

Biotologia molecular e engenharia genética aplicada à fitopatologia

A chegada da biologia molecular e a engenharia genética na grande área de estudo da fitopatologia, trouxe maior compreensão dos estudos e abriu novos horizontes para descobrir e compreender a interação planta-patógeno, permitindo entender os mecanismos envolvidos nessa interação com profundidade e desenvolver estratégias de manejo mais eficientes e eficazes no campo, principalmente em doenças bacterianas e virais, de difícil controle e diagnóstico precoce.

A biologia molecular, compreende o estudo da molécula a partir dos ácidos nucleicos, sendo uma forma importante a obtenção da extração de RNA ou DNA com sucesso para garantir bons resultados nos métodos. Sua aplicação na fitopatologia ganhou enorme destaque na obtenção de uma diagnose mais específica e precisa, não somente baseada em sintomas, mas também no isolamento do patógeno. Dentre os diferentes métodos moleculares usados, podemos citar a PCR (Reação em cadeia de polimerase), ~~entre~~ e vários diferentes na prática, ~~para~~ onde sua aplicabilidade depende da pergunta a ser respondida. Por exemplo, quando precisarmos ~~que~~ confirmar a presença de um determinado patógeno na planta, uma *Xanthomonas* spp. por exemplo, podemos usar a PCR convencional, o qual é um método qualitativo, onde a partir de uma sequência de oligonucleotídeos específico à *Xanthomonas* spp. indicará a presença ou não da fitobactéria no tecido vegetal em estudo. Quando partimos de um histórico, onde há outras observações que podem corroborar com meus resultados, a PCR convencional basta. No entanto

em estudos mais aprofundados, principalmente para o desenvolvimento de estratégias de controle, é importante, mais do que saber da presença ou não, é importante saber o quanto se tem do patógeno. Ou seja, uma carga bacteriana baixa ou alta, no caso da Xanthomonas. Dessa forma, entria o método de qPCR (quantitativo PCR). Nesse método obtém-se a quantidade de carga bacteriana.

Em muitos casos, é necessário métodos ainda mais específicos como a RT-PCR (Transcriptase reverse PCR), onde podemos usar diferentes corantes com maior ou menor especificidade ao meu alvo, e garantir maior eficiência no resultado. Na RT-PCR para diagnóstico de doença, podemos usar corantes com maior ou menor especificidade, ~~onde o corante SYBR~~ O corante SYBR green, muito usado na biologia molecular, fluoresce quando é amplificado o gene alvo, é baseado pela curva de melting, mas pode ~~ter~~ apresentar muitos falsos positivos, pois depende fortemente de uma sequência de oligonucleotídeos bem determinada e baixo anelamento com ele mesmo ou outras sequências, além de uma boa extração ~~de~~ de DNA ou RNA com qualidade. Quando essas condições e uma boa técnica a ser aplicada, pois em relação aos outros, tem custo menor. Outro ~~corante~~ método é a RT-PCR usando o tag Man. O tag Man tem maior especificidade em relação ao SYBR green, pois só ocorre fluorescência quando o ~~o~~ gene alvo é amplificado. Ele é muito usado ~~para~~ quando o patógeno apresenta baixa carga viral, pois mesmo em concentrações baixas, ele é identificado. Além desses (SYBR green e Tag Man) muito utilizados, existem o Molecular Beacons e Scorpions que possuem sondas ainda mais específicas e apresentam maior precisão no resultado final, no entanto são métodos mais robustos e ~~mais~~ com custo elevado.

Quando ~~passamos~~ sobre técnicas moleculares para diagnóstico de doenças em plantas, podemos citar também a LAMP (Amplificação isotérmica mediada por Loop). As técnicas utilizadas anteriormente podem ser muito usadas em estudos mais aprofundados de diagnóstico e também para fins de identificação de patógenos, como fungos, bactérias, oomicetos e em alguns casos de vírus, no entanto, a LAMP, é uma importante técnica usada na diagnose de doença viral. ~~Uma~~ A LAMP é uma técnica ~~processo~~ rápida, muito usada para ~~diagnóstico~~ diagnósticos rápidos em campo, cuja amplificação acontece em temperatura constante, diferente da PCR com ciclos alternados. Para vírus de RNA, tem a RT-LAMP. Essa técnica apresenta vantagens pela rapidez e uso no campo, ~~mas~~ mas também depende de desenhos de sequências específicas com parâmetros de qualidade muito bem posicionados, para evitar falsos positivos.

Dessa forma, a PCR convencional, qPCR, RT-qPCR e a LAMP e RT-LAMP, são ferramentas importantes no diagnóstico de doenças em plantas. A sua escolha depende do patógeno (suspeita) e da profundidade do estudo.

Além do uso na diagnose, a RT-qPCR é uma ferramenta de extrema importância para a compreensão da interação planta-patógeno, através da expressão gênica. A expressão gênica é realizada a partir do RNA e analisado e quantificado a expressão de genes de interesse. O processo de infecção inicialmente é identificado pela quebra de barreiras físicas - a PTI (imunidade desencadeada por PAMPs (Padrões moleculares associados a patógenos)). Dessa forma, uma vez quebrada a barreira física, o patógeno inicia a tentativa de quebra da PTI. Nessa fase ocorre uma série de eventos importantes de sinalização, como

o aumento de cálcio ~~no~~ e espécies reativas de oxigênio, que quando em altas concentrações, sinalizam ao uso hormonal de defesa da planta como o ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno, e inicia-se a ETI (imunidade desencadeada por insetos). Nessa fase a planta busca reagir ao ataque de forma mais efetiva, acionando fitoalexinas e principalmente proteínas relacionadas a patogênese, que atuam de forma específica na ~~combate~~ supressão do patógeno. O uso da biologia molecular nesse processo de infecção, ~~esta~~ ~~bele~~ ~~amento~~ da ciência e as tentativas de defesa da planta é de extrema importância, para identificação de marcadores moleculares, que podem ser usados posteriormente no melhoramento genético, na engenharia genética com a edição genômica e ~~abscisic~~ ~~abscisic~~ ~~abscisic~~ compreensão da regulação dos genes da planta pelos insetos (moléculas químicas liberadas pelo patógeno) no momento da infecção) para o desenvolvimento de novas estratégias de manejo e produtos ou indutores de resistência que podem potencializar a expressão de genes de defesa vegetal e amplificar a resposta de defesa ao patógeno.

Neste contexto, ainda podemos mencionar o uso da transcriptômica, para uma visão mais ampla da transcrição dos genes. Aqui, podemos descobrir marcadores moleculares importantes, genes que vão mais ou menos expressos, com potencial de silenciamento ou superexpressão em uma posterior edição. No contexto das ômicas, a proteômica e metabolômica também são ferramentas que podem contribuir para uma análise e compreensão mais robusta dessa interação planta-patógeno.

A partir do uso dessas ferramentas a fitopatologia contemporânea, abre espaço para a engenharia genética, embora ainda muito retilhada, mas abre espaço para o

desenvolvimento de novas estratégias de controle para doenças de difícil controle, ~~exemplos~~.

A engenharia genética trouxe a possibilidade de desenvolver plantas mais resistentes a partir da edição genômica, como o CRISPR/Cas, onde diferente do melhoramento genético clássico que pode demandar décadas para obtenção de resultados a depender da espécie e é baseado no cruzamento de plantas da mesma espécie, na edição genômica, podemos introduzir genes de outra espécie. Essa ferramenta, embora promissora para o futuro ~~podendo~~ já usada, principalmente em doenças virais, podem trazer consequências futuras como ~~exemplos de desequilíbrio~~ a variabilidade genética e o surgimento de patógenos mais agressivos. Por isso, a compreensão da interação planta-patógeno é tão importante e a biologia molecular nos ajuda a compreender os mecanismos envolvidos.

Tão importante quanto o entendimento da diagnose, a interação planta-patógeno, também é importante técnicas que facilite o entendimento e a descobertas de novos patógenos. Nesse processo de identificação também podemos usar a biologia molecular, e o sequenciamento de DNA genômico.

Concluído, ~~no contexto geral~~ diante das principais doenças atuais, que é o controle de doenças em plantas, frente as mudanças de clima, a busca por sistemas produtivos mais sustentáveis, a biologia molecular e a engenharia genética se tornaram ferramentas de extrema importância dentro da área da fitopatologia, sendo importantes no aprimoramento da diagnose de doenças, na ~~compreensão~~ compreensão da interação planta-patógeno e na identificação de variantes e novos organismos patogênicos em plantas. Essas ferramentas contribuem para o desenvolvimento de estratégias de manejo, onde o uso de plantas resistentes

ao desenvolvimento de produtos, que podem amplificar as respostas de defesa na planta, com foco mais sustentável buscando a atração mais eficaz dos mecanismos de resistência sistêmica induzido, usando microrganismos benéficos, como bacillus por exemplo e indutores de resistência de base natural, como extratos de algas, substâncias húmicas e fósforos, que podem ativar os mecanismos naturais de defesa da planta, e amplificar a expressão de genes de defesa e a planta se defender do patógeno. Esse é o caminho para uma agricultura mais ecológica e sustentável e pode ser melhor aplicado com o auxílio da biologia molecular e a engenharia genética.