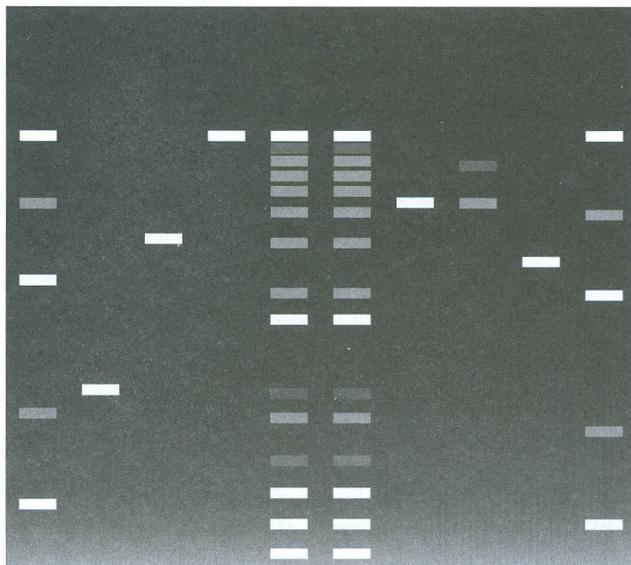


5

Caracterização de Recursos Genéticos



Samuel Rezende Paiva
Flavia França Teixeira
Semíramis Rabelo Ramalho Ramos
Cristina de Fátima Machado
Ana Cristina Mazzocato
Osmar Alves Lameira
Daniela Lopes Leite
Ana Cecília Ribeiro de Castro
Sueli Corrêa Marques de Mello
João Batista Tavares da Silva
Vânia Cristina Rennó Azevedo

175

O que é o processo de caracterização de um recurso genético?

É o conjunto de atividades que usa ferramentas para aumentar o conhecimento sobre animais, plantas e microrganismos. A caracterização gera informações básicas (p. ex. taxonomia, morfologia, ecologia) ou aplicadas (p. ex. dados produtivos, nutricionais, inserção em programas de melhoramento, etc.).

176

A caracterização pode ser feita após a incorporação do material em coleção ex situ?

Sim. Dependendo do tipo de germoplasma ou do método de conservação, a caracterização pode ser feita antes ou durante a conservação. Por exemplo, espécies perenes geralmente são conservadas em campo (banco ativo de germoplasma), porém caracterizadas quando adultas. No entanto, quando possível, o material deve ser caracterizado antes da conservação.

177

Por que o conhecimento da taxonomia e sistemática é fundamental para o processo de caracterização de recursos genéticos?

Porque fornece conhecimentos básicos para a identificação das espécies, auxilia na qualificação, triagem e seleção dos recursos genéticos.

178

Qual é a diferença entre taxonomia e sistemática?

A taxonomia é uma ciência que utiliza como critério de classificação propriedades dos organismos tais como a morfologia. Atualmente o critério básico aceito para a taxonomia é aquele que reflete a filogenia dos seres vivos e compara os caracteres de

qualquer natureza, sejam eles morfológicos, anatômicos, citogenéticos e moleculares. Dessa forma, a taxonomia é uma ferramenta primordial para a caracterização de germoplasma. As coleções de referência desempenham um papel importante na definição taxonômica.

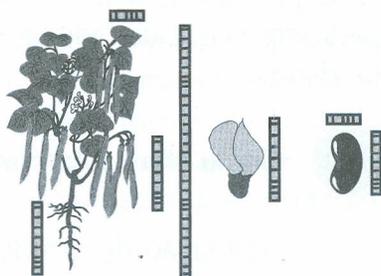
A sistemática é a ciência da diversidade. Inclui estudos filogenéticos, taxonômicos, ecológicos e informações paleontológicas. Ela permite tanto que se tenha uma visão global da diversidade de materiais conservados bem como sua inter-relação. Ela tem ainda um caráter preditivo, possibilitando uma seleção mais criteriosa do germoplasma a ser caracterizado e das metodologias a serem usadas e aperfeiçoa a análise dos resultados.

179 Qual é a utilidade dos dados de caracterização?

O objetivo principal dos dados de caracterização é agregar valor aos recursos genéticos conservados *in situ* e *ex situ*, de forma que se aumente sua utilização. As informações geradas podem ser aplicadas na identificação de novos materiais para enriquecer bancos de germoplasma e programas de melhoramento genético; na definição de germoplasma para intercâmbio ou repatriamento; na identificação de material duplicado; na estimativa da diversidade genética das coleções e na identificação de genes de interesse econômico.

180 Em recursos genéticos, o que é um descritor?

Característica mensurável ou subjetiva que qualifica o recurso genético. Em outras palavras, é a característica morfológica, anatômica, fisiológica, bioquímica ou molecular utilizada na identificação de um recurso genético e/ou seu germoplasma associado.



181

Os descritores são comumente utilizados com que finalidade na conservação?

Na caracterização dos recursos genéticos visando a sua identificação e valoração de forma a aumentar e/ou manter a diversidade genética, bem como seu uso por parte da sociedade.

182

O que é e qual a importância das listas de descritores?

A lista de descritores é um documento, elaborado por especialistas, contendo os descritores agrupados, em geral, em cinco níveis: passaporte, caracterização, avaliação preliminar, avaliação aprofundada e manejo. A lista é importante por servir como um guia para iniciar a caracterização e avaliação das amostras conservadas.

183

Quem define e registra descritores no processo de caracterização de germoplasma?

As características e os atributos de cada espécie/variedade de um recurso genético são definidos por especialistas das culturas e/ou curadores dos bancos ativos de germoplasma (BAG) e núcleos de conservação (NC). Por exemplo, no caso de plantas, a Bioersivity International (instituição internacional que trabalha com recursos genéticos vegetais) desenvolveu uma ampla lista de descritores para culturas, e conjuntos de descritores mínimos foram estabelecidos para a utilização em várias delas. O registro de dados deve ser realizado por funcionários treinados, usando instrumentos de medição padronizados, calibrados e, posteriormente, inseridos em uma base de dados.

184

Como aferir a importância de um descritor?

A validação de um descritor para caracterizar ou avaliar um acesso é conferida quando, por meio da sua aplicação, o curador

consegue diferenciar e quantificar a variabilidade presente na coleção de germoplasma. A validação é normalmente realizada por meio de análise estatística, uni ou multivariada, em que a importância desse descritor é quantitativamente estimada.

185

Como iniciar a caracterização de um acesso quando não existir lista oficial de descritores publicada para a espécie?

As listas oficiais para muitas espécies encontram-se disponíveis¹⁰ e devem ser consultadas antes de iniciar o processo de caracterização morfológica. No caso de não existir uma lista oficial para a espécie, recomenda-se, primeiramente, buscar a existência da lista publicada para o gênero. Caso exista, descritores dessa lista podem ser adaptados e servir inicialmente como guia. O curador também pode consultar a lista dos descritores recomendada pela União Internacional para a Proteção das Obtenções Vegetais (Upov). Contudo, caso também não exista nessas duas fontes, o curador e sua equipe podem, com base na experiência com a espécie, propor descritores que, após ampla e conjunta discussão, sejam validados internacionalmente. Recentemente, o Brasil fez a validação de descritores com o butiá (*Butia capitata*) e a mangaba (*Hancornia speciosa*).

186

Quais são as diferenças entre descritores qualitativos e quantitativos?

O descritor será qualitativo quando resultar de uma classificação por tipos ou atributos, como cor da flor, formato do fruto ou do grão, presença de pelos ou espinhos. O descritor será quantitativo quando seus valores forem expressos em números. As variáveis quantitativas podem ser divididas em quantitativas discretas e quantitativas contínuas. As variáveis quantitativas discretas só poderão

¹⁰Disponível em: <<https://www.biodiversityinternational.org/e-library/publications/categories/descriptors/>>.

assumir valores pertencentes a um conjunto, como números de frutos, folhas, tetas, chifres e, ainda, escalas de notas e de classificações numéricas que sejam atribuídas de acordo com uma gradação. A variável quantitativa contínua será aquela que poderá assumir qualquer valor em um intervalo de variação, tais como altura de planta, produção de matéria seca, peso ao nascer, produção de leite, etc. Em geral, os descritores qualitativos são menos influenciados pelas variações ambientais do que os descritores quantitativos.

187 Qual é a diferença entre caracterização e avaliação?

Na caracterização, os acessos ou indivíduos são descritos a partir de características, principalmente qualitativas e com baixa influência do ambiente, ou seja, relativamente estáveis entre diferentes ambientes e que sejam facilmente visíveis ou mensuráveis. Na avaliação, os acessos ou indivíduos são descritos a partir de características principalmente quantitativas, influenciadas pelo ambiente de cultivo ou criação.

188 É necessário ter uma coleção de trabalho para se fazer a caracterização de um material?

Não necessariamente. Com a coleção de trabalho pode ser realizada a caracterização, desde que se tenha um número mínimo de indivíduos para garantir as repetições. O mesmo procedimento também pode ser realizado com o material de um banco ativo de germoplasma ou núcleo de conservação.

189 Um acesso pode ter sido caracterizado mais de uma vez e os resultados serem diferentes?

Sim, é possível. Algumas características podem variar de acordo com as condições ambientais. Nesses casos, o fenótipo

(característica mensurada) poderá ser diferente de um ambiente para outro.

190 O que é herdabilidade?

O fenótipo de um indivíduo é fruto do seu potencial genético, do ambiente em que é cultivado e da interação entre esses dois fatores. A proporção da variação fenotípica explicada por fatores genéticos, herdáveis entre as gerações, é denominada herdabilidade. Algumas características têm a sua expressão fenotípica sempre constante independentemente da variação ambiental. Essas características são conhecidas como características de alta herdabilidade. Já outras características têm a sua expressão fenotípica muito variável de acordo com o ambiente em que são cultivadas, e são conhecidas como caracteres de baixa herdabilidade.

191 Os dados de caracterização fazem parte dos dados de passaporte?

Dados de passaporte e dados de caracterização são conjunto de dados distintos relacionados aos acessos de um banco de germoplasma. Esses dois conjuntos de dados têm entre si o ponto em comum de agregar informação aos recursos genéticos, entretanto o tipo de informação é distinto.

Os dados de passaporte guardam informações sobre a origem dos acessos, tais como: identificação de gênero e/ou espécie; denominações; códigos; data de entrada do acesso no banco de germoplasma; forma de obtenção; local de obtenção e nome do coletor; entre outras a critério do curador ou do coletor ou ainda de acordo com particularidades de cada espécie.

Já os dados de caracterização estão relacionados à expressão fenotípica dos acessos e seguem os descritores da espécie em questão que, em geral, são caracteres morfológicos, tais como cor e tipo de grão, arquitetura de plantas, formato da folha, cor da flor e

até mesmo alguns caracteres quantitativos, como altura de planta e número de dias para florescimento (precocidade).

192

Que tipos de caracterização podem ser feitas em animais, plantas e microrganismos?

Os principais tipos de caracterização são morfológica, agrônômica, zootécnica, fisiológica, molecular e genética. Nas duas últimas, incluem-se as conhecidas ômicas: genômica, proteômica, metabolômica. Para microrganismos, só não se aplica a caracterização agrônômica e caracterização zootécnica. Na caracterização morfológica, é possível, por exemplo, fazer medidas morfométricas e merísticas (contagens), bem como medidas relacionadas a aspectos produtivos (agrônômicos e zootécnicos). Na caracterização fisiológica, pode-se avaliar período de floração e frutificação, tempo de germinação das sementes, tempo de vida das folhas e das plantas, taxa de crescimento, época do cio, produção leiteira, intervalo entre partos, entre outras. A caracterização molecular tem como base o uso das principais macromoléculas dos organismos multicelulares: proteínas e ácidos nucleicos (DNA e RNA).

193

Qual tipo de caracterização é mais acessível e prioritário?

A caracterização morfológica é o tipo com melhor custo/benefício para ser realizado no maior grupo de espécies e, de forma inicial, a prioritária para ser conduzida nos bancos ativos de germoplasma e núcleos de conservação. Nos casos de coleções muito grandes e com disponibilidade de recursos financeiros, a genotipagem (caracterização pela análise do ácido desoxirribonucleico – DNA) pode ser a forma mais viável para, primeiramente, se estimar a diversidade genética da coleção, identificar os acessos mais diferentes e, assim, selecionar uma amostragem, o mais diversa possível, para ser caracterizada morfológicamente.

194

Qual é a diferença entre caracterização morfológica e agrônômica?

Na caracterização morfológica, são medidos e avaliados os caracteres morfológicos do material, como largura e comprimento da folha, comprimento do entrenó superior, altura natural, comprimento da inflorescência, volume e número de sementes (caracteres mensuráveis), forma e coloração da folha, intensidade de pilosidade da folha, hábito de crescimento, tipo de cálice (caracteres visuais), dentre muitos outros.

Na caracterização agrônômica, são medidos e avaliados os caracteres ligados a aspectos produtivos do material, resistência a pragas e doenças, tolerância a estresses, produtividade e outros.

195

Como caracterizar recursos genéticos a partir de DNA?

O DNA, molécula central no processo biológico da transmissão das características hereditárias, está presente em todas as células de plantas, animais e microrganismos. Em razão de conter todo esse nível de informação, o DNA é hoje a molécula ideal para conhecer melhor os organismos, em razão do grande número de variáveis que podem ser analisadas ao mesmo tempo. Apenas como exemplo, na espécie humana, estima-se que haja, em média, de 3 a 4 milhões de marcas diferentes no DNA.

196

Quais são as vantagens e desvantagens da caracterização morfológica?

A caracterização morfológica é a ferramenta primária para identificação das espécies, relativamente simples de ser realizada, rápida e, em geral, de baixo custo. Além disso, permite a identificação dos modos de reprodução predominantes nos acessos. Entretanto, a natureza quantitativa de grande parte dos caracteres e sua baixa herdabilidade faz com que as identificações não sejam

tão precisas. Ademais, muitas das características só podem ser mensuradas em indivíduos adultos, o que requer tempo e espaço físico para as avaliações.

197

Quais são as vantagens e desvantagens da caracterização agronômica?

A caracterização agronômica possibilita o conhecimento produtivo do germoplasma disponível, a identificação dos acessos duplicados, o estabelecimento de coleções nucleares, bem como da ocorrência ou não de variabilidade entre indivíduos. Como desvantagem, a caracterização agronômica demanda experimentos com repetição, gestão homogênea de parcela experimental, exige maior número possível de ambientes de avaliação e de população representativa.

198

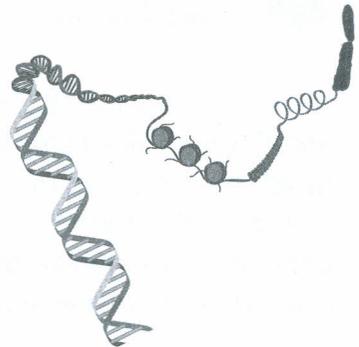
Quais são as vantagens e desvantagens da caracterização molecular por isoenzimas?

A caracterização molecular por enzimas apresenta herança mendeliana simples e possui baixo custo. Porém, cobre uma pequena porção do genoma, é de difícil genotipagem, apresenta baixo polimorfismo, é dependente do estágio de desenvolvimento do organismo e apresenta alguma influência do ambiente.

199

Quais são as vantagens e desvantagens da caracterização citogenética?

A caracterização citogenética descreve a organização genômica, utilizando como base a contagem do número cromossômico, a observação da morfologia de cromossomos, o estabelecimento de padrões cariotípicos, e a análise do comportamento meiótico de híbridos intra e



interespecíficos. Também contribui nos estudos de evolução, no auxílio à caracterização molecular, pela localização de sequências específicas de DNA, pela hibridação *in situ*. Como desvantagem, apresenta relativo alto custo, pois requer infraestrutura laboratorial e equipe técnica especializada. A eficiência da técnica depende da biologia da espécie sob estudo e não é viável para estudos populacionais.

200

Quais são as vantagens e desvantagens da caracterização molecular?

A caracterização molecular, em geral via marcadores no DNA, permite uma ampla cobertura do genoma das espécies, é de fácil detecção e possibilita acessar diretamente o genótipo de um indivíduo, evitando, assim, a influência do ambiente e a expressão do fenótipo. Como desvantagem, o custo de genotipagem ainda é relativamente alto dependendo da espécie e da cobertura do genoma a ser avaliado. Assim como na caracterização citogenética, requer infraestrutura laboratorial e equipe técnica capacitada.

201

O que é necessário para se fazer a caracterização morfológica e agrônômica/zootécnica de um recurso genético?

A sequência de atividades necessária para esse tipo de caracterização é: delineamento experimental, disponibilidade de acessos ou indivíduos devidamente identificados, definição dos descritores a serem aplicados, execução do experimento, coleta dos dados, análise estatística dos dados e interpretação dos resultados.

202

Qual é a principal aplicação da caracterização morfológica e agrônômica/zootécnica de um recurso genético?

Agregar valor a um banco de germoplasma ou núcleo de conservação com informações acerca do desempenho de seus acessos/indivíduos. Essa caracterização possibilita a formação de

uma importante base de dados que pode subsidiar programas de melhoramento genético.

203 Qual é a importância da amostragem na caracterização?

A amostragem é fundamental para uma caracterização eficiente. Caso a amostragem seja inadequada, os resultados obtidos poderão ser muito diferentes da realidade da população ou coleção estudada, o que poderá impactar diretamente nas decisões a serem tomadas com base no resultado obtido.

204 Como é feita a avaliação de acessos em um banco de germoplasma vegetal?

A avaliação é o registro daquelas características cuja expressão é frequentemente influenciada por fatores ambientais, e muitas dessas características resultam de fortes interações entre genótipos por ambiente e, portanto, são específicas do local. Envolve a coleta metódica de dados sobre características agronômicas e de qualidade por meio de ensaios experimentais adequadamente planejados. É recomendado que os ensaios sejam conduzidos em, pelo menos, três locais ambientalmente diversos e em três ciclos vegetativos, e os dados comparados estatisticamente ao longo dos anos. Em plantas, os dados de avaliação incluem frequentemente resistência a pragas, doenças e avaliações qualitativas e características ambientais. Esses conjuntos de dados são todos altamente desejados pelos usuários para incorporar características em programas de melhoramento e ampliar a utilização de coleções. O germoplasma pode ser sistematicamente avaliado usando uma abordagem de rede, em nível internacional, nacional ou regional.

205 Qual é a importância da caracterização dos recursos genéticos vegetais na avaliação da diversidade genética?

Os recursos genéticos vegetais são a matéria-prima utilizada no melhoramento das culturas, e a sua conservação e utilização

são fundamentais para a segurança alimentar e nutricional global. É essencial que o germoplasma que está sendo conservado seja devidamente caracterizado para maximizar seu uso pelos melhoristas de plantas.

206

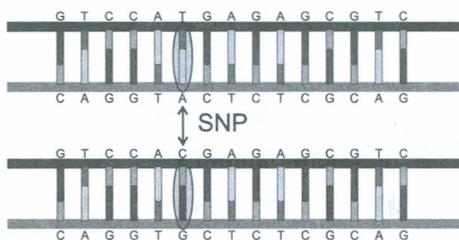
O que é necessário para o uso do germoplasma vegetal no melhoramento genético?

A identificação taxonômica de cada espécie; registro do acesso; avaliação e caracterização. Nesse contexto, as atividades de pré-melhoramento são fundamentais para conectar os programas de conservação e melhoramento, pois essas ações permitem qualificar o material conservado e diminuir o tempo de seleção por parte dos melhoristas.

207

Quais são os principais marcadores moleculares utilizados na caracterização de germoplasma?

Os principais marcadores moleculares usados na caracterização e avaliação de germoplasma são os marcadores codominantes como microssatélites (SSR) e polimorfismos de base única (SNP). Eles substitu-



íram amplamente os marcadores dominantes mais antigos, como polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), em razão da sua relativa abundância genômica e da alta reprodutibilidade de dados. Por exemplo, hoje existem ferramentas que permitem genotipar 700 mil marcadores de uma só vez em um bovino ou uma planta cultivada, como arroz ou soja. Além disso, os avanços na técnica de sequenciamento de nova geração do DNA e a consequente redução nos custos resultaram no uso crescente de ensaios baseados em sequenciamento na avaliação de germoplasma. Essas

novas tecnologias têm alterado significativamente a eficiência da conservação e o melhoramento genético com a implementação da chamada seleção genômica.

208

Qual marcador molecular é mais indicado para caracterização de uma coleção *ex situ*?

Vários tipos de marcadores podem ser utilizados de forma eficiente para a caracterização molecular de uma coleção. O melhor marcador a ser utilizado depende diretamente da resposta que se deseja obter. Para simples estimativa de variabilidade, os marcadores dominantes e universais podem ser úteis, como RAPD, ISSR e AFLP, por exemplo. Para estudos mais informativos, que podem ajudar na estimativa de diversidade genética, identificação de duplicatas, realização de estudos de *GAP analysis* e determinação do sistema reprodutivo, tanto SSR quanto SNP são marcadores altamente eficientes. Os SNPs apresentam vantagem caso se deseje associar os marcadores a características de interesse, pois são mais abundantes e permitem análises mais robustas.

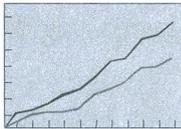
209

Qual marcador molecular é mais indicado para subsidiar a conservação *in situ*?

Da mesma forma descrita para a conservação *ex situ*, o melhor marcador a ser utilizado para subsidiar a conservação *in situ* depende da pergunta que se quer responder. Independentemente do marcador, é fundamental estimar a diversidade interpopulacional, de modo que seja possível determinar populações prioritárias para conservação, *pools* gênicos únicos, populações sob maior risco e áreas prioritárias para coleta de germoplasma, para a realização da conservação *ex situ* de forma complementar. Pode-se dizer que os marcadores codominantes como SSR e SNP geram mais dados capazes de subsidiar essas decisões.

210

Quantos marcadores moleculares são necessários para uma caracterização eficiente?



O número ideal de marcadores a serem utilizados varia de acordo com o nível de polimorfismo do marcador, da amostragem e da pergunta que se deseja responder ou da análise que se deseja fazer com essa caracterização. Geralmente, quanto mais polimórfico o marcador, menor a quantidade necessária para se obter os dados desejados. Por exemplo, em estudos de diversidade genética, a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura

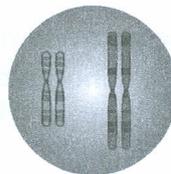
(FAO) sugere de 25 a 50 indivíduos por população analisada, utilizando de 20 a 30 marcadores microssatélites. Com a redução de custo dos marcadores SNP, esse número vai aumentar, mas não será maior do que algumas dezenas de milhares. Para estudos de associação e seleção genômica, são necessários centenas de milhares de marcadores SNP.

211

Qual é a importância da ploidia da espécie na caracterização molecular?

A caracterização molecular, com marcadores codominantes de espécies diploides, é bastante simples, pois estes

se comportam de forma mendeliana. Entretanto, quando a espécie é poliploide, as análises tornam-se mais complicadas, pois a estimativa das frequências alélicas torna-se inviável. Por exemplo, no caso



de espécie diploide, sabe-se que o indivíduo A tem duas vezes o alelo A; o AB tem uma vez o alelo A e uma vez o alelo B; e o indivíduo B tem duas vezes o alelo B. No caso de uma espécie tetraploide, cujo genótipo de um indivíduo num determinado loco seja A, sabemos que ele tem o alelo A quatro vezes. O mesmo acontece com o genótipo B, que terá o alelo B quatro vezes. Entretanto, no caso de o indivíduo apresentar genótipo AB, não se sabe quantas vezes cada alelo ocorre. Os genótipos possíveis seriam: AAAB, AABB ou ABBB. E, caso o indivíduo tetraploide apresentasse genótipo ABC, as possíveis combinações seriam: AABC, ABBC ou ABCC.

212

Qual é o método de citogenética que tem se destacado para caracterização de germoplasma vegetal?

A citogenética molecular é uma das técnicas mais informativas e que gerou mais impacto nos últimos anos. É utilizada para localizar distintas sequências de ácidos nucleicos sobre os cromossomos. O processo consiste basicamente na desnaturação do ácido nucleico alvo, seja DNA ou RNA, e a sua hibridização com uma sonda adequada. Essa sonda é constituída por segmento de ácido nucleico, previamente conhecido e marcado, que possibilita reconhecimento e localização de sequências específicas, permitindo o reconhecimento de cromossomos ou genomas inteiros. A técnica tem sido utilizada com muito sucesso em estudos de diversas espécies para fins de melhoramento.

213

Por que a caracterização molecular é essencial nos programas de melhoramento vegetal, para a proteção de cultivares e no controle da produção de mudas?

Porque a quantificação da variabilidade genética, via marcadores moleculares, reduz os problemas de identificação de grupos taxonômicos, bem como fornece marcadores diagnósticos para correta designação de cultivares e rastreabilidade de mudas.

214

Que elementos devem ser considerados para estabelecer os custos da caracterização?

Devem ser consideradas a existência e a manutenção da infraestrutura de campos experimentais e de laboratórios; custos para insumos agrícolas e reagentes. Além disso, devem ser também estimados os custos para recursos humanos.

215

Quais são as causas do uso incipiente do germoplasma conservado *ex situ*?

Várias são as causas que contribuem para a baixa utilização dos bancos de germoplasma, tais como a falta de documentação dos dados de passaporte e descrição adequada das coleções de germoplasma, a falta de caracterização e avaliação agrônômica, fitopatológica e entomológica dos acessos registrados nos bancos de germoplasma ou a indisponibilidade de acesso a esses dados. Tudo isso limita o interesse de usuários, principalmente dos melhoristas, que, por sua vez, já possuem coleções de trabalho substanciais e não desejam incluir em seus estudos acessos ou indivíduos com pouca ou nenhuma caracterização. Outro ponto é o baixo número de programas de pré-melhoramento, tanto para espécies nativas quanto para exóticas. Por último, os custos elevados para caracterização e avaliação dos recursos genéticos bem como a adaptação restrita dos acessos contribuem também para a baixa utilização dos bancos de germoplasma.

216

Quais são as ações mínimas necessárias para reverter o uso incipiente do germoplasma conservado *ex situ*?

A falta de informação acerca dos materiais disponíveis nos bancos de germoplasma pode ser superada pela organização da informação já disponível sobre os acessos ou indivíduos conservados em bancos de germoplasma; pela coleta rotineira de

observações de maior interesse dos usuários; pela conservação de acessos caracterizados e avaliados; pelo conhecimento de informações para características de adaptação ambiental; pela manutenção de estoques genéticos, mutantes e linhagens; pela manutenção de características úteis que possam substituir e complementar as coleções de trabalho; pela divulgação adequada dessas informações aos usuários de interesse. Além disso, é importante otimizar os programas de pré-melhoramento para fazer uma ligação eficiente entre bancos de germoplasma e os programas de melhoramento tradicionais.

217

Como as tecnologias/métodos de caracterização podem ser aplicadas na gestão de um banco de germoplasma?



Um problema em bancos de germoplasma de todo mundo, inerente às estratégias regulares de coleta e armazenamento, é a existência de acessos ou indivíduos idênticos, mas com dados de passaporte diferentes. Esses casos não são desejáveis, pois, além de ocuparem mais espaço físico e recursos financeiros, eles não contribuem na conservação da variabilidade genética dentro de uma espécie. Dessa forma, ferramentas moleculares, baseadas em marcadores

de DNA, podem fazer uma varredura do banco e identificar, com alta acurácia e precisão, amostras duplicadas ou altamente relacionadas. Estudos nos EUA mostraram que algumas coleções de plantas têm de 15% a 30% de duplicação de seus acessos.

218

O que é caracterização microbiana e qual a sua importância?

Caracterização é um conjunto de estudos específicos com isolados microbianos, visando entender sua morfologia, genética

e fisiologia. Sua importância reside no conhecimento das características particulares do isolado, não só para definir sua taxonomia, mas também para determinar o seu potencial de uso. Assim, a existência de um banco de caracteres é fundamental para a exploração socioeconômica da coleção microbiana.

A caracterização pode ser feita inicialmente usando princípios da taxonomia clássica, com base em estudos bioquímicos e/ou fisiológicos e microscópicos. Entretanto, o emprego de técnicas moleculares é cada vez mais exigido. Amplificações e sequenciamento direto do DNA ribossomal (rDNA) foram algumas das primeiras aplicações de PCR na taxonomia. Genes do rDNA têm regiões conservadas e variáveis, ITS1 e ITS2 (*Internal Transcribed Spacer*), as quais são utilizadas para o estudo de grupos taxonômicos relacionados. *Primers* universais e específicos têm se mostrado eficazes, pois permitem que essas regiões ITS sejam amplificadas, usando as sequências conservadas de rDNA. Com o auxílio de programas de computador, a partir dos dados de PCR, é possível identificar espécies inequivocamente, embora algumas compartilhem sequências ITS1 e ITS2 idênticas, sendo, portanto, indistinguíveis por esse método. Porém, essa tecnologia tem evoluído muito, e novos programas estão sendo desenvolvidos, assim como novos marcadores podem ser introduzidos para resolver as dúvidas taxonômicas que ainda perdurem. As técnicas “ômicas” também são cada vez mais utilizadas para desvendar funções gênicas e rotas metabólicas.

219

Como se procede a identificação dos microrganismos em uma coleção de culturas?

Cada grupo de microrganismo requer uma série de análises de caracteres taxonômicos específicos. Assim, a identificação dos microrganismos pode ser feita por diferentes técnicas, e, na maioria dos casos, é necessária uma combinação de técnicas, na chamada taxonomia polifásica. Essa vem ganhando força nas últimas décadas. A taxonomia clássica constitui a técnica mais antiga e baseia-se em estudos culturais e microscópicos.

A partir dos anos 1980, técnicas moleculares foram desenvolvidas, e hoje se utiliza especialmente a análise dos genes mais conservados (ribossomais), como 16S RNAr para procariotos, 18S RNAr, região intergênica entre o 5S RNAr e o 18S RNAr para eucariotos. Outros genes conservados, que codificam proteínas essenciais para os microrganismos, são usados complementarmente, e, com as novas técnicas de sequenciamento, o sequenciamento de nova geração, genomas inteiros podem ser obtidos com maior facilidade, permitindo a identificação precisa de um número crescente de microrganismos.

Outras técnicas baseadas em cromatografia e espectrometria (MS) também podem ser usadas para tipificação de microrganismos com base na composição de ácidos graxos e proteínas celulares. Diferentes abordagens da técnica MS, baseada em sistemas de ionização e detecção, vêm sendo desenvolvidas e utilizadas principalmente para fungos e bactérias, a partir da técnica de ionização por adsorção a laser assistida (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* – Maldi), seguida pela detecção em um analisador tipo tempo de voo (*Time of flight* – TOF). Alguns vírus são identificados com base em estruturas típicas observadas por microscopia ótica, como os corpos de oclusão de forma poliédrica, porém a maioria requer análises por microscopia eletrônica de partículas purificadas de vírus. Melhor identificação desses agentes infecciosos é obtida com análises moleculares a partir de DNA das partículas virais. Os critérios mínimos de taxonomia e sistemática para cada grupo de microrganismos são estabelecidos por comitês formados por especialistas internacionais.

220

Em que consiste a caracterização patogênica de microrganismos?

Consiste na determinação das seguintes características do microrganismo:

- Patogenicidade: visa verificar se um isolado desconhecido é patogênico a uma espécie de planta ou animal ou verificar se um isolado conhecido não perdeu sua capacidade de

infectar e causar doenças em seu hospedeiro. Os isolados devem ser inoculados em seu hospedeiro e incubados sob condições que favoreçam a colonização. No caso de fungo antagonista, são feitos testes para determinar se é um hiperparasita, por exemplo.

- **Virulência:** para os patógenos, diz respeito ao grau dos sintomas ocasionados. Normalmente é medida com o auxílio de escalas diagramáticas específicas. A agressividade diz respeito ao período de tempo que o microrganismo patogênico leva para causar infecção. Virulência e agressividade são respostas do hospedeiro submetido a uma determinada quantidade de inóculo e mostra a capacidade com que o patógeno penetra e supera o sistema de defesa natural do indivíduo. É medida, em geral, pela velocidade com que o patógeno causa a morte do hospedeiro. De forma genérica, o coeficiente angular das curvas de tempo-resposta (inclinação da curva) para diferentes espécies ou isolados, determinado em bioensaios controlados, indica a virulência ou agressividade daquele patógeno.

221

Em que consiste a caracterização bioquímica de microrganismos?

A caracterização bioquímica reside na possibilidade de se observar as atividades metabólicas dos microrganismos. São as chamadas provas bioquímicas, pelas quais se observam as transformações químicas verificadas em determinado substrato. Essas transformações são decorrentes de reações catalisadas por enzimas, utilizando nutrientes obtidos do ambiente que os cercam. Como um determinado microrganismo, ou grupo de microrganismos, possui sistemas enzimáticos específicos, as transformações bioquímicas são específicas e, portanto, constituindo características próprias. Um exemplo é a capacidade de usarem enzimas para degradar hidratos de carbono, lipídeos, proteínas e aminoácidos. Geralmente, a metabolização dessas moléculas gera produtos, cuja detecção pode ajudar na caracterização dos organismos de interesse.

RECURSOS GENÉTICOS



O produtor pergunta, a Embrapa responde

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*



O produtor pergunta, a Embrapa responde

*Samuel Rezende Paiva
Maria do Socorro Maués Albuquerque
Antonieta Nassif Salomão
Solange Carvalho Barrios Roveri José
José Roberto Moreira*

Editores Técnicos

Embrapa
*Brasília, DF
2019*