

Conversas entre plantas e microrganismos

COSTA, Gabriel⁽¹⁾; RODRIGUES, Catarina⁽¹⁾; SOEIRO, Filipa⁽¹⁾; SILVA, Valentina⁽¹⁾; SILVA, Victória⁽¹⁾; RIBEIRO, Mónica⁽¹⁾; SANTOS, Sónia⁽²⁾.

⁽¹⁾ 12ª A (2020/2021) Escola Básica e Secundária Alfredo da Silva, Praça de Bento Jesus Caraça, 2830-322 Barreiro, Portugal

⁽²⁾ Escola Superior de Tecnologia do Barreiro, Instituto Politécnico de Setúbal, Rua Américo da Silva Marinho, 2839-001 Lavradió, Portugal

Introdução

Os microrganismos da filosfera são abundantes e crescem quer na superfície (epifíticos) quer no interior (endofíticos) das folhas das plantas. Esta comunidade microbiana é muito complexa e pode ter uma função importante na proteção das plantas contra doenças.

A oliveira (*Olea europaea*) é uma árvore que é afetada por várias doenças e o estudo destas comunidades da filosfera é de particular interesse como forma de potenciar a sua defesa contra a ação dos agentes patogénicos (Giampetruzzi *et al.*, 2020).

Objetivo

Quantificar e observar microrganismos epifitos e endofíticos presentes em folhas de oliveira em diferentes meios de cultura. Verificar se existem diferenças a nível de microrganismos numa oliveira em meio natural, que se mantém no estado selvagem (Figura 1) e numa oliveira cultivada e bastante mais jovem (Figura 2), ambas oliveiras encontram-se isoladas e não inseridas num olival.

Epifíticos

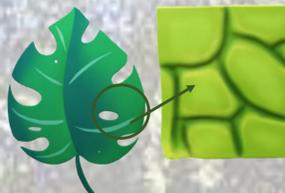
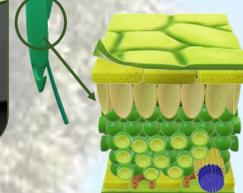


Fig.1 - Oliveira selvagem



Fig.2 - Oliveira cultivada

Endofíticos



Procedimentos

Os processos descritos de seguida foram efetuados de igual forma nas folhas da árvore silvestre e na árvore cultivada. Todo o trabalho de laboratório decorreu em ambiente assético (Figuras 3A a D).

Isolamento de microrganismos epifíticos

1. Imersão de 5 folhas de oliveira, numa solução de 100 ml de NaCl 0,9% e agitação vigorosa da mesma, para que os microrganismos entrem em suspensão, obtendo assim a solução-mãe (Fig. 3A);
2. Transferência de 9 ml de NaCl 0,9% para cada um dos tubos de ensaio;
3. Utilização da técnica das diluições sucessivas, ou seja, diluição em 1:10;
4. Transferência de 1 ml da solução-mãe, para o tubo de ensaio (Fig.3B);
5. Homogeneização da suspensão utilizando o vortex;
6. Transferência de 0,1 ml da solução-mãe para uma placa de Petri (uma no meio de cultura PDA e outra em NA) (Fig.3C); PDA (promove o crescimento de fungos) e NA (promove o crescimento de bactérias);
7. Transferência de 0,1 ml da solução do tubo de ensaio a 10^{-3} para uma placa de Petri (uma no meio de cultura PDA e outra em NA).



Figura 3 - Fases do trabalho no laboratório.

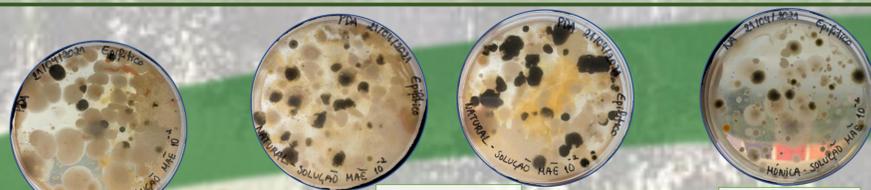
Isolamento de microrganismos endofíticos

1. Desinfecção da superfície das folhas através da imersão sequencial em álcool 70%, seguida de lixívia, novamente em álcool 70% e três vezes em NaCl 0,9%;
2. Corte das folhas, expondo os seus tecidos, em quadrados e sem extremidades;
3. Transferência dos cortes preparados anteriormente para metade da placa de Petri, de modo a conferir a interação entre o interior da folha e do meio de cultura;
4. Controlar a eficácia da desinfecção feita contactando o exterior da folha com o meio de cultura, na outra metade da placa de Petri (Fig.3D) (Controlo de esterilidade).

Em ambos os estudos procedeu-se à observação do crescimento das colónias de microrganismos epifíticos e endofíticos e à sua contagem ao fim de 10 dias.

Resultados

Atendendo aos resultados obtidos (Quadros I e II), podemos observar que os microrganismos epifíticos são mais abundantes do que os endofíticos. Observou-se também uma maior diversidade de fungos, no meio PDA, do que de bactérias, no meio NA. O número de colónias diminuiu gradualmente com as diluições efetuadas. Apesar das precauções na realização do trabalho laboratorial, o controlo de esterilidade revelou a ocorrência de algumas contaminações nos meios de cultura.



PDA (Solução-mãe)
Oliveira cultivada

PDA (Solução-mãe)
Oliveira silvestre

NA (Solução-mãe)
Oliveira cultivada

ORGANISMOS EPIFÍTICOS



PDA (Diluição)
Oliveira cultivada

NA (Diluição)
Oliveira silvestre

NA (Diluição)
Oliveira cultivada

Quadro I - Resultados de colónias de organismos epifitos expressos em unidades formadoras de colónias (UFC).

Epifíticos	UFC/g solo (média)
PDA cultivada	12×10^3
PDA silvestre	$41,7 \times 10^2$
NA cultivada	37×10^2
NA silvestre	12×10^3

Quadro II - Resultados de colónias de organismos endofitos.

Endofíticos	Nº colónias	Diversidade
NA cultivada	5	3
NA silvestre	3	2
PDA cultivada	5	2
PDA silvestre	2	1



Oliveira silvestre
Controlo de Esterilidade / NA

Oliveira cultivada
Controlo de Esterilidade / NA

ORGANISMOS ENDOFÍTICOS



Oliveira cultivada
Controlo de Esterilidade / PDA

Oliveira silvestre
Controlo de Esterilidade / PDA

Discussão e Conclusões

Os resultados obtidos nos nossos ensaios laboratoriais estão de acordo com a bibliografia consultada. Era espetável que a oliveira silvestre, ou seja, sem cuidados, em comparação com a oliveira cultivada, apresentasse uma maior quantidade e diversidade de microrganismos, quer epifíticos quer endofíticos. Este estudo é fundamental e útil no que diz respeito ao conhecimento das plantas e das relações que estas estabelecem com outros organismos tais como bactérias e fungos.



Bibliografia consultada

Giampetruzzi, A.; Baptista, P.; Morelli, M.; Carneiro, C.; Neto, T.L.; Costa, D.; D'Attoma, G.; Abou Kuba, R.; Altamura, G.; Saponari, M.; Pereira, J.A. & Saldarelli, P. (2020) - Differences in the endophytic microbiome of olive cultivars infected by *Xylella fastidiosa* across seasons. *Pathogens*, 9, 723; doi:10.3390/pathogens9090723.

Schirawski, J. & Perlin, M. (2018) - Plant-microbe interaction 2017. The good, the bad and the diverse. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1374; doi:10.3390/ijms19051374.

Santos, S.; Santos, C.; Silva, S.; Pinto, G.; Torres, L.M. & Nogueira, A.J.A. (2013) - The effect of sooty mold on fluorescence and gas exchange properties of olive tree. *Turk. J. Biol.* 37: 620-628.