

Implementação de novas técnicas de diagnóstico no quarentenário IAC



<https://doi.org/10.56238/interdiinovationscrese-033>

Barbara Negri

Instituto Agronômico de Campinas (IAC)/Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fitossanidade, Campinas, SP.

Martha Maria Passador

Instituto Agronômico de Campinas (IAC)/Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fitossanidade, Campinas, SP.

Roberta Pierry Uzzo

Instituto Agronômico de Campinas (IAC)/Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fitossanidade, Campinas, SP.

Christina Dudienas

Instituto Agronômico de Campinas (IAC)/Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fitossanidade, Campinas, SP.

Julieta Andrea Silva de Almeida

Instituto Agronômico de Campinas (IAC)/Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Café “Alcides Carvalho”.

RESUMO

O Complexo Quarentenário IAC tem como atribuição, efetuar a quarentena de materiais

vegetais que serão introduzidos no Brasil por empresas privadas ou instituições públicas, com objetivo de pesquisa científica. Os materiais são analisados quanto a agentes patogênicos, bem como semeados em casa de vegetação para análise do crescimento e verificar possíveis sintomas de patógenos. Alguns vírus, bactérias e fungos, presentes em materiais importados, requerem técnicas de diagnóstico e rastreabilidade cada vez mais aprimoradas. A partir de novembro de 2012 foram iniciadas as implementações para promover o desenvolvimento desse trabalho dentro de uma moderna estrutura, baseada em modelos quarentenários internacionais. Incluindo adaptações das casas de vegetação, câmaras frias, organização e montagem de novos laboratórios para as análises dos materiais, dessa forma, novas metodologias foram estudadas e aplicadas, como as técnicas envolvendo biologia molecular (PCR). Para complementar a eficiência das análises realizadas em quarentena vegetal, foram elaborados testes mais específicos e precisos. Para um melhor resultado e maior segurança, as análises são feitas dentro do complexo do Quarentenário IAC.

Palavras-chave: Quarentena vegetal, Biologia molecular, Pesquisa científica.

1 INTRODUÇÃO

A quarentena vegetal é uma medida de biossegurança, e pode ser definida como todas as atividades designadas para prevenir a introdução e disseminação de pragas de importância econômica que ainda não estão presentes em áreas indenes, ou que estão presentes, mas não se encontram amplamente distribuídas e oficialmente controladas (FAO, 2007; Marques et al., 2016). Dentro deste contexto, é uma atividade que visa prevenir a difusão de pragas exóticas, através de controle de material vegetal procedente de países ou regiões suspeitas, cujo estado sanitário ofereça dúvidas (Marinho et al., 2004).



O Quarentenário IAC é responsável por quarentenas de materiais genéticos com objetivo de detectar e conter a introdução e disseminação no país de pragas e doenças de plantas economicamente importantes, ou produtos vegetais que ainda não estão presentes em uma área, ou que estão presentes, mas não ocorrem amplamente e estão sob controle oficial. Após inspeções do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), de acordo com a Portaria nº 56 de 11 de maio de 1998, DO nº 91 de 15 de maio de 1998, passou a ser credenciado, para realizar quarentena vegetal (Veiga et al., 2005).

As análises das amostras recebidas (inspeção, quarentena e liberação de material isento de patógenos exóticos) contam com o apoio de uma Comissão Interna de Quarentena, a qual é composta por pesquisadores do Instituto Agrônomo (IAC), Instituto Biológico (IB) e profissionais externos especialistas nas áreas afins (Dudienas et al., 2020). Os materiais são analisados quanto a agentes patogênicos, bem como semeados em casa de vegetação para análise de crescimento e verificação de possíveis sintomas de doenças ou sinais de fitopatógenos (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2022). Patógenos como vírus, bactérias e alguns fungos presentes em materiais importados requerem técnicas de diagnóstico e rastreabilidade cada vez mais aprimoradas.

Os materiais recebidos consistem em variedades diversas de plantas com a finalidade de estudo, pesquisa e melhorias na produção. Podem ser na forma de sementes e estacas, mudas em substrato, e também plantas cultivadas *in vitro*. Diante do exposto o presente estudo teve como objetivo a divulgação de novas técnicas de diagnóstico em quarentena vegetal desenvolvidas nas novas instalações, e os resultados obtidos até o momento.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais recebidos no Quarentenário IAC são analisados por meio de testes de sanidade de sementes, avaliação de presença de insetos, ácaros, plantas daninhas, nematoides, fungos, bactérias e vírus, em amostras retiradas do material de origem. Paralelamente à etapa de plantio, realizado em condições de casa de vegetação adaptada às necessidades de um quarentenário, são realizados testes de laboratório como patologia de sementes, PCR e identificação de bactérias e fungos (Doyle; Doyle, 1987; Sigma Aldrich, 2019; Passador et al., 2018).

Como primeira etapa para o recebimento e análise dos materiais que serão quarentenados a empresa ou instituição de pesquisa que está importando os referidos materiais deve enviar um e-mail para o quarentenário solicitando uma carta de aceite. Essa carta contém informações relacionadas à origem e procedência, quantidade de material vegetal, nome da cultura, data prevista para a chegada, temperatura adequada para armazenamento, e também se são organismos geneticamente modificados (OGM).



São verificadas as condições para recebimento do material vegetal, como espaço disponível e quais análises serão necessárias. Em seguida, é enviada uma resposta para a empresa com a carta de aceite emitida. É importante ressaltar que os procedimentos de quarentena estão em concordância com as normas do *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)*, que emite a permissão de importação à empresa ou instituição de pesquisa solicitante.

Todo o trânsito do material é acompanhado pelo solicitante. O país de origem envia o material e após sua chegada no aeroporto, o MAPA realiza uma fiscalização, na sequência esse material vegetal é transportado em sua totalidade ao quarentenário que emitiu a carta de aceite.

O material é recebido e conferido dentro das dependências do quarentenário. Uma lista com identificação e quantidade acompanha a carga, essa é utilizada para verificação do material, também é observado as condições fisiológicas das sementes, plantas, frascos e meios de cultivo. Caso haja alguma não conformidade, esta é informada ao MAPA que indicará os procedimentos para cada situação.

Após verificação de recebimento os especialistas (entomologista, matologista e nematologista) são acionados para virem ao quarentenário analisar o material, caso não tenha observado nenhum patógeno é realizada a amostragem, onde até 10% da quantidade de frascos e/ou material vegetal é separada para análise de fitopatógenos (vírus, fungos e bactérias).

Para quarentena *in vitro* pode conter de 10 a inúmeros tubos ou potes plásticos, contendo uma ou mais plântulas, que são mantidas em salas climatizadas e com fotoperíodo de acordo com a necessidade da cultura, e estas condições são verificadas diariamente. O especialista em cultura de tecido realiza uma análise visual com auxílio de lupa para verificar a qualidade do meio de cultura e presença de contaminantes, e também a condição das plantas e sinais de presença de patógenos. Em alguns casos, tais procedimentos podem requerer mais tempo, e, algumas empresas solicitam a transferência das plântulas para um novo meio de cultivo durante o período de quarentena, pois pode ocorrer ressecamento do meio de cultivo original ou crescimento excessivo das plantas. Algumas quarentenas chegam com frascos contaminados, esses são eliminados através de autoclavagem (40 minutos a 121°C). Alguns frascos (não passando de 10% da quantidade recebida) são enviados para análise laboratorial para verificação de possibilidade de infecção por fungos, bactérias e/ou vírus (Figura 1A e 1B).

Para outros materiais vegetais como sementes (Figura 1 C), mudas, estacas, entre outros, é feita uma análise visual pelo entomologista e/ou matologista e nematologista. Após essa análise, uma amostra do material ou a carga toda (muda, tolete, estaca) é encaminhada para casa de vegetação para o plantio (Figura 1D). Nesse período é verificado se há necessidade de algum tratamento fitossanitário após as análises citadas. Para as atividades em casa de vegetação, são seguidos os protocolos

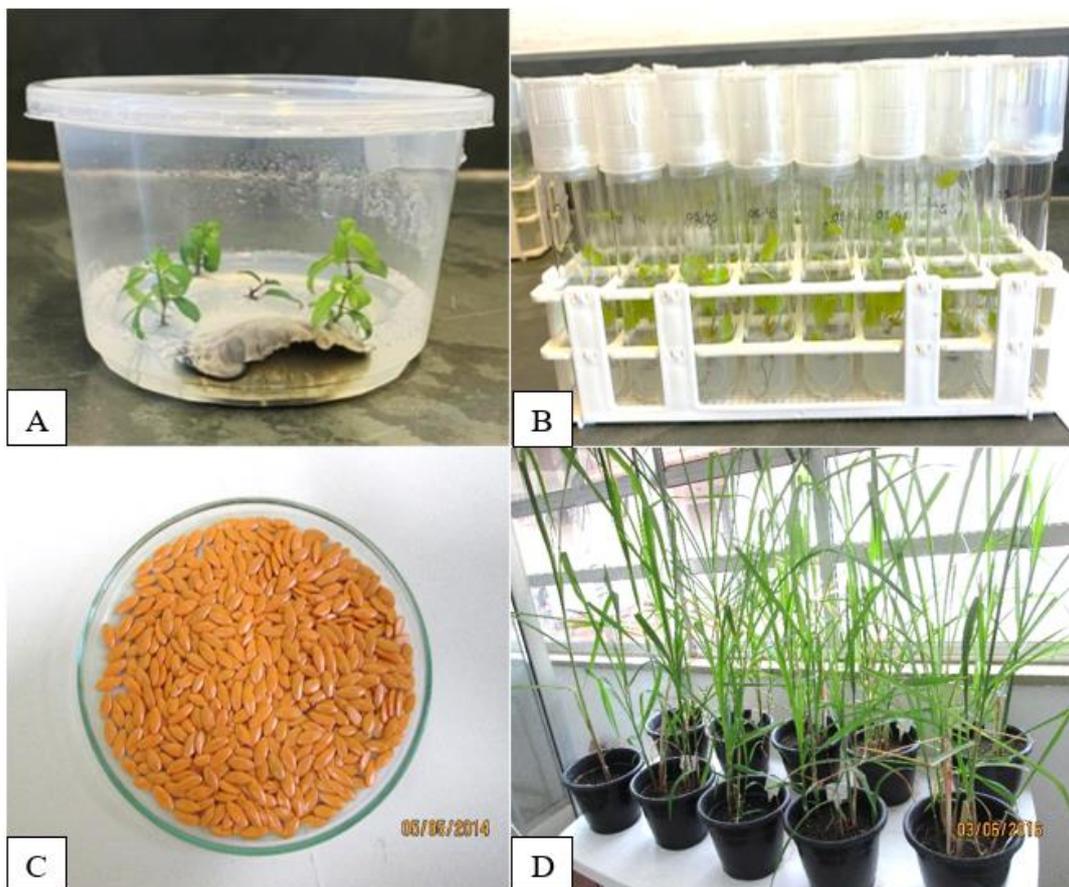


relacionados ao uso de jalecos e botas, e para maior segurança dos materiais quarentenados as salas são individualizadas.

Os especialistas de fitopatologia e virologia são os que acompanham o crescimento das plantas, e realizam as análises finais para liberação ou não do material vegetal.

Os testes são realizados buscando, principalmente, patógenos ausentes no Brasil, conforme a lista de Pragas Quarentenárias Ausentes (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2022) e são realizados pelos especialistas das respectivas áreas. A presença de vírus é detectada por PCR e, nas situações em que ocorrem ampliações que resultarem em amplicons, o material será encaminhado para sequenciamento, a fim de identificar o fragmento amplificado.

Figura 1. A e B - Materiais *in vitro* recebidos para análise, com e sem contaminação, respectivamente C - Sementes separadas para as análises realizadas pelos especialistas. D – Material semeado em casa de vegetação.



Caso encontre um patógeno ou praga que são presentes no Brasil, os materiais vegetais são submetidos a tratamentos fitossanitários, recomendados pelo especialista da área da praga. Após análise destes relatórios, o MAPA encaminhará um ofício autorizando a liberação do material, para que seja retirado pela empresa ou instituição de pesquisa.

Para a realização do presente estudo, as informações obtidas sobre os materiais recebidos pelo Quarentenário IAC, foram no período entre janeiro de 2013 a novembro de 2018, oriundas de um



banco de dados, que consiste em cartas de aceite, fichas de registro de material e laudos laboratoriais. Considerou apenas as culturas, e não a quantidade de acesso.

No processo de quarentena vegetal, para verificar possíveis sintomas de patógenos bem como a presença dos mesmos, os materiais foram analisados visualmente e por técnicas em biologia molecular (PCR).

Para complementar a eficiência destas análises, torna-se necessário que testes mais específicos e precisos sejam realizados, quando há presença sintomas e sinais de algum patógeno, bem como na ausência dos mesmos. Dentro deste contexto os diagnósticos envolvendo técnicas de biologia molecular por PCR proporcionará resultados mais rápidos para o serviço do quarentenário.

Estas atividades serão realizadas no laboratório de Biologia Molecular do Quarentenário IAC, implantado recentemente de acordo com as exigências do MAPA (IN 28, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2020), e a partir de instalações pré-existentes do Instituto Agronômico. Desta forma, o trabalho realizado neste setor será efetuado concomitante às análises realizadas por membros que compõem a comissão de quarentena do Instituto Agronômico. São estes membros especialistas em entomologia, fitopatologia, virologia, nematologia, patologia de sementes, planta daninhas e cultura de tecido.

Esta classe de diagnóstico permitirá que os resultados e laudos sejam liberados para as empresas com mais rapidez. Será dada preferência para métodos de extração de ácidos nucleicos que possam ser utilizados na rotina diária do quarentenário, mesmo para uma grande quantidade de material vegetal a ser analisado. Para tanto serão testados e usados protocolos disponíveis na literatura, que proporcionem maior rendimento nas detecções e ofereçam resultados confiáveis. Após a extração dos ácidos nucleicos, a técnica de PCR e a técnica de sequenciamento contribuirão para obtenção dos diagnósticos desejados. As extrações se darão a partir do material vegetal, porém para alguns fungos e bactérias torna-se necessário o cultivo em meios de cultura específicos para cada microrganismo. De acordo com cada situação é possível que haja a necessidade de elaboração e/ou modificação de protocolos já disponíveis e publicados, de modo que proporcione um serviço cada vez mais eficiente, e que possa ser um procedimento a ser adotado por outros Quarentenários e/ou laboratórios credenciados.

Quando houver a detecção de uma praga quarentenária ausente (PQA), uma notificação é encaminhada para o MAPA, que poderá determinar a destruição ou não do material.

Com a finalização de todas as análises, todos os laudos dos especialistas e laudo final são enviados ao MAPA. Para material vegetal, tais como: mudas, estacas, material in vitro, e materiais geneticamente modificados uma lista também acompanha. Na maioria das quarentenas é elaborado um boletim de análise de biologia molecular.

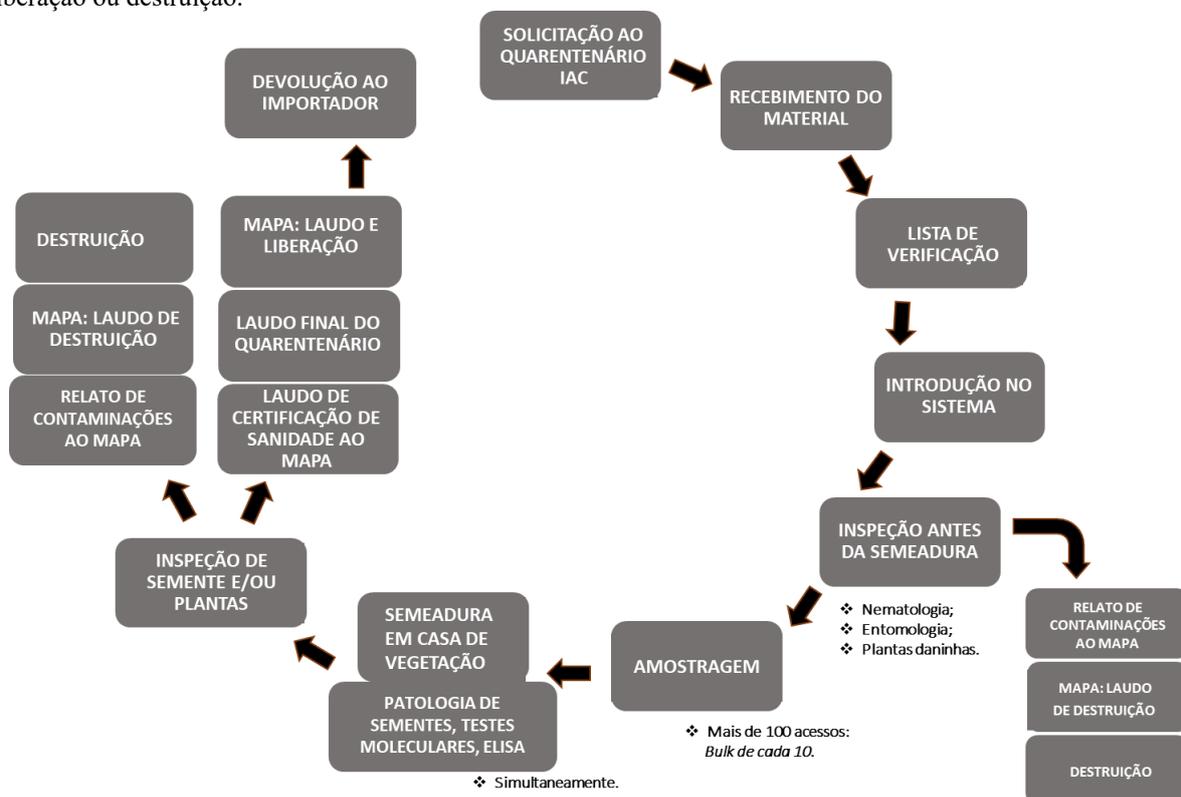


3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Além de dinamizar os serviços de diagnóstico, esta é uma estrutura especializada e organizada de acordo com procedimentos ou protocolos que incluem segurança fitossanitária, garantindo identidade e rastreabilidade.

Os trabalhos desenvolvidos tanto na rotina diária, como na pesquisa, possibilitam a elaboração de trabalhos que podem ser apresentados em congressos e reuniões científicas, bem como a publicação de manuscritos contendo resultados das atividades desenvolvidas no laboratório, como quantidade e tipos e materiais recebidos, microrganismos de maior ocorrência, entre outros (Figura 2). Igualmente, as informações relevantes poderão ser agrupadas em um catálogo de acesso público, disponível no *site* do IAC, de modo que contribua para estudos realizados em empresas e instituições de ensino e pesquisa.

Figura 2. Fluxograma descritivo do processo de Quarentena Vegetal, desde o recebimento de todo o material vegetal até a sua liberação ou destruição.



As estruturas dos novos laboratórios foram elaboradas de acordo com as especificações do MAPA. Após a finalização das instalações estruturais, foram adquiridos os itens necessários para realização das atividades (Figura 3). Além disso, também foi realizada a manutenção e fiscalização dos laboratórios visando o seu funcionamento adequado, e garantindo sua organização e limpeza.

As amostragens e análises são realizados dentro de novos laboratórios (Figura 4A e 4B), em setores organizados de acordo com o uso e para melhor aproveitamento dos espaços disponíveis. Estes



setores compreendem desde o recebimento dos materiais, abertura das caixas e pacotes, triagem e distribuição para os laboratórios de análises e membros especialistas.

As amostragens e análises são realizados dentro de novos laboratórios (Figura 4A e 4B), em setores organizados de acordo com o uso e para melhor aproveitamento dos espaços disponíveis. Estes setores compreendem desde o recebimento dos materiais, abertura das caixas e pacotes, triagem e distribuição para os laboratórios de análises e membros especialistas.

Figura 3. Laboratório de Biologia Molecular, incluindo sala de eletroforese. A - Bancada com termociclador e pHmetro. B - Bancada de trabalho com equipamentos e pias. C - Bancada de trabalho onde são preparadas as reações, com equipamentos e micropipetas. D - Sala de eletroforese com cuba e fotodocumentador. E - Sala de água ultrapura com respectivo equipamento. F e G - Autoclave e ultrafreezer (-80°C).





Figura 4. A - Laboratório de abertura de caixas e triagem de sementes. B – Porta de acesso aos laboratórios com cortina de vento.



A implementação de novas estruturas para os laboratórios e novas técnicas para diagnóstico de fitopatógenos permitiram a obtenção de resultados, contribuindo para a produção científica do Núcleo Quarentenário IAC, com trabalhos apresentados e reuniões científicas e um capítulo de livro (Dudienas et al., 2020; Passador et al., 2018; Passador et al., 2019; Passador et al., 2021; Passador et al. 2022a, 2022b; 2022c; 2022d).



REFERÊNCIAS

- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v.19, p. 11-15, 1987
- DUDIENAS, C.; UZZO, R.P.; PASSADOR, M.M. Quarentenário IAC. *O Agrônomo*, v. 72, p. 96-98, 2020
- FAO. Framework for pest risk analysis. International Standards for Phytosanitary Measures. N. 2, Food Agric. Organ, Rome. 2007
- MARINHO, V. L.; MENDES, M.A.S; BATISTA, M.F.; FONSECA, J. N.L. Quarentena Vegetal: Histórico, conceitos e definições. In: *Fungos quarentenários para o Brasil*. MENDES, M.A.S.; FELIX, A.A.A.; SANTOS, M.F.; HERNÁNDEZ GUTIÉRREZ, A. (Eds.). Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 13-18, 2004
- MARQUES, A. S. DOS A.; LOPES-DA-SILVA, M.; GONZAGA, V.; FERNANDES, F. R.; BENITO, N. P.; VEIGA, R. F. DE A. Fundamentos biológicos, ferramentas operacionais e inovação em quarentena vegetal. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 51, n. 5, 483-493, 2016
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Mapa. Portaria nº 617, de 11 de julho de 2022. *Diário Oficial*, 2020
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Mapa. Instrução Normativa nº 28, de 20 de abril de 2020. Atualiza lista de pragas quarentenárias ausentes (PQA) para o Brasil. *Diário Oficial*, 2022
- PASSADOR, M. M.; YUKI, V. A.; MARUBAYASHI, J. M.; ITO, M. F.; UZZO, R. P.; DUDIENAS, C. Coleta e preservação de controles positivos para diagnose de fitopatógenos no Quarentenário/IAC. In: 41º Congresso Paulista de Fitopatologia, 2018, Marília
- PASSADOR, M. M.; MARUBAYASHI, J. M.; UZZO, R. P.; DUDIENAS, C; YUKI, V. A. Padronização de protocolos de extração de ácidos nucleicos na rotina de diagnósticos em quarentena vegetal. In: 51º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2019, Recife. *Tropical Plant Pathology*. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia (SBF), 2019
- PASSADOR, M. M.; UZZO, R. P.; YUKI, V. A. DUDIENAS, C. Preservação de controles positivos do gênero *Potyvirus* para análises em quarentena vegetal. In: IX Congresso Virtual de Agronomia, 2021, Curitiba. IX Congresso Virtual de Agronomia, 2021
- PASSADOR, M. M.; UZZO, R. P.; MARUBAYASHI, J. M.; YUKI, V. A.; DUDIENAS, C. Adaptação de protocolo de RT-PCR para análises de vírus do gênero *Potexvirus*. In: X Congresso Virtual de Agronomia, 2022, Curitiba. X Congresso Virtual de Agronomia, 2022a.
- PASSADOR, M. M.; UZZO, R. P.; MARUBAYASHI, J. M.; YUKI, V. A.; DUDIENAS, C. Adaptação de protocolo de RT-PCR para análises de vírus do gênero *Potexvirus*. In: Everton Nogueira Silva. (Org.). *Multiplicidade das Ciências Agrárias*. 1ed. Fortaleza: Editora In Vivo, 2022b, v. 3, p. 58-65.
- PASSADOR, M. M.; UZZO, R. P.; NEGRI, B.; YUKI, V. A.; DUDIENAS, C. Aplicações da biologia molecular para análises de sementes no Quarentenário IAC no período de janeiro de 2018 a maio de 2022. In: XXI Congresso Brasileiro de Sementes, 2022, Curitiba. *Anais do XXI Congresso Brasileiro de Sementes*. Londrina: ABRATES, 2022c. v. 29. p. 128-128.



PASSADOR, M. M.; UZZO, R. P.; MARUBAYASHI, J. M.; YUKI, V. A.; DUDIENAS, C. Preservação de controles positivos do gênero *Tobamovirus* para análises em quarentena vegetal. In: VI Congresso Brasileiro de Fitossanidade, 2022, Goiânia. Anais do VI Congresso Brasileiro de Fitossanidade, 2022d

SIGMA ALDRICH (n.d.). Tri Reagent. Technical Bulletin. Retrieved January 16, 2019, from <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/t9424bul.pdf>

VEIGA, R. F. A.; BARBOSA, W.; TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. A.; BENATTI JUNIOR, R. Quarentenário de Plantas no Instituto Agrônômico. *O Agrônômico*, v. 56, p. 24-26, 2005