebrandt, comunicação pessoal)<sup>1</sup>. Levando em consideração que apenas 1-10 % das espécies de procarionte e fungos já foram formalmente descritas, serão necessários investimentos na ordem de 585 milhões de euros para se

---

<sup>1</sup> Engloba insumos, mão-de-obra e instalações – de acordo com a realidade na Alemanha. No Brasil, poder-se-ia estimar um valor de até 3 mil Euros. A estimativa leva em conta análises fenotípicas e métodos moleculares modernos.

completar a catalogação de todas as espécies de microrganismos presentes no mundo. Além disto, existe uma necessidade premente de se desenvolverem técnicas inovadoras para o cultivo de microrganismos que não crescem em placa (Colwell & Grimes, 2000). Trabalhos pioneiros nesta área vêm sendo desenvolvidos por alguns poucos grupos norte americanos (Joseph et al., 2003; Rappe *et al.*, 2002; Stevenson et al., 2004) e por empresas como a DIVERSA (<http://www.diversa.com>).

Muitos pesquisadores já ressaltaram que fatores de impacto (FI) por ex. os indicados pelo Institute of Scientific information (ISI), não refletem a importância dos trabalhos em taxonomia, especialmente porque trabalhos de descrição de espécies são citados com mais frequência, muitos anos depois da publicação, o que diminui o seu impacto (Krell, 2002). O IJSEM figura na 12<sup>a</sup> posição entre os jornais de microbiologia, com um FI de 3,18, enquanto que o jornal *Systematic and Applied Microbiology* aparece na 25<sup>a</sup> posição (FI = 1,91). Por este motivo, taxonomistas têm muitas vezes dificuldade para obterem recursos para seus projetos de pesquisa, perdendo para outros ramos mais *na moda* da biologia. Há uma relação inversa entre a distribuição da biodiversidade ainda não estudada e taxonomistas. A maior porção da biodiversidade ainda não explorada se concentra principalmente em países do terceiro mundo e em desenvolvimento como o Brasil, cujo número de taxonomistas é muito reduzido. Este fato é um grande entrave para o desenvolvimento da sistemática e taxonomia de procariontes. É essencial que Coleções de Culturas Brasileiras tenham um forte elo de interação com a Universidade, uma vez que as mesmas devem desempenhar o papel de centros de referência de pesquisa em biodiversidade. Portanto, para que haja um avanço da taxonomia no Brasil, pesquisas voltadas à taxonomia, filogenia, evolução, identificação, e genética de populações devem ser estimuladas dentro das coleções de cultura e em colaboração com a Academia. O estabelecimento de um programa de pós-graduação inter-universidades em Sistemática Microbiana poderia estimular a formação de recursos humanos em taxonomia bem como aumentar a produção científica nesta área.

A proposta da taxonomia eletrônica vem causando muito debate por parte de diversos pesquisadores (Bisby *et al.*, 2002; Godfray, 2002; Smith, 2004), mas

sem dúvidas ela produzirá um sistema de catalogação de espécies mais rápido, eficiente, transparente, barato e acessível para toda a comunidade científica por meio da WWW. Dados de MLSA são facilmente disponibilizados em bases de dados públicas, necessitando apenas de trabalho de atualização, por meio da inclusão de seqüências de novas espécies, e a curadoria continuada de dados, com o intuito de evitar erros e/ou falta de informação sobre as linhagens. Obviamente, as bases de dados de MLSA ainda precisam ser produzidas para a maioria dos grupos taxonômicos conhecidos (Gevers *et al.*, submetido). Este trabalho representará um marco na taxonomia de procariontes e requererá investimentos massivos no seqüenciamento de DNA de linhagens de referência e o desenvolvimento de ferramentas computacionais, incluindo a criação de website ativos, que possibilitem a integração da informação e análises genômicas *in silico*. O desenvolvimento destas bases e ferramentas possibilitará que descrições taxonômicas sejam feitas com muito maior rapidez e objetividade, resultando em um rápido desenvolvimento da taxonomia e exploração da biodiversidade no âmbito do Brasil.

## TENDÊNCIAS E PERSPECTIVAS

Atualmente, diferentes grupos e países desenvolvem estratégias para identificar e catalogar a biodiversidade microbiana existente no planeta. Por exemplo, a organização americana sem fins lucrativos, *All species foundation*, quer gerar um inventário completo de todas as espécies vivas na Terra dentro dos próximos 25 anos (<http://www.all-species.org/>). Espera-se ter uma conservação ambiental mais efetiva e uma maior acessibilidade de dados com esta iniciativa. Neste contexto, várias iniciativas estão sendo tomadas para o desenvolvimento de websites dedicados a taxonomia e de descrições eletrônicas de novas espécies. *Species 2000* (<http://www.sp2000.org/>) deseja enumerar todas as espécies de organismos vivos no planeta em uma base de dados eletrônica que sirva de portal de entrada para estudos sobre biodiversidade. Até o presente já foram listadas 500 mil espécies (Peplow, 2005). Enquanto que o GBIF (<http://www.gbif.org/>) pretende globalizar todo o conhecimento atual sobre biodiversidade pela internet. No Brasil, o Sinbiota (<http://sinbiota.cria.org.br>) visa integrar informações geradas pelos pesquisadores vinculados ao Programa Biota/Fapesp e relacioná-las a uma base cartográfica digital de qualidade, provendo assim, mecanismos de difusão de informação sobre a biodiversidade paulista. Claramente, o momento atual é fascinante e desafiador para todos aqueles envolvidos com o estudo da biodiversidade de microrganismos. Agregando a experiência em bioinformática e genômica já existente no Brasil com os princípios e técnicas modernas para o estudo da biodiversidade, o nosso país tem a chance de se tornar uma referência internacional no ramo da sistemática microbiana em um horizonte de 10 anos. Finalmente, o fortalecimento desta disciplina propiciará um melhor aproveitamento e exploração da biodiversidade microbiana brasileira sem que haja a necessidade de que tal material biológico seja mandado para especialistas de fora do país.

## RECOMENDAÇÕES

1. Fortalecer os centros de pesquisa e as coleções de microrganismos engajados no estudo e preservação da biodiversidade microbiana, bem como estabelecer novos núcleos e coleções institucionais em locais estratégicos, por ex. aqueles que representem *hot spots* de biodiversidade, de maneira que possam servir à adequada preservação e estudo da biodiversidade microbiana brasileira, além da demanda industrial para uso em ensaios normatizados de rotina e exploração biotecnológica. Este incentivo deve se dar através da consolidação da infra-estrutura material e técnica dos acervos, destacando a necessidade de curadores e pessoal técnico especializado com vínculo efetivo. Neste sentido, é importante recomendar a criação e o fortalecimento de núcleos regionais, especialmente nas regiões Nordeste e Centro-Oeste, engajando-os em projetos nacionais ou regionais em parceria com instituições consolidadas.

Treinar pessoal em instituições nacionais e internacionais de renome e implantar infra-estrutura para realização de metodologias moleculares modernas de caracterização taxonômica microbiana a curto e médio prazo.

Integrar as coleções brasileiras a iniciativas internacionais, especialmente as que fomentem parcerias com instituições que possuam acervos importantes de linhagens tipo e referência, não representadas nas coleções nacionais.

2. Estimular a implementação de tecnologias bioinformáticas para acelerar a catalogação e difusão do conhecimento sobre a taxonomia de procariontes e facilitar seu acesso e uso.
3. Produzir e publicar revisões taxonômicas por meio da aplicação das técnicas modernas, especialmente MLSA, e disponibilização gratuita de esquemas de identificação na internet.
4. Implementar disciplinas sobre taxonomia, filogenia e evolução microbiana nos cursos de graduação em ciências da vida nas Universidades do Brasil.



Estruturar programas induzidos de treinamento e pesquisa em taxonomia microbiana no exterior em tópicos modernos e pertinentes ao estudo da biodiversidade, como por ex. a taxonomia genômica, microevolução, genética de populações, técnicas de cultivo de microrganismos não-cultivados, genômica e bioinformática.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta-Mercado D & Lynn DH (2003) The edaphic quantitative protargol stain: a simple protocol for assessing soil ciliate abundance and diversity. *Journal of Microbiological Methods* 53: 365-375
- Arx, J.A. von. 1974. The Genera of Fungi Sporulating in pure culture. 2 ed. Vaduz: J. Cramer, 351p.
- Balajee, S.A.; Gribskov, J.L.; Hanley, E.; Nickle, D.; Marr, K.A. 2005. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a New Sibling Species of *A. fumigatus*. *Eukaryotic Cell*. 4: 625-632.
- Barnett, H.L. & Hunter, B.B. 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Third Edition, Burgess Publishing Company, Minneapolis, 241p.
- Bick H (1972) Ciliated protozoa. An illustrated guide to the species as biological indicators in freshwater biology. World Health Organisation, Geneva, 198p.
- Bisby F.A., J. Shimura, M. Ruggiero, J. Edwards, & C. Haeuser. 2002. Taxonomy, at the click of a mouse. *Nature* 418:367.
- Boekhout, T. 1991. A revision of ballistoconidia-forming yeasts and fungi. *Study Mycology* 33:1–194.
- Canhos, V.P. & Manfio, G.P. 2001. Recursos Microbiológicos para Biotecnologia. URL: [http://www.mct.gov.br/Temas/biotec/Tendencias%20 Vanderlei%20Fina\\_.pdf](http://www.mct.gov.br/Temas/biotec/Tendencias%20Vanderlei%20Fina_.pdf).
- Canhos, W.P.; Souza, S. & Lange-Canhos, D. A. (1989) Catálogo Nacional de Linhagens. 3ª Edição, Base de Dados Tropical, Campinas,
- Carlile, M. J., & S. C. Watkinson. 1994. The fungi. Academic Press, Ltd., London, United Kingdom. Boone, D.R. & Castenholz, R.W. 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2<sup>nd</sup> ed., Volume One, Springer-Verlag, USA.
- Caron DA, Countway PD & Brown MW (2004) The growing contributions of molecular biology and immunology to protistan ecology: Molecular signatures as ecological tools *Journal of Eukaryotic Microbiology* 51(1): 38-48
- Caugant, D. A. 2001. From multi locus enzyme electrophoresis to multi locus sequence typing, p. 299-349. In L. Dijkshoorn, K. J. Towner and M. Struelens (ed.), *New approaches for the generation and analysis of microbial typing data*. Elsevier. Amsterdam.
- Cavalier-Smith T (1993) Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiological Reviews* 57: 953-994

Closs D & Madeira M (1967) Foraminíferos e tecamebas aglutinantes da Lagoa Tramandaí, no Rio Grande do Sul. *Iheringia* 35: 7-31

Closs D & Madeira M. (1962) Tecamebas e foraminíferos do Arroio Chuí (Santa Vitória do Palmar, Rio Grande do Sul, Brasil). *Iheringia* 19: 1-43

Closs D (1963) Foraminíferos e Tecamebas da Lagoa dos Patos (R.G.S.) *Esc. Geol. P. Alegre Bol* 11 : 1-13p

Coenye, T, D. Gevers, Y. V. de Peer, P. Vandamme, & J. Swings. 2005. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiol Rev.* 29:147-167.

Coenye, T., L. M. Schouls, J. R. W. Govan, K. Kersters, & P. Vandamme. 1999. Identification of *Burkholderia* species and genomovars from cystic fibrosis patients by AFLP fingerprinting. *Int J Syst Bacteriol* 49:1657-1666.

Cohan, F. M. 2002. What are bacterial species? *Annu Rev Microbiol* 56:457-487.

Colwell, R. R. & D. J. Grimes. 2000. Nonculturable microorganisms. American Society for Microbiology. Washington.

Colwell, R.R. 1970b. Polyphasic taxonomy of bacteria. *In Culture Collections of Microorganisms*, pp. 421-436. H. Iizuka & T. Hasegawa. (eds.) Tokyo, University of Tokyo Press.

Corliss JO (1979) *The ciliated protozoa: characterisation, classification and guide to the literature*. 2.ed. Pergamon, New York, 455p

Corliss JO (1979) The kingdom protista and its 45 phyla. *BioSystems* 17: 87-126

Corliss JO (1972) Current status of the international collection of ciliate type-specimens and guidelines for future contributors. *Trans American Microscopical Society* 91(2):221-235

Cunha AM (1913) Contribuição para o conhecimento da fauna de protozoários do Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 5 (1): 101-128p.

Cunha AM (1916) Contribuição para o conhecimento da fauna de protozoários do Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 8 (1): 66-73p.

Cunha AM (1918) Contribuição para o conhecimento da fauna de protozoários do Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 10 (1): 192-193p.

Daubin, V., M. Gouyand & G. Perriere. 2001. Bacterial molecular phylogeny using supertree approach. *Genome Informatics* 12:155-164

Dijkshoorn, L., K. J. Towner, & M. Struelens. 2001. New approaches for the generation and analysis of microbial typing data. First edition, Elsevier. Amsterdam.

Dragesco J, Dragesco-Kerneis A (1986) Ciliés libres de l'Afrique intertropicale: introduction a la connaissance et à l'étude des ciliés. Orstom, Paris, 559p.

Febvre-Chevalier C (1982) Revision of taxonomy of the heliozoan with attention to electron microscopical criteria *Annales de l'Institut Océanographique de Paris* 58 (S):173-178

Feil E.J. & B. G. Spratt. 2001. Recombination and the population structures of bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol* 55:561-590.

Feil, E. J., J. E. Cooper, H. Grundmann, A. D. Robinson, M. C. Enright, T. Berendt, S. J. Peacock, J. Maynard Smith, M. Murphy, B. G. Spratt, C. E. Moore, & N. P. J. Day. 2003. How clonal is *Staphylococcus aureus*? *J Bacteriol* 185: 3307-3316.

Fidalgo, O . & Fidalgo, M. E. P. K. (1957) Revisão de Fungi Saopaulensis. *Arquivos do Museu Nacional* 43: 157-188.

Foissner W (1992) Estimating the species richness of soil protozoa using the "non-flooded Petri dish method". *Protocols in protozoology* Eds: Lee JJ & Soldo AT

Foissner W, Berger H & Schaumburg J (1999) *Identification and ecology of limnetic plankton ciliates*. Informationsberichte des Bayer. Landesamtes für wasserwirtschaft, München, 3/99, 793p.

Foissner W, Berger H (1996) A user friendly guide to the ciliates (Protozoa, Ciliophora) commonly used by hydrobiologists as bioindicators in rivers, lakes, and waste waters, with notes on their ecology. *Freshwat Biol* 35: 375-482

Foissner W, Berger H, Kohmann F (1992) Taxonomische und ökologische revision der ciliaten des saprobiensystems- Band II: Peritrichia, Heterotrichida, Odontostomatida.. Informationsberichte des Bayer. Landesamtes für wasserwirtschaft, München, 5/92, 502p.

Foissner W, Blatterer H, Berger H, Kohmann F (1991) Taxonomische und ökologische revision der ciliaten des saprobiensystems- Band I: Cyrtophorida, Oligotrichida, Hypotrichia, Colpodea. Informationsberichte des Bayer. Landesamtes für wasserwirtschaft, München, 1/91, 478p.

Foissner W, Oleksiv I, Muller, H (1990) Morfologie und infraciliatur einiger ciliaten (Protozoa: Ciliophora) aus stagnierenden gewässern. *Arch Protistenk* 138: 191-206

Foissner W.(1991) Basic light and scanning electron microscopic method for taxonomic studies of ciliated protozoa *European Journal of Protistology* 27(4): 313-330

Foissner, W. (1994) Progress in taxonomy of planktonic freshwater ciliates. *Marine*

Gene', J., J. M. Guillamo'n, J. Guarro, J. Pujol, and K. Ulfig. 1996. Molecular characterization, relatedness and antifungal susceptibility of the basidiomycetous *Hormographiella* species and *Coprinus cinereus* from clinical and environmental sources. *Antonie Leeuwenhoek International Journal of Genetics* 70:49–57.

Gevers, D., F. M. Cohan, J. G. Lawrence, B. G. Spratt, T. Coenye, E. J. Feil, E. Stackebrandt, Y. Van de Peer, P. Vandamme, F. L. Thompson & J. Swings. Reevaluating prokaryotic species. Submitted to *Nature Microbiology Reviews* as an opinion paper.

Godfray HC. 2002. Challenges for taxonomy. *Nature* 417:17-19.

Godinho MJL & Selegim, MHR (1999) Diversidade de protozoários de vida livre: Protozoa. In *Biodiversidade do Estado de São Paulo: Síntese do conhecimento ao final do século XX 1. Microrganismos e Vírus*. Eds. V. P. Canhos & RF Vazoller, 82-91p.

Goodfellow, M. 2000. Microbial systematics: background and uses. In: Applied Microbial Systematics Priest, F.G. & Goodfellow, M. (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Green J (1975) Freshwater ecology in the Mato Grosso, central Brazil. IV: Associations with testate Rhizopoda. *Journal of Natural History* 9:545-56

Guarro, J., Gene', J e Stchigel, A. M. 1999. Developments in Fungal Taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 454–500

Gue'ho, E., G. S. de Hoog, and M. T. Smith. 1992. Typification of the genus *Trichosporon*. *Antonie Leeuwenhoek International Journal of Genetics* 61:285–288.

Gupta, R.S. & E. Griffiths. 2002. Critical issues in bacterial phylogeny. *Theor. Popul. Biol.* 61:423-434.

Hausmann, K. & Hülsmann, N. (1996) *Protozoology*, 2nd. Ed., Verlag, Stuttgart.

Hawksworth, D.L. (1996) Microbial collections as a tool in biodiversity and biosystematic research. In: Samson, R.A.; Stalpers, J.A.; van der Mei, D. *et al.* (eds.), *Culture Collections to Improve the Quality of Life*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn (The Netherlands). p. 26-35.

Hawksworth, D.L. e Rossman, A.Y. 1997. Where are all the undescribed fungi? *Phytopathol.* 87: 888–891.

Hugenholtz, P.; Goebel, B.M. & Pace, N.R. (1998a). Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology* 180: 4765-4774.

Hugenholtz, P.; Pitulle, K.L. & Pace, N.R. (1998b). Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *Journal of Bacteriology* 180: 366-376.

Huys, G., R. Coopman, P. Janssen, and K. Kersters. 1996. High-resolution genotypic analysis of the genus *Aeromonas* by AFLP fingerprinting. *Int J Syst Bacteriol* 46:572-580.

Jasalavich, C.A. Ostrofsky, A. & Jellison, J. 2000. Detection and identification of decay fungi in Spruce Wood by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Amplified Genes Encoding rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 4725–4734

Joseph, S. J., P. Hugenholtz, P. Sangwan, C. A. Osborne & P. H. Janssen. 2003. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Appl. Envir. Microbiol.* 69:7210-7215.

Kahl A (1930-35) *Urtiere oder Protozoa. Wimpertiere oder Ciliata (infusoria). Die Tierwelt Deutschlands*. G.Fisher, Jena, parts 18 (1930) 25(1932), 30 (1935). 886p.

Krell F. T. 2002. Why impact factors don't work for taxonomy. *Nature* 415:957.

La Scola, B., Z. Zeaiter, A. Khamisand, & D. Raoult. 2003. Gene-sequence-based criteria for species definition in bacteriology: the *Bartonella* paradigm. *Trends Microbiol* 11:318-321.

Lan, R. & P. R. Reeves. 2000. Intraspecies variation in bacterial genomes: the need for a species genome concept. *Trends Microbiol* 8:396-401.

Lan, R. & P. R. Reeves. 2001. When does a clone deserve a name? A perspective on bacterial species based on population genetics. *Trends Microbiol* 9:419-424.

Lasker, B. A., Ran, Y. 2004. Analysis of Polymorphic Microsatellite Markers for Typing *Penicillium marneffeii* Isolates. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1483-1490.

Lee JJ, Hutner SH, Bovee EC (1985) *An illustrated guide to the Protozoa*, Kansas, Society of Protozoologists, 629p.

Lewinsohn, T.M & Prado, P.I. 2002. Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento. Editora Contexto, São Paulo.

Ludwig, W. & H. Klenk. 2001. Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics, pp. 49-65. In *Bergey's Manual of Systematics Bacteriology*. Second Edition. Springer-Verlag. Berlin.

Maeda M. (1985-1986) *A illustrated guide to oligotrichine ciliates*. 68 e 67pp

Maiden, M. C., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman & B. G. Spratt. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3140-3145.

Maynard Smith, J. M., E. J. Feil & N. H. Smith. 2000. Population structure and evolutionary dynamics of pathogenic bacteria. *Bioessays* 22:1115-22.

McCullough, M.J.; Clemons, K.V.; McCusker, J.H. & Stevens, D.A. (1998). Intergenic Transcribed Spacer PCR Ribotyping for Differentiation of *Saccharomyces* Species and Interspecific Hybrids *J. Clin. Microbiol.* 36: 1035-1038.

Montagnes DJS & Linn DH (1987) A quantitative protargol stain (QPS) for ciliates: method description and test of its quantitative nature. *Marine Microbial Food Webs* 2: 83-93

Montagnes DJS & Linn DH (1993) A quantitative protargol stain (QPS) for ciliates and other protists. In: *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Kemp PF, Sherr E, Sherr B and Cole JJ (eds). Florida, Lewis Publishers, 229-240pp

Mossmann RL (1966) Levantamento sistemático e ecológico dos rizópodos do gênero *Diffugia* no Vale do Rio dos Sinos. *Ciência e Cultura*, 18 (2): 135p.

Nascimento, E., Martinez, R., Rodrigues L. A., de Souza B. L. A., Pomponio B. C., Goldman, M. H. S., Taylor, J. W., McEwen, J. G., Pasetto Nobrega, M., Nobrega, F. G., Goldman, G. H. 2004. Detection and Selection of Microsatellites in the Genome of *Paracoccidioides brasiliensis* as Molecular Markers for Clinical and Epidemiological Studies. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 5007-5014

Nobrega, F. G., Goldman, G. H. 2004. Detection and Selection of Microsatellites in the Genome of *Paracoccidioides brasiliensis* as Molecular Markers for Clinical and Epidemiological Studies. *J. Clin. Microbiol.* 42: 5007-5014

O'Donnell, K., Sutton, D. A., Rinaldi, M. G., Magnon, K. C., Cox, P. A., Revankar, S. G., Sanche, S., Geiser, D. M., Juba, J. H., van Burik, J.-A. H., Padhye, A., Anaissie, E. J., Francesconi, A., Walsh, T. J., Robinson, J. S. (2004). Genetic Diversity of Human Pathogenic Members of the *Fusarium oxysporum* Complex Inferred from Multilocus DNA Sequence Data and Amplified Fragment Length Polymorphism Analyses: Evidence for the Recent Dispersion of a Geographically Widespread Clonal Lineage and Nosocomial Origin. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 5109-5120

Pace, N.R. (1996). New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. *ASM News* 62:463-470.

Page FC (1976) *An illustrated key to freshwater and soil amoebae with notes on cultivation and ecology*. Freshwater Biological Association Scientific publication nº 34. Cumbria.UK, 155p.

Patterson DJ & Larsen J (1991) *The biology of free-living heterotrophic flagellates* Clarendon Press, Oxford

Patterson, DJ (1996) *Free-living freshwater protozoa – a colour guide*. John Wiley and Sons, New York, 223p.

Peplow, M. 2005. Species list reaches half-million mark. Nature online.

Pinto C (1925) Protozoários observados no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 18: 211-327

Priest, F. G., M. Barker, L. W. Baillie, E. C. Holmes, & M. C. Maiden. 2004. Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *J Bacteriol.* 186:7959-7970

Provazek, S. von (1910) Contribuição para o conhecimento da fauna de protozoários do Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2 (2): 149-158p.

Rappe, M. S. & Giovannoni, S. J. 2003. The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:369-394.

Rappe, M. S., S. A. Connon, K. L. Vergin, & S. J. Giovannoni. 2002. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* 418:630-633.

Savin MC, Martin JL, LeGresley M, Giewat M e Rooney-Varga J (2004) Plankton diversity in the Bay of Fundy as measured by morphological and molecular methods. *Microbial Ecology* 48: 51-65

Skibbe O (1994) An improved quantitative protargol stain for ciliates and other planktonic protists. *Archiv für Hydrobiologie* 130 (3): 339-347.

Smith, D. 2004. Linnean Society backs Godfray on use of web. 431:17.

Sneath, P.H. & R. R. Sokal. 1962. Numerical taxonomy. *Nature* 193:855-860.

Stackebrandt, E. & B. M. Goebel. 1987. A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44:846-849.

Stackebrandt, E., W. Frederiksen, G. M. Garrity, P. A. Grimont, P. Kampfer, M. C. Maiden, X. Nesme, R. Rossello-Mora, J. Swings, H. G. Truper, L. Vauterin, A. C. Ward & W. B. Whitman. 2002. Report of the *ad hoc* committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:1043-1047.

Stevenson, B. S., S. A. Eichorst, J. T. Wertz, T. M. Schmidt & J. A. Breznak. 2004. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Appl. Envir. Microbiol.* 70: 4748-4755.

*Suctorina*. Informationsberichte des Bayer. Landesamtes für wasserwirtschaft, München, 1/95, 548p.

Thompson, F.L., T. Iida, & J. Swings. 2004. Biodiversity of vibrios. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:403-431.



Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, P. de Vos, K. Kersters & J. Swings. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* 60:407-438.

Vickerman K (1992) The diversity and ecological significance of Protozoa. *Biodiversity and Conservation* 1: 334-341

Vilgalys, R. 1988. Genetic relatedness among anastomosis groups in *Rhizoctonia* as measured by DNA/DNA hybridization. *Phytopathology* 78:698–702.

Wayne, L. G.; Brenner, D. J.; Colwell, R. R.; Grimont, P. A. D.; Kandler, O.; Krichevsky, M. I.; Moore, L. H.; Moore, W. E. C.; Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P. & Trüper, H. G. (1987). Report of the *ad hoc* committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 463-464.

Woese C. R., G. E. Fox. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5088-5090.

Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51:221-271.

Wolf, Y.I., Rogozin, I.B., Grishin, N.V. & Koonin, E.V. (2002). Genome trees and the tree of life. *Trends Genet* 18, 472-479.

Yamamoto, H., A. Naruse, T. Ohsaki, and J. Sekiguchi. 1995. Nucleotide sequence and characterization of the large mitochondrial rRNA gene of *Penicillium urticae*, and its comparison with those of other filamentous fungi. *Journal of Biochemistry* 117: 888–896.

Ziegler, D. R. 2003. Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:1893-1900.

Figura 1. Discriminação de diversas técnicas empregadas na taxonomia polifásica (adaptada de Vandamme et al, 1996)

