

# Ciência e Tecnologia no Diagnóstico de Doenças de Plantas: Avanços para uma Agricultura Sustentável

Carla Varanda<sup>1,2,3</sup>, Diogo Belbute<sup>1,4</sup>, Beatriz Magrinho<sup>1,4</sup>, Patrick Materatski<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Instituto Politécnico de Santarém, Escola Superior Agrária de Santarém, Quinta do Galinheiro - S. Pedro, 2001-904 Santarém, Portugal;

<sup>2</sup> Centro de Estudos de Recursos Naturais Ambiente e Sociedade (CERNAS); Instituto Politécnico de Santarém, Quinta do Galinheiro - S. Pedro, 2001-904 Santarém, Portugal;

<sup>3</sup> MED - Instituto Mediterrâneo para a Agricultura, Ambiente e Desenvolvimento & CHANGE - Instituto para as Alterações Globais e Sustentabilidade, Universidade de Évora, Pólo da Mitra, 7006-554 Évora, Portugal;

<sup>4</sup> Alunos do curso de Biologia e Biotecnologia Alimentar  
carla.varanda@esa.ipsantarem.pt

As doenças das plantas são responsáveis por cerca de 40% das perdas na agricultura. A detecção precoce dos agentes patogénicos causadores das doenças, como fungos, bactérias, vírus e outros, permite reduzir as perdas causadas, bem como evitar a disseminação destes agentes patogénicos para novas áreas, onde podem causar elevados danos à agricultura local. Além disso, a necessidade de produzir plantas livres de agentes patogénicos para comercialização ou propagação exige métodos de diagnóstico extremamente sensíveis.

A existência de métodos de diagnóstico que permitam identificar com precisão as doenças vegetais é essencial no cenário de mudanças climáticas, em que os agricultores enfrentam o aparecimento de novos e desconhecidos agentes patogénicos. Atualmente, existe uma grande variedade de técnicas que permitem detetar agentes patogénicos em plantas. Com o avanço da ciência, nos últimos anos, vários novos métodos de diagnóstico têm sido desenvolvidos, fornecendo alternativas rápidas, sensíveis e eficientes para a deteção cada vez mais precoce de agentes patogénicos permitindo reduzir a aplicação de fitofármacos, assim como diminuir as perdas de produção.

Neste artigo iremos resumir os métodos atualmente disponíveis para o diagnóstico de agentes patogénicos em plantas, desde os mais convencionais até à tecnologia de ponta, mostrando as vantagens e desvantagens de cada um e o potencial que apresentam para uma agricultura sustentável.

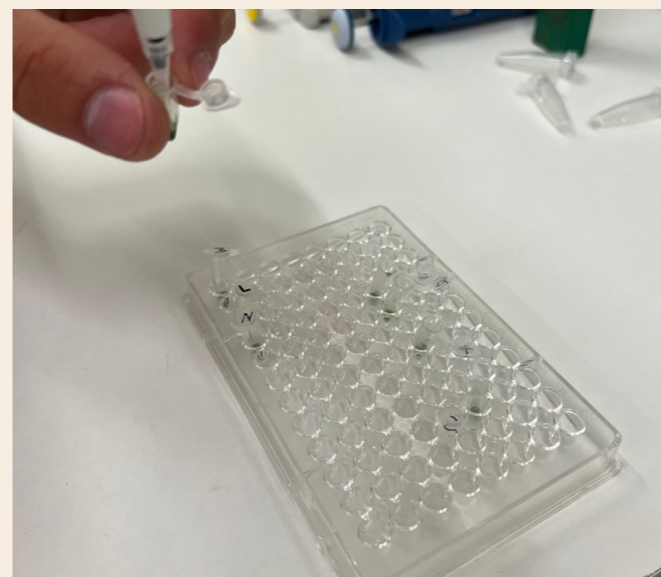


Azeitonas com sintomas de gafa e crescimento do fungo causador da gafa, em placa de Petri

## A evolução das técnicas de diagnóstico de doenças em plantas

A observação de sintomas de doenças de plantas é o método mais fácil e rápido para diagnosticar doenças de plantas. No entanto, muitos agentes patogénicos causam sintomas semelhantes e a sua identificação depende da elevada experiência do observador. Além disso, infeções latentes ou muito iniciais não são detetadas. Técnicas mais modernas usam sensores óticos para detetar alterações em plantas antes do aparecimento de sintomas visíveis 'a olho nu' (Reis Pereira et al., 2024), no entanto, a interpretação desses dados ainda é complexa.

Os métodos baseados no crescimento de agentes patogénicos em laboratório envolvem o cultivo destes agentes em placas de Petri, em meios específicos, sob condições controladas, seguido da sua identificação através de métodos morfológicos e microscópicos (Ferone et al., 2020). São métodos simples mas muitas vezes exigem várias semanas até chegar à identificação, e são limitados pelo facto de que nem todos os agentes podem ser cultivados, como por exemplo os vírus. Os métodos imunológicos (ou serológicos) detetam agentes patogénicos através de reações com anticorpos, que podem ser marcados e que reconhecem antígenos específicos (Fang e Ramasamy, 2015). Por sua vez, as técnicas de hibridação utilizam a ligação de sequências de DNA complementares para identificar os agentes patogénicos presentes, embora sejam trabalhosas e dispendiosas. Mais recentemente, têm sido desenvolvidos biossensores que são ferramentas que permitem detetar e quantificar alvos biológicos em amostras (Bridle e Desmulliez, 2021), oferecendo rapidez, baixo custo, alta sensibilidade e possibilidade de portabilidade.



Preparação de uma reação de PCR

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica que permite a amplificação de fragmentos de DNA específicos, podendo confirmar a presença do agente patogénico (Shen, 2019). É um método muito sensível e rápido, no entanto requer equipamento específico e pessoal qualificado. Existem diversas variantes da técnica de PCR. O PCR quantitativo (qPCR), ou PCR em tempo real, mede o DNA amplificado numa reação, conseguindo quantificar o agente patogénico numa planta (Postollec et al., 2011) e, apesar de ser mais caro, é mais rápido, específico e sensível que o PCR convencional o que é essencial na deteção precoce de agentes patogénicos. Existem ainda outras variantes de PCR, como o PCR digital de gotículas (ddPCR), multiplex PCR, nested PCR, mas todas com o princípio da amplificação específica de ácidos nucleicos (Hindson et al., 2011). A amplificação de DNA também pode ser realizada por métodos de amplificação a temperatura constante, não tendo a necessidade de um termociclador (Ivanov et al., 2021), mas apresenta sensibilidade menor que o qPCR.

A sequenciação de DNA (Beye et al., 2017) é uma técnica que permite que microrganismos possam ser identificados com precisão. Quando o agente etiológico não é conhecido, a identificação pode ser alcançada por métodos de sequenciação de nova geração (NGS) que permitem sequenciar qualquer material genómico numa amostra. As tecnologias NGS permitem identificar novos agentes patogénicos, no entanto, requerem poder computacional significativo, análises complexas e os custos ainda são relativamente elevados.

Outra técnica recente e inovadora é baseada no sistema CRISPR-Cas. Este sistema, originalmente descoberto como uma defesa natural de bactérias contra vírus, pode ser programado para detetar sequências de DNA específicas de agentes patogénicos. Como principais vantagens do CRISPR incluem-se a alta sensibilidade e especificidade, a mínima necessidade de equipamento avançado e a rapidez de resultados (2 horas). A tecnologia CRISPR-Cas pode ser combinada com a amplificação isotérmica de ácido nucleico baseada na extração da polimerase recombinase (RPA). A compatibilidade do RPA com o CRISPR-Cas é excelente, e esta combinação RPA-CRISPR/Cas pode ser verificada no campo, com resultados

extremamente rápidos e sensíveis. É uma técnica recente que ainda não está amplamente implementada, pois exige elevado conhecimento técnico e apresenta ainda custos muito elevados. Espera-se, no entanto, que num futuro próximo seja vastamente aplicado e com custos mais reduzidos.

## Conclusões e desafios

Os avanços recentes no diagnóstico de agentes patogénicos de plantas, permitem detetar agentes patogénicos com elevado nível de sensibilidade e precisão, antes do aparecimento de sintomas, abrindo novas oportunidades para controlar e prevenir o aparecimento de doenças na agricultura.

Como apresentado neste artigo, são vários os métodos que permitem diagnosticar doenças em plantas. A escolha do método de deteção depende de vários fatores, nomeadamente da sensibilidade que se pretende, do custo, da rapidez, do tipo de amostra e também do acesso a laboratórios com protocolos otimizados para a cultura/agente patogénico.

O desenvolvimento de novos métodos portáteis e sensíveis de deteção de ácidos nucleicos ainda é um campo crescente de investigação que, nos próximos anos, fornecerá possibilidades interessantes para investigadores e agricultores, exigindo um mínimo de equipamentos para que possa realizar uma análise completa diretamente no campo, mesmo por pessoal com treinamento mínimo. Tal trará grandes benefícios para a agricultura em todo o mundo, pois será possível monitorar, no local e com eficiência, grandes áreas cultivadas. No entanto, os testes realizados em laboratório são atualmente os que permitem resultados mais precisos.

A Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Santarém presta, no seu Laboratório de Biologia Molecular, sob responsabilidade da Professora Carla Varanda, serviços de apoio a agricultores, nomeadamente em termos de deteção de agentes patogénicos nas culturas, onde tem protocolos moleculares altamente sensíveis e otimizados para identificar diversos agentes patogénicos em várias culturas.

Para além disso tem reforçado a investigação na área da proteção de plantas e diagnóstico, de forma a fornecer aos agricultores as tecnologias mais recentes e sensíveis, com a otimização de protocolos necessária às condições específicas que determinada cultura e agente patogénico requer.

## Referências

Solicitar aos autores

## Agradecimentos

Patrick Materatski é financiado por fundos nacionais através da FCT/MCTES, pelo contrato CEEC (https://doi.org/10.54499/2021.01553.CEECIND/CP1670/CT0003). Os autores também agradecem o apoio do CERNAS - UIDP/00681/2020 (https://doi.org/10.54499/UIDP/00681/2020), MED - UIDB/05183/2020 (https://doi.org/10.54499/UIDB/05183/2020) e CHANGE (https://doi.org/10.54499/LA/P/0121/2020).